

# A syndecan-1 és -2 szerepe a HT-1080 fibroszarkóma sejtek biológiai viselkedésében

Doktori (Ph.D.) értekezés

**Péterfia Bálint**

Semmelweis Egyetem  
Patológiai Tudományok Doktori Iskola



Témavezető: Prof. Dr. Kovalszky Ilona D.Sc., egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Patócs Attila Ph.D., laboratóriumi szakorvos  
Dr. Deák Ferenc D.Sc., tudományos tanácsadó

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Kulka Janina Ph.D., egyetemi tanár  
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Bán Zoltán Ph.D., egyetemi tanársegéd  
Dr. Réz Gábor Ph.D., egyetemi docens

Budapest  
2012

# Tartalomjegyzék

<b>1</b>	<b>RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE .....</b>	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>BEVEZETÉS.....</b>	<b>6</b>
2.1	A SEJTEK KÖRNYEZETE, AZ EXTRACELLULÁRIS MÁTRIX.....	7
2.2	A PROTEOGLIKÁNOK TÖRTÉNETE.....	8
2.3	A GLÜKÓZAMINOGLIKÁN CUKORLÁNCOK.....	9
2.4	A PROTEOGLIKÁNOK SZERKEZETE, FUNKCIÓJA ÉS FELOSZTÁSA.....	11
2.5	PROTEOGLIKÁNOK ÉS DAGANAT .....	13
2.6	SYNDECANOK: A SEJTVÁZAT AZ ECM MEL ÖSSZEKÖTŐ PROTEOGLIKÁNOK .....	14
2.7	A SYNDECANOK SZERKEZETE .....	16
2.7.1	<i>Az ektodomén.....</i>	<i>16</i>
2.7.2	<i>A transzmembrán domén .....</i>	<i>17</i>
2.7.3	<i>A citoplazmatikus domén.....</i>	<i>18</i>
2.8	SYNDECAN EKTODOMÉN SHEDDING.....	19
2.9	A SYNDECANOK SZÖVETI EXPRESSZIÓJA.....	21
2.10	A SYNDECANOK FIZIOLÓGIÁS FUNKCIÓI .....	22
2.11	SYNDECANOK SOKRÉTŰ SZEREPE A DAGANATOK VISELKEDÉSÉBEN .....	23
2.12	A SYNDECANOK SZEREPE A MESENCHYMALIS TUMOROKBAN .....	24
2.13	A FELNÖTTKORI FIBROSZARKÓMA .....	25
2.14	A HT-1080 FIBROSZARKÓMA SEJTVONAL .....	26
<b>3</b>	<b>CÉLKITŰZÉSEK.....</b>	<b>27</b>
<b>4</b>	<b>MÓDSZEREK .....</b>	<b>28</b>
4.1	FELHASZNÁLT VEGYSZEREK .....	28
4.2	PLAZMID KONSTRUKCIÓK .....	30
4.3	SEJTKULTÚRA ÉS TRANSZFEKCIÓ .....	33
4.4	KONFOKÁLIS MIKROSKÓPIA .....	34
4.5	PROLIFERÁCIÓ VIZSGÁLAT.....	34
4.6	SEJTMOTILITÁS VIZSGÁLAT .....	35
4.7	ÁLLATKÍSÉRLETEK, TŰDŐ METASZTÁZIS MODELL .....	36
4.8	RNS IZOLÁLÁS, KVANTITATÍV RT-PCR .....	38
4.9	OLIGOARRAY VIZSGÁLAT .....	40
4.9.1	<i>cRNS szintézis és jelölés .....</i>	<i>41</i>
4.9.2	<i>Hibridizáció.....</i>	<i>41</i>
4.10	FEHÉRJE EXTRAKCIÓ.....	42
4.11	WESTERN BLOT .....	43
4.12	CD138 ELISA.....	44
4.13	IMMUNCITOKÉMIA, IMMUNHISZTOKÉMIA .....	45
4.14	TIROZINKINÁZ ARRAY .....	46
4.15	ÁRAMLÁSI CITOMETRIA (FACS).....	46
4.16	STATISZTIKA.....	47
<b>5</b>	<b>EREDMÉNYEK .....</b>	<b>48</b>

5.1	A SYNDECAN-1 FÚZIÓS KONSTRUKCIÓK KIFEJEZŐDNEK, FEHÉRJE TERMÉKÜK PEDIG A SEJTMEMBRÁNBA KERÜL .....	48
5.2	A FULLEGFP ÉS A 78SIG TRANSZFEKCIÓS HATÉKONYSÁGA, ÉS A SYNDECAN-1 EXPRESSZIÓRA, ILL. SHEDDINGRE GYAKOROLT HATÁSA .....	49
5.3	A TELJES HOSSZÚSÁGÚ ÉS A CSONKOLT SYNDECAN-1 FOKOZZA A HT-1080 SEJTEK PROLIFERÁCIÓJÁT ÉS KEMOTAXISÁT .....	52
5.4	VÁLTOZÁSOK A SEJTPROLIFERÁCIÓ ÉS A SEJTMIGRÁCIÓ SZABÁLYOZÁSÁBAN RÉSZTVEVŐ GÉNEK EXPRESSZIÓJÁBAN.....	53
5.5	A SYNDECAN KONSTRUKCIÓK HATÁSA A HT-1080 SEJTEK MALIGNITÁSÁRA, IN VIVO EGÉRKÍSÉRLETEK .....	56
5.6	AZ ENDOGÉN ÉS A REKOMBINÁNS SYNDECAN-1 KIMUTATÁSA A TALPTUMOROKBAN.....	58
5.7	A FULLEGFP ÉS A 78SIG IN VIVO IS FOKOZZA A CDK2, A SYNDECAN-2 EXPRESSZIÓJÁT ÉS A RETINOBLASZTÓMA FOSZFORILÁCIÓJÁT.....	60
5.8	A SYNDECAN-1 -2 ÉS -4 HATÁSA A HT-1080 SEJTEK PROLIFERÁCIÓJÁRA ÉS MIGRÁCIÓJÁRA .....	61
5.9	A SYNDECAN-1 ÉS -2 GÉNCSENDESÍTÉSÉNEK HATÁSA A HT-1080 SEJTEK PROLIFERÁCIÓJÁRA ÉS MIGRÁCIÓJÁRA.....	62
5.10	A CSONKA SYNDECAN-1 PROLIFERÁCIÓ ÉS MIGRÁCIÓ STIMULÁLÓ HATÁSÁT A SYNDECAN-2 CSENDESÍTÉS MEGAKADÁLYOZZA .....	65
5.11	A SYNDECAN-1 ÉS -2 KOOPERÁCIÓJÁNAK HÁTTERÉBEN AZ IGF1R ÉS AZ Ets-1 TRANZKRÍPCIÓS FAKTOR ÁLLHAT.....	66
<b>6</b>	<b>MEGBESZÉLÉS .....</b>	<b>68</b>
<b>7</b>	<b>KÖVETKEZTETÉSEK.....</b>	<b>79</b>
<b>8</b>	<b>ÖSSZEFOGLALÁS .....</b>	<b>80</b>
<b>9</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>81</b>
<b>10</b>	<b>IRODALOMJEGYZÉK .....</b>	<b>82</b>
<b>11</b>	<b>SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE .....</b>	<b>97</b>
<b>12</b>	<b>KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....</b>	<b>100</b>

## 1 Rövidítések jegyzéke

ATCC:	American Type Culture Collection
ADAM:	disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein
ADAMTS:	disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin motif
BMP:	bone morphogenetic protein
BSA:	borjú szérum albumin
CAF:	karcinóma asszociált fibroblasztok
CASK:	calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase 3
CD:	citoplazmás domén
CD138:	syndecan-1
CDK2:	ciklin dependens kináz 2
cDNS:	copy DNA
CS:	kondroitinszulfát
CSPG:	kondroitinszulfát proteoglikán
DAPI:	4'6-diamidin-2-fenilindol-dihidrokloriddal
DNS:	dezoxiribonukleinsav
dNTP:	dezoxi-nukleotid trifoszfát
DS:	dermatánszulfát
DTT:	ditio-treitol
ECL:	enhanced chemoluminescent substrate
ECM:	extracelluláris mátrix, sejtközötti állomány
ED:	ektodomén
EGF:	epidermális növekedési faktor
EGFP:	enhanced green fluorescent protein , felerősített zöld fluoreszcens fehérje
ELISA:	enzyme-linked immunosorbent assay
Ets-1:	V-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1
FACS:	fluorescence-activated cell sorting
FAK:	fokális adhézión kináz
FBS:	fetal bovine serum, magzati borjúsavó
FGF:	fibroblaszt növekedési faktor

GAG:	glükózaminoglikán
GAPDH:	glicerinaldehid-foszfát-dehidrogenáz
GF:	növekedési faktor
GFP:	green fluorescent protein, zöld fluoreszcens fehérje
GFR:	növekedési faktor receptor
Gly:	glicin
GM-CSF:	granulocita-makrofág kolóniastimuláló faktor
HE:	hematoxilin-eozin
HPSE-1:	heparanáz enzim
HRP:	horseradish peroxidase, tormaperoxidáz
HS:	heparánszulfát
HSPG:	heparánszulfát proteoglikán
IGF1R:	inzulinszerű növekedési faktor 1 receptor
KS:	keratánszulfát
KSPG:	keratánszulfát proteoglikán
MAPK:	mitogen-activated protein kinase, mitogénaktivált proteinkináz
miRNA:	mikro-RNS
M-MLV RT:	murine leukemia virus reverse transcriptase
MMP:	mátrix metalloproteináz
mRNS:	hírvivő, messenger RNS
MSC:	mesenchymalis őssejt
MT-MMP:	membrán típusú mátrix metalloproteináz
NK:	negatív kontroll
OH:	hidroxil csoport
PBS:	foszfát pufferelt sóoldat
PCR:	polimerase chain reaction, polimeráz lánreakció
PG:	proteoglikán
PKC:	protein kináz C
PMA:	phorbol-12-myristate-13-acetate
PVDF:	polyvinylidene fluoride
Rb:	retinoblasztóma fehérje
RISC:	RNA-induced silencing complex

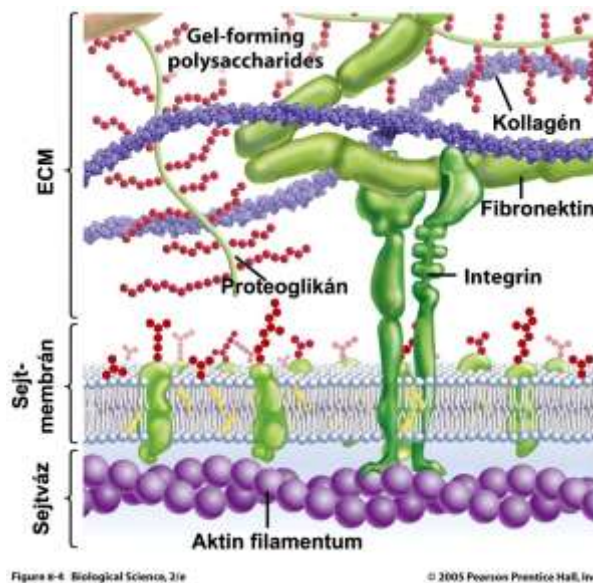
RNS:	ribonukleinsav
RT-qPCR:	kvantitatív reverz-transzkripció PCR
SCID:	severe combined immunodeficiency
SDF-1:	strómasejt-eredetű faktor 1
SDS	szódium-dodecil-szulfát / nátrium-dodecil-szulfát
Ser:	szerin
siRNA:	short interfering RNA, kis interferáló RNS
SNP:	single-nucleotide polymorphism, egynukleotidos polimorfizmus
SRB	szulforodamin B
TBS:	tris-pufferelt sóoldat
TCA:	triklór-ecetsav
TM:	transzmembrán
TMB:	3,3',5,5' – tetramethylbenzidine substrate
uPA:	urokináz típusú plazminogénaktivátor
uPAR:	urokináz típusú plazminogénaktivátor-receptor
VEGF:	vaszkuláris endoteliális növekedési faktor
wt:	wild type, vad típus

## 2 Bevezetés

Az elmúlt évtizedekben a molekuláris biológiai módszerek robbanásszerű fejlődésével a daganatkutatás számára új távlatok nyíltak. A Humán Genom Projekt tizenhárom év után 2003-ban lezárult, bázis szinten feltárva a teljes emberi genomot, így az összes még fel nem térképezett génünk DNS szekvenciáját megismertük. A genomszekvenálási módszerek gyors fejlődésével rohamosan gyarapodnak ismereteink a genetikai polimorfizmusokról, illetve a mutációkról, amelyek kimutatása mára beépült a klinikai munka gyakorlatába. A betegek célzott terápiájának megtervezésekor alapvető szempont lett bizonyos mutációk státuszának diagnosztikai meghatározása. Mindeközben az is egyre világosabbá válik, hogy a daganatok kialakulásához vezető úton a mutációk mellett a szöveti környezet szerepe jóval fontosabb, mint azt korábban gondoltuk. A sejtközötti állomány jellegzetes komponensei a proteoglikánok. A megfigyelések szerint nagymértékben képesek befolyásolni a sejtek viselkedését, így potenciális daganatterápiás célpontok. A leggyakoribb sejtfelszíni proteoglikánok, a syndecanok szerepét a daganatok kialakulásában illetve fejlődésében számos tanulmány próbálta tisztázni, több-kevesebb sikerrel. A korábbi gyakorlat szerint a hámszövetekre jellemző syndecan-1 hatását karcinóma sejtvonalakon vizsgálták. A munkám kezdetén, amikor TDK hallgató jelöltként professzor Kovalszky Ilona laborjába kerültem, csak arra voltunk kíváncsiak, hogy van-e hatása a syndecan-1 expressziójának egy kötőszöveti eredetű fibroszarkóma sejtvonal biológiai viselkedésére. Később aztán, ahogy egyik eredmény jött a másik után, mindig újabb és újabb kérdések merültek föl, mígnem ez a dolgozat kerekedett ki belőle. Jó olvasást kívánok hozzá.

## 2.1 A sejtek környezete, az extracelluláris mátrix

A szövetekben a sejtek közötti teret az extracelluláris mátrix (ECM) tölti ki. Az ECM igen sokféle megjelenési formáját az őt alkotó makromolekulák változatos relatív arányának, illetve szerveződési módjuknak köszönheti. Manapság már tudjuk, hogy ennek a mátrixnak nem pusztán passzív - a struktúra fenntartását célzó - mechanikai szerepe van, hanem aktívan részt vesz a sejtek viselkedésének szabályozásában (túlélés, fejlődés, migráció, proliferáció, alak, funkció). Ebben az aktív szabályozó funkcióban a proteoglikánok – az ECM egyik fontos alkotói - nagy szerepet vállalnak. Az ECM felépítésében legfontosabb molekuláris komponensek a rostos fehérjék, a szénhidrát glükózaminoglikánok (GAG-ok), illetve a proteoglikánok. A rostos fehérjék a jól ismert kollagének, elasztin, fibronectin, a laminin, az entaktin és egyéb elemek. A GAG-ok jellegzetes, nitrogén tartalmú poliszacharidok, melyek vázfehérjékhez kapcsolva alkotják a proteoglikánokat. Jellegzetességük, hogy az ECM szárazanyagtartalmának kevesebb mint tizedét teszik ki, mégis, nagy vízmegkötő képességük révén térfogatarányuk ennél jóval nagyobb. A felsorolt fehérjéket és a proteoglikánokat is a sejtek termelik. A molekulák egymással kapcsolatokat létesítve kusza hálózatot alakítanak ki és ehhez a hálózathoz tapadnak ki a sejtek integrin receptoraik révén. (1. ábra).



**1. ábra.** A proteoglikánok leggyakrabban az extracelluláris mátrixban, a struktúr fehérjék közé fonódva helyezkednek el.



Az alaphártyák az ECM egyik speciális megjelenési formáját képviselik. A sejt anyagcseretermékek, tápanyagok átjutását, a sejtek proliferációját és differenciációját szabályozzák (1), valamint barrierként megakadályozzák a sejtek átvándorlását.

Több tanulmány vizsgálta már azt a jelenséget, hogy a daganat strómája miként képes akár ép hámsejteket is tumoros fenotípusúvá tenni (2). Tekintve, hogy a feltárt mechanizmusok igen hasonlóak a sebgyógyulásnál tapasztalt folyamatokhoz, sokan úgy vélik, hogy a daganat tulajdonképpen egy olyan seb, ami soha nem gyógyul meg. Prostatarákból származó ún. karcinóma asszociált fibroblasztokat (CAF) immortalizált, de egyébként normális prostatatahámsejtekkel összekeverve, azok daganatot fejlesztettek egerekben. A hámsejtek szabálytalanul proliferáltak és bizonyos kromoszóma rendellenességek jelentek meg bennük. Ez a malignus átalakulás csak akkor következett be, ha immortalizált prosztata hámsejtekkel keverték össze a CAF-okat. Ha normális prosztata hámsejtekkel keverték őket, akkor nem következett be ez a transzformáció, de akkor sem, ha normális prosztata fibroblaszt sejtekkel keverték az immortalizált prosztata hámsejteket. A strómasejtek, illetve az általuk termelt mátrix tehát tumor promóter is lehet (3).

A daganatok strómájára jellemző, hogy bennük a normálhoz képest a proteoglikánok termelődése megváltozik. Vastagbélrák sejtek kondicionált médiumával kezelt normál fibroblasztok például fokozott mennyiségben termelnek proteoglikánokat, melyeken nagyobb volt a GAG komponensek aránya (4).

## 2.2 A proteoglikánok története

A legkorábbi nyilvántartott közlemény a PubMed adatbázisban, melyben a proteoglikán megnevezést használják, 1966-ban íródott (5). A proteoglikánok felfedezése azonban mintegy száz évvel korábbra tehető, és Eichwald nevéhez fűződik. Egy 1944-ben íródott közlemény szerint az éti csiga különböző szervei által termelt nyálkát, azaz a mucint tanulmányozta. Az akkori tapasztalatok szerint a mucinban található fehérjék, melyeket **mukoproteineknek** hívtak, abban különböztek a többi fehérjétől, hogy vízben viszkózus oldatot képeztek, melyből ecetsavval viszonylag

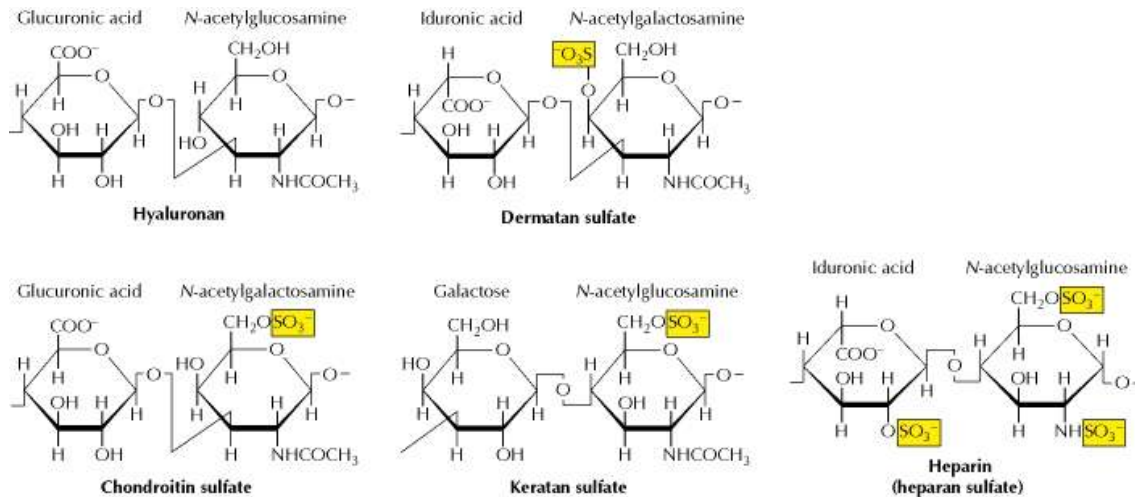
könnyen ki lehetett őket csapni. Egyszerű hidrolízist alkalmazva Eichwald 1865-ben leírta, hogy mindegyik mintából fehérje-szénhidrát komplexek izolálhatók, igaz, a felszabaduló redukáló anyagot hibásan glükóznak azonosította (6). A további tanulmányok rámutattak, hogy ez a szénhidrát komponens nitrogént is tartalmaz (7,8), sőt, később azt is kimutatták, hogy ezekben a mukoproteinekben az egyik fő szénhidrát komponens a kondroitin szulfát. Eichwald tehát proteoglikánokat talált 1865-ben. (9).

A pontos kémiai szerkezet ismeretének hiányában sokféle megnevezést használtak az olyan makromolekulák elkülönítésére, melyekben nitrogént tartalmazó szénhidrát komponens található. Ezek közül a leggyakoribb nevek a **mukopoliszacharidok**, a **mukoproteinek**, a **glikopeptidek**, a **mukoidok**, vagy a **glikoproteinek**. A „mukopoliszacharid” megnevezés Karl Meyertől származik. Az állati eredetű hexózamin tartalmú poliszacharidokat különítette el vele, amelyek szabadon, illetve fehérjéhez kötődve fordulnak elő. A „muko” előtaggal arra utalt, hogy ezek az anyagok a mucinból származnak (10). A pontos kémiai szerkezet megismerésével lehetőség nyílt egy új, egységes nevezéktan bevezetésére. A mukopoliszacharid, és egyéb nevek helyett a glükózaminoglikán (GAG) megnevezést 1960-ban Roger W. Jeanloz javasolta, ezenfelül egy általános megnevezés bevezetését szorgalmazta azon makromolekulák elkülönítésére, *melyeknél egy fehérje részhez kovalens kötéssel különböző szulfatált glükózaminoglikán cukorláncok kapcsolódnak* (11). Ez a meghatározás azóta is érvényben van, az általa elkülönített makromolekulák pedig a proteoglikán nevet kapták.

### 2.3 A glükózaminoglikán cukorláncok

A GAG-ok elágazás nélküli anionos poliszacharidok, amelyek a sejtfelszínen, vagy az extracelluláris mátrixban találhatóak és általában kovalens kötéssel proteoglikán vázfehérjéhez kapcsolódnak. Jellegzetes diszacharid egységekből épülnek fel, amelyek mindig egy amino-cukorból, vagyis hexózaminból (N-acetil-D-glükózamin, vagy N-acetil-D-galaktózamin) és egy uronsavból állnak (D-glükuronsav, vagy L-iduronsav). A diszacharid egységeken az OH-csoportok gyakran szulfátészter, vagy szulfamid formájában vannak jelen, az NH<sub>2</sub> csoportok ritkábban. Többféle GAG ismert, számunkra a legfontosabb közülük a **heparánszulfát (HS)**, melynél a

diszacharid egységekben egy D-glükuronsav és egy N-acetil-D-glükózamin-4-szulfát  $\beta$ 1-4 kötéssel kapcsolódik egymáshoz (**2. ábra**). A syndecanok esetében egy másik GAG a **kondroitinszulfát (CS)**, melynek diszacharid egységei egy D-glükuronsavból és egy N-acetil-D-galaktózaminból állnak,  $\beta$ 1-3 kötéssel. A többi GAG-ot és jellemző diszacharid egységeiket a 2. ábrán tüntettem fel.



**2. ábra.** A különböző glükózaminoglikán oldalláncokat felépítő diszacharid egységek.

Forrás: The Cell: A Molecular Approach. 2nd edition 2000. Cooper GM.

A GAG-ok gyakori komponensei az amyloidoknak, így feltehetően az amyloidosisos betegségekben (Alzheimer-kór, Parkinson-kór) fontos szerepet játszhatnak (12). A gyulladásoknál a GAG-ok a leukociták adhéziós ligandjaként azok extravazációjához szükségesek (13).

A GAG-ok térszerkezetét, illetve struktúráját vizsgáló módszerek napjainkban gyors fejlődést mutatnak. Ennek eredményeként rohamosan gyűlnek a pontos adatok a GAG interakciók térszerkezetéről, mely alapján beazonosíthatóak az interakcióban kulcsfontosságú motívumok (14). Az eredmények alapján különböző gyógyszergyártók jelenleg több szintetikus oligoszacharid molekulát is tesztelnek (15), így a jövőben várhatóan megjelenhetnek a fenti betegségek célzott terápiájára fejlesztett GAG származékok (16). Egy jó példa erre a klinikai alkalmazásra fejlesztett PI-88 nevű oligoszacharid, amely a heparanáz enzim gátlójaként a várakozások szerint gyulladások, vírusfertőzések és daganatok kezelésére lesz alkalmas (15).

## 2.4 A proteoglikánok szerkezete, funkciója és felosztása

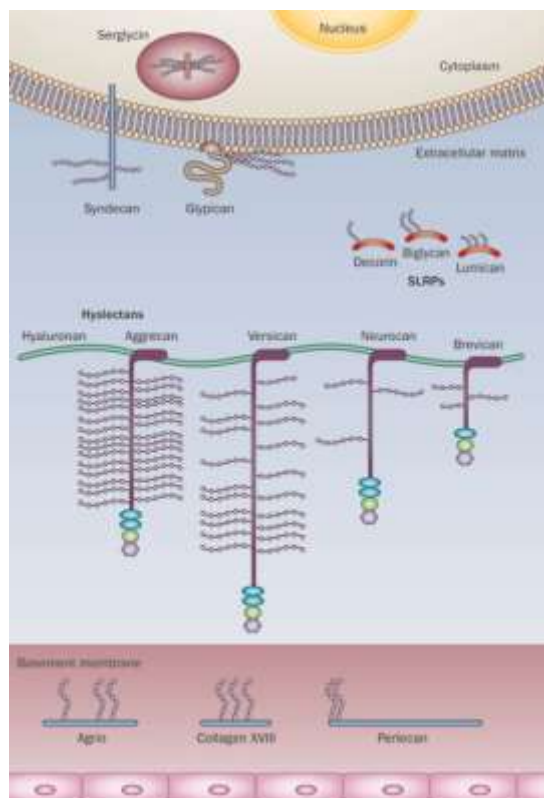
A GAG-ok - a hialuronsav kivételével – nem fordulnak elő önmagukban, hanem mindig egy vázfehérjéhez kapcsolódva, proteoglikánok formájában. Azon makromolekulákat nevezünk tehát proteoglikánoknak, melyek egy vázfehérjéből és a hozzá O-glikozidos kötással kapcsolódó GAG láncokból állnak. A GAG-ok száma lehet csupán egy (pl. decorin), de akár több mint 100 is (aggrecan), a hosszúságuk pedig leggyakrabban 80 monomer körüli (1. táblázat).

1. táblázat. A legismertebb proteoglikánok szerkezete és előfordulása.

név	vázfehérje tömege (kDa)	GAG típusa	GAG láncok száma	előfordulás
Aggrecan	210	CS / KS	~130	porc
Betaglycan	36	CS / DS	1	sejtfelszín és ECM
Decorin	40	CS / DS	1	kötőszövet
Perlecan	600	HS	2–15	bazális membrán
Syndecan-1	32	CS / HS	1–3	hámsejtek felszínén

A proteoglikánokon természetesen lehetnek egyéb szénhidrát komponensek is, mégis a GAG láncok megléte különíti el őket a glikoproteinektől. A GAG láncok a hozzájuk kapcsolódó szulfát- és karboxil csoportok révén savanyú karakterűek (17).

A vázfehérje a legtöbb proteoglikán esetében exportfehérjeként az extracelluláris mátrixba kerül (3. ábra), azonban vannak transzmembrán (syndecanok) és membrán asszociált (glypicanok) képviselőik is, sőt sejten belüliek is (serglycin). Jellemzően a proteoglikánok a struktúrfehérjék közé fonódva helyezkednek el az extracelluláris mátrixban és a sejtek felszínén (1. ábra) és gyakorlatilag minden többsejtű szervezet szöveteiben megtalálhatóak. Manapság már több mint 40 proteoglikán vázfehérje génjét ismerjük, ezek közül a legismertebbeket a 3. ábrán tüntettem fel.



**3. ábra.** Az egyes proteoglikánok a sejten belül, a sejt felszínén és extracellulárisan, illetve az alaphártyában található meg. (Edwards, I. J. (2012) Proteoglycans in prostate cancer Nat. Rev. Urol.)

A Golgi készülékben történik a proteoglikánok glikozilációja, melynek során egy tetraszacharid kapcsoló régió kerül a vázfehérje konszenzus Ser-Gly szekvenciájára. A következő elongációs lépésben erre a kapcsoló régióra épül fel a GAG poliszacharid a hexózamin és uronsav monomerek egymás utáni beépítésével (18). Végül utólagos módosításokra kerül sor (epimerizáció, szulfatáció), így kialakul a GAG-ok finomszerkezete, ami igen változatos lehet. A heparánszulfát és kondroitinszulfát bioszintézisét és módosítását több mint 40 gén által kódolt enzim irányítja. Ezek expressziós mintázata határozza meg a GAG-ok lánchosszát, szulfatációs mintázatát és finom szerkezetét, amely minden sejttypusnál más és más lehet (19).

A szulfát és a karboxil csoportok erős negatív töltést adnak a molekulának, ami sok kation és vízmolekula megkötését eredményezi. A sok víz megkötése miatt a GAG-ok hidratálódva kocsonyás gélt képeznek. Ez a viszkózus anyag adja az extracelluláris mátrix alapállományát. Természetesen ha csak ez a kocsonyás alapállomány kialakítása volna a funkciójuk, akkor valószínűleg nem lenne ennyi féle proteoglikán. A víz megkötésén túl, különösen a heparánszulfát proteoglikánoknál (HSPG) a heparánszulfát

és a heparin nagyszámú fehérjével léphet interakcióba, köztük különböző növekedési faktorokkal és azok receptoraival, kemokinekkal, proteáz enzimekkel, serpinekkel, és természetesen az extracelluláris mátrix számos szerkezeti elemével, mint például a kollagénnel, lamininnel, fibronektinnel, és a hialuronsavval (20,21). Ezek az interakciók gyakran kulcsszerepet játszanak a GAG-ok, illetve a proteoglikánok biológiai hatásaiban, úgymint a véralvadásgátlás, a növekedési faktor jelátvitel szabályozása, a sejtadhézió, a gyulladás, vagy kórokozók, vírusok megtapadása (22). A sokféle proteoglikán az ECM struktúrférféjével asszociálódva a GAG-ok révén sokféle gélt képezhetnek a pórusátmérő és a töltés tekintetében, ezért egyfajta molekuláris szűrőként is funkcionálhatnak. Ez a szűrő funkció a vese glomerulusok alaphártyájában, az agrin és a perlecan esetében érhető tetten, ahol a heparánszulfát láncok negatív töltése akadályozza meg a plazmafehérjék kiválasztódását.

Egy ilyen összetett szerkezetű molekulacsalád esetében, mint a proteoglikánok, többféle lehetőség is kínálkozik kategorizálásukra. Egyik ilyen a GAG láncok alapján történő felosztás, mely szerint beszélhetünk Heparánszulfát proteoglikánokról (HSPG), kondroitinszulfát proteoglikánokról (CSPG), keratánszulfát proteoglikánokról (KSPG) és dermatánszulfát proteoglikánokról (DSPG). Más felosztások a proteoglikánok lokalizációjából indulnak ki, ez esetben sejt felszíni, illetve mátrix proteoglikánokról beszélünk.

## 2.5 Proteoglikánok és daganat

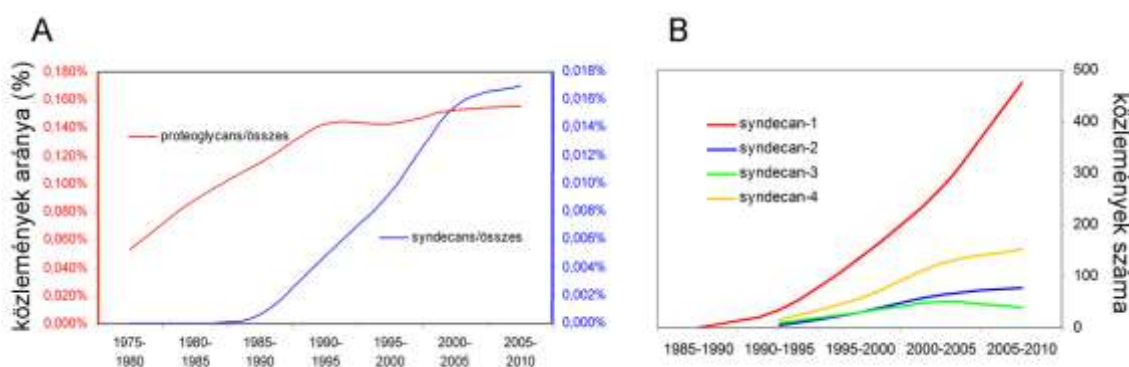
A proteoglikánok a daganatok kialakulásában és fejlődésében többféleképpen vehetnek részt. A syndecanok és a glypicanok a tumorsejtek felszínén ko-receptorként működve a növekedési faktorok jelátvitelét és az integrines sejtadhéziót befolyásolhatják (23). A fibroblaszt növekedési faktorról (FGF) és a vaszkuláris endoteliális növekedési faktorról (VEGF) és receptoraikkal kölcsönhatva az angiogenezist is befolyásolhatják (24). Olykor ugyanaz a proteoglikán fokozhatja, vagy akár gátolhatja is a vérerek képződését. A perlecan, attól függően, hogy proteolitikus hasításon átesik vagy nem, angiogenezis gátló, vagy serkentő hatású is lehet (25). Végül fontos megemlíteni, hogy a proteoglikánok a strómasejtek és a daganatsejtek közötti parakrin hatások közvetítésében és szabályozásában is kulcsszerepet játszanak.

A daganatok strómasejtjein megjelenő syndecan-1 is ilyen módon, a parakrin tumor promóter hatások felerősítésével támogathatja a daganat fejlődését (26).

Az újabb preklinikai vizsgálatok biztató eredményei megerősítették, hogy a proteoglikánok ígéretes célpontjai lehetnek a jövő daganatterápiájának, ami a fenti folyamatok szabályozásának pontosabb megismerését teszik szükségessé (27).

## 2.6 Syndecanok: a sejtvázat az ECMmel összekötő proteoglikánok

A Bernfield munkacsoport NMuMG egér emlő epitél sejtek felszínéről tripszines emésztéssel izolált proteoglikánokat, amelyeket ioncserélő kromatográfiával elemeztek. A tripszin által felszabadított proteoglikán frakcióban találtak egy proteoglikánt, amely heparánszulfátot és kondroitinszulfátot is tartalmazott. Mivel nagy affinitást mutatott mind az ECM számos komponense, mind az aktin váz iránt, ezért feltételezték a membrán lokalizációját (28). Ezt a proteoglikánt 1989-ben klónozták és a syndecan nevet adták neki. A név a görög syndein (összekötő) szóból származik, utalva arra hogy a molekula összeköti az ECM-et a sejtvázzal (29). Egy éven belül klónoztak még kétféle emberi syndecant is, melyek vázfehérje mérete 31-90 kDa között volt. A további klónozások eredményeként végül négy különböző syndecan molekulát különítettek el (30,31). Azóta a publikációk száma évről-évre emelkedik, sőt, a syndecanok - különösen a syndecan-1 - kutatása a közlemények száma alapján egyre fontosabb pozíciót tölt be az orvosi biológiai kutatásokban (4. ábra A és B).



**4. ábra. A syndecanok és a proteoglikánok helyzete az orvosi biológiai kutatásokban.** A PubMed nyilvántartásából vett adatok alapján. (A) A „proteoglycans” (piros) és a „syndecans” (kék) kulcsszavakra adott találatok aránya az összes közleményhez képest öt éves periódusokban. (B) A különböző syndecanokkal foglalkozó közlemények száma öt éves periódusokban.

A gerinctelen állatokban csak egyféle syndecan molekula van, viszont csontos halaknál fejlettebb gerincesekben már négy. Ez sok más gén esetében is így van. A gerincesek és fejgerinchúrosok közös ősének mai leszármazottja, a lándzsahal teljes genomjának szekvenálásával derült ki, hogy a gerincesek kialakulásakor a fejgerinchúrosok óta feltehetően két teljes genom duplikáció is történt, így minden génből négy példány keletkezett (32). Ez azért érdekes, mert míg a gének többségénél a négy példányból három feleslegessé vált és fokozatosan elmutálódva inaktív pszeudogénné alakult, addig a syndecanok esetében mind a négy paralóg gén működőképes maradt, valószínűleg azért, mert divergens fejlődéssel új feladatot találtak maguknak. A lándzsahalhoz képest a gerincesekben új struktúrák / szövetek jelentek meg, mint például az idegrendszer fejlődésében a velőléc, vagy mint a csont- és porcszövetek, a vese felépítésében a glomerulusok, illetve hozzá hasonló struktúrák, és nem mellékesen a végtagok és a fej. Feltehetőleg a különböző syndecanok egyedi funkcióikat ezen új képletek működésének, vagy fejlődésének szabályozásában találták meg. Ahogy azt a további fejezetekben látni fogjuk, az embrió fejlődésekor a négyféle syndecan expressziója szigorúan szabályozott mintázatban változik térben és időben, kialakítva ezzel a felnőtt egyedekre jellemző szövetspecifikus mintázatukat. A syndecan-4 az idegcső záródásában vesz részt, a syndecan-3 a végtagbimbó fejlődésében (33), a csontok és porcok kialakulásában pedig gyakorlatilag mindegyik syndecan részt vesz. Közülük a syndecan-1 és -2 már a mesenchyma sejtek kondenzálódásakor, míg a syndecan-3 csak később, csak a majdani porcoknál a kondenzációs fázistól kezdve van jelen (34). A különböző syndecanok funkciója tehát azon képletek működésében - fejlődésében, amelyekre az imént, a lándzsahal – gerinces összehasonlításban utaltam, valóban egyedi, bár részleteiben még nem ismert.

Ha a különböző syndecanok génjét kiütik, akkor az ilyen egerek fenotípusa kissé eltérő, ami funkcióik különbözőségére utal, ugyanakkor életképesek és szaporodnak is, ami – számos más vizsgálat eredményeivel együtt – arra utal, hogy egymás funkcióját képesek átvenni.

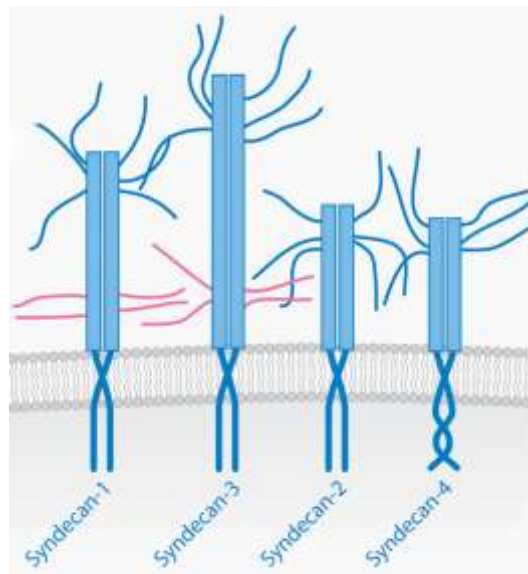


## 2.7 A syndecanok szerkezete

A funkciójukban tapasztalt különbözőségek és hasonlóságok keveredése a különböző syndecan fajták szerkezetében is megmutatkozik (5. ábra). Mindegyik egy hosszabb N-terminális ektodoménből, egy transzmembrán- és egy rövid C-terminális citoplazmatikus doménből áll. Mindegyik syndecan szintézisekor egy 18-22 aminosav hosszúságú szignálpeptid vágódik le az N-terminálisról (35).

### 2.7.1 Az ektodomén

A különböző syndecanok ektodoménjének szekvenciája csak kis mértékű egyezést mutat. Még két faj azonos syndecan ektodoménje is jelentősen eltér, ez a gyors evolúciójukra utal (36). A doménen belül azonban vannak konzervatív szakaszok is, amelyek a GAG-ok kötődésére, sejt interakciókra vagy oligomerizációra szolgálnak, valamint proteolitikus hasítóhelyek. A syndecan-1 és -3 esetében a GAG-ok két külön régióba csoportosulnak (5. ábra).



**5. ábra. A syndecan család négy képviselője.** Az extracelluláris doménjeik (világoskék téglalapok) különböznek egymástól, azonban transzmembrán és citoplazmás doménjük nagy része erős homológiát mutat. Az ektodomén meghatározott helyeihez kapcsolódnak a GAG cukorláncok, amelyek heparánszulfátok (vékony kék vonal) és a syndecan-1 és -3 esetében kondroitinszulfátok (vékony piros vonal) is lehetnek. (Couchmann JR, Annu Rev Cell Dev Biol. 2010)

A syndecan-1 esetében az N terminus közeli csoport csak heparán szulfátot köt, a membrán közeli glikozilációs helyek pedig csak kondroitin szulfátot (37). Valószínűleg a syndecan-3-nál is ez a helyzet. A syndecan-2 és -4 ektodoménjén egy csoportban található GAG kötő helyek, amelyek syndecan-4-nél a heparán szulfát mellett kondroitin szulfátot is megkötnék (38). A syndecanok ektodoménjével kapcsolatban sokáig csak a GAG láncoknak tulajdonítottak funkcionális jelentőséget, azonban kiderült, hogy a cukrok nélkül is képesek az integrin által közvetített sejtadhéziót segíteni. A syndecan-1 esetében az ektodoménon egy 29 aminosav hosszú szakasz felelős a  $\beta 3$  és a  $\beta 5$  integrinek kötéséért. Ez a domén rövid peptid formájában alkalmazva kompetítorként angiogenezis- és tumornövekedés gátló hatású, ezért a synstatin nevet kapta (39). Az ektodomén egyébként legtöbb biológiai hatását valóban a hozzá kapcsolt GAG-oknak, különösen a heparán szulfát láncoknak köszönheti. Az extracelluláris ligandok döntő hányadával való kölcsönhatás az erősen negatív töltésű GAG-ok segítségével valósul meg (fibronektin, laminin, kollagének, trombospondin, növekedési faktorok, proteázok). A GAG-ok közül a heparánszulfát képes legnagyobb affinitással kötni a különböző ligandokat, noha a kondroitinszulfát a legerősebben negatív töltésű. A ligandkötésben az is meghatározó, hogy a cukorláncok mennyire flexibilisek, hányféle konformációt képesek fölvenni.

Egy melanoma sejtvonalon azt találták, hogy a syndecan-1 HS oldaláncait bontó enzim, a heparanáz (HPSE-1) aktivitásának fokozódásakor növekedett a sejt metasztatizáló képessége és progressziója (40). Az enzim működése során felszabaduló 10-20-mer fragmentek biológiai aktivitása meghaladja a natív HS láncokét (41).

A sejtmembrán közelében található az ektodoménon egy proteolitikus hasítóhely, amelynek a syndecanok levedlésében (shedding) van szerepe (42). Erről a későbbiekben még szó fog esni.

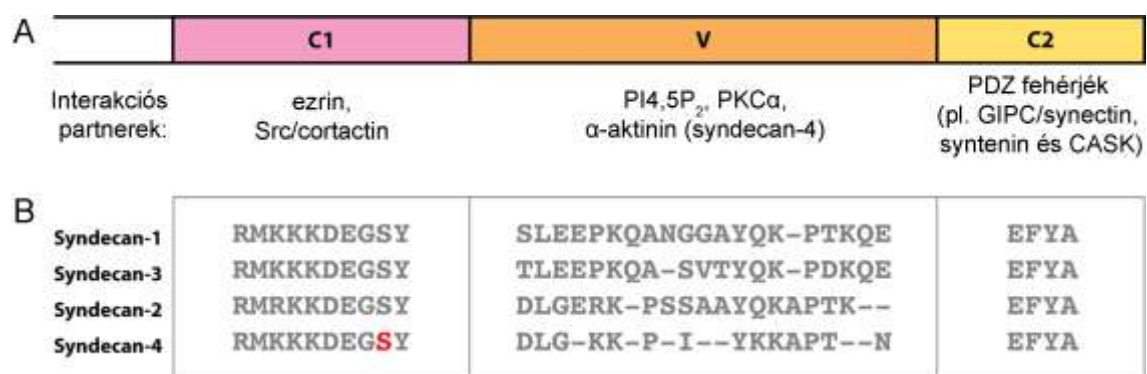
### 2.7.2 A transzmembrán domén

A rendkívül konzervált transzmembrán (TM) domén nem csak azért felelős, hogy a syndecanokat a sejtmembránba horgonyozva mechanikailag rögzítse. Dimerizációra- ill. oligomerizációra való képességük révén fontos szerepet kapnak a molekula működésében is. A dimerképzésükre akkor derült fény, amikor sikeres

klónozásukat követően, a GAG mentes vázfehérjéket SDS akrilamid gélen választották el. Ezek a fehérjék meglepő módon a vártnál jóval nagyobb molekulásúlynál futottak (29). A TM domén szükséges és egyben elégséges a syndecanok homodimerizációjához (oligomerizációjához), amely folyamat a syndecan-2 és syndecan-4 esetében a funkcióhoz nélkülözhetetlen. Az itt található konzervatív GxxxG motívum, amely a transzmembrán fehérjék 80%-ában megtalálható, kulcsfontosságú szerepét igazolja, hogy a glicinjeit elmutálva a dimerképzés elmarad, csakúgy, mint a syndecan hatása (43). A syndecan homodimerek mellett heterodimerek, illetve hetero-oligomerek is létrejöhetnek. Ebben a tekintetben a különböző syndecan párok eltérő affinitást mutatnak egymás iránt (44). További érdekessége ennek a kicsiny doménnek, hogy más sejtfelszíni fehérjékkel is interakcióba léphet, ami megmagyarázza, hogy miért kötik ki a gazdasejtet a syndecan-1 és -4 molekulák a szubsztrátjaikhoz még a citoplazmás doménjük hiányában is. Ez a kötődés és a segítsége révén létrejött kitapadása és szétterülése a sejtnek tirozinkináz gátlókkal megakadályozható (45,46).

### 2.7.3 A citoplazmatikus domén

A syndecanok citoplazmatikus doménje három régióra tagolható. A konzervatív C1 és C2 régiókra, melyek között egy variábilis, a család minden tagjánál egyedi V régió helyezkedik el (6. ábra).



6. ábra. A syndecanok citoplazmatikus doménje. (A) a domén három régiója és a legfontosabb fehérjék, amelyek ezekkel kapcsolatba lépnek. (B) A négy különböző syndecan citoplazmatikus domén aminosav szekvenciájának összehasonlítása. (Couchmann JR, Transmembrane Signaling Proteoglycans. Annu Rev Cell Dev Biol. 2010)

A C1 régió 10 aminosav hosszúságú. Az itt található aminosavak erősen hidrofílek, így megakadályozzák a syndecan szintézise közben, hogy az egész vázfehérje átcsússzon az endoplazmás retikulum üregébe. A szakasz nagyfokú szekvencia konzerváltsága azonban arra utal, hogy ez a szakasz ennél valószínűleg specifikusabb funkciót is betölthet. A C1 régión egy szerin és egy tirozin aminosav is található. A syndecan-4 esetében ez a szerin a PKC aktiváló forbol észteres kezelésre foszforilálódik (47).

Ezt a régiót a viszonylag variábilis V régió követi, melynek az az érdekessége, hogy míg szekvenciája különbözik a család tagjai között – utalva a különböző syndecanok funkcióbeli különbségeire, – addig a különböző fajoknál az azonos syndecan homológok V régiói nagymértékben egyeznek, tehát feltehetőleg ugyanazokkal a fehérjékkel lépnek interakcióba (35). Ezt a részt ismeri fel a legtöbb kölcsönható partner.

A C-terminuson található a konzervatív C2 domén, ami csupán 4 aminosavból áll (EFYA). Ezt a PDZ doménnel rendelkező fehérjék ismerhetik fel, mint például a CASK kináz (48). A C2 domén polarizált epiteliális sejteknél a syndecan-1 bazolaterális membránkompartmentbe irányításához szükséges (49).

## 2.8 Syndecan ektodomén shedding

A syndecanok ektodoménje proteolitikus hasítás eredményeképpen levágódhat. A folyamat neve shedding, magyar megfelelője a „vedlés” lehetne, ezt azonban nem szokták használni. A syndecan-1 sheddinget NMuMG egér emlősejteken írták le (50). A shedding következtében az ektodomén leválik a sejtfelszínről és a továbbiakban oldott molekulaként vesz részt különböző biológiai folyamatok szabályozásában. Az ektodomén levágódása miatt a sejt adhéziója gyengülhet. A levágódott ektodomén ugyanazokat a ligandokat képes megkötni, mint a sejtfelszínen (51), ezért a shedding tulajdonképpen a syndecan ligandok sejtfelszíni illetve az extracelluláris kompartmentbeli megoszlását szabályozza. A levágódott syndecan ektodomén kimutatható sejttenyészetek médiumából, sebfolyadékból és szérumból is. Szöveti sérülések, gyulladások nyomán a sebfolyadékban megemelkedik a syndecan-1 és -4

ektodomének mennyisége, ugyanígy multiplex myelomás, Hodgkin lymphomás, valamint tüdőrákos betegek szérumában is fokozott mennyiségben mutatható ki a syndecan-1 fragment (52-55).

Többféle hatással kiváltható a syndecan-1 sheddingje, így növekedési faktorokkal, illetve a növekedési faktor jelátviteli útvonalakat aktiváló anyagokkal, baktériumokkal, vagy a heparánszulfát láncok eltávolításával (56,57).

A syndecan-1 ektodomén lehasítására többféle proteáz enzim is képes. Egerek sebzésekor a syndecan-1 fokozott sheddingjét az MMP-7 aktivitásának köszönheti (58). HeLa sejteken bebizonyították, hogy a stróma sejt eredetű faktor 1 (SDF-1) hatására a syndecan-1 és -4 sheddingjét az MMP-9 működése okozza (59). Egyéb proteázok közül az ADAM17 bizonyítottan hasítja gyulladásnál a syndecan-1-et és -4-et (60), az ADAMTS1 pedig a syndecan-4-et, csökkentve a sejtek adhézióját és serkentve a migrációt (61). A heparanáz enzim a sejtfelszínen a heparánszulfát láncok emésztésével myeloma, glioma és MCF-7 emlőrák sejteknél a syndecan-1 expresszióját és sheddingjét serkenti, ezzel a sejtek angiogenezisét és áttétképző képességét fokozva (62-64). A jelenség okaként azt feltételezik, hogy a HS láncok eltávolításával szabadabbá teszi a heparanáz a syndecan vázfehérjét a proteázok számára. Újabb közlemények szerint ennél közvetlenebb hatása is lehet, ugyanis a heparanáz overexpressziója a MMP9, az urokináz típusú plazminogén aktivátor (uPA) és receptorának (uPAR) fokozott termelődésével jár (65). A levágódó syndecan fragmentek a vaszkuláris endoteliális növekedési faktort (VEGF) megkötve az ECM fehérjékhez horgonyozódnak, ezzel is segítve az endoteliális sejtek migrációját az angiogenezis során (66).

Az ektodomén levágódásához a vázfehérje membrán közeli részén több hasítási helyet is azonosítottak már. A japán Kanazawa egyetem kutatói a humán syndecan-1 vázfehérjén az MT1-MMP és MT3-MMP hasítási helyét is a sejtmembrántól 6 aminosav távolságban található 245-ös és 246-os glicin és leucin közé tették (67). Egy amerikai-német nemzetközi csapat pedig egér syndecan-1-et túlexpresszáló CHO sejteken PMA indukált sheddingnél a sejtmembrántól 9 aminosav távolságban található 243-as alanin és 244-es szerin között találták a hasítási helyet (68). Ez utóbbi két aminosav a humán syndecan-1 vázfehérjén is megtalálható és ugyancsak 9 aminosav távolságban a sejtmembrántól.

Egyes vélemények szerint a shedding szabályozásának tanulmányozása kulcsfontosságú a syndecanok karcinogenezisben játszott szerepének megértéséhez és egyúttal új, syndecan-célzó daganatterápiás szerek fejlesztésének lehet az alapja (69).

## 2.9 A syndecanok szöveti expressziója

Az emberi szervezetben a vörösvértestet leszámítva minden sejttípusban legalább egyféle syndecan kifejeződik, de többnyire egyszerre több is. Ugyanakkor az is elmondható, hogy mindegyik syndecan szövet- és fejlődési állapot szerint meghatározott, specifikus mintázatban expresszálódik (70). Általánosságban, a syndecan-1 főleg hámsejtekben, a syndecan-2 kötőszöveti sejtekben, a syndecan-3 idegsejtekben jelenik meg, míg a syndecan-4 sokféle sejttípusban előfordul, például glomerulusok mesangiumsejtjeiben (71), simaizomsejtjeiben (72) és fibroblasztokban (73).

Az egérembrío korai fejlődése során a syndecan-1 expressziója inkább a hámsejtekre jellemző, azonban mesenchymalis sejtcsoportokban is kimutatható átmenetileg, így a fogak, a tüdő, a vese és a végtagok fejlődésekor (74-77).

A syndecan-2 főként a kötő- és támasztószövetek prekursorsejtjeiben jelenik meg, az epiteliális-mesenchymalis interakciónál a csoportosuló mesenchyma sejtekben, viszont nem mutatható ki a hámsejtekben. A syndecan-1 és -2 szöveti megjelenésükben tehát egymást komplementálják, kivéve bizonyos mesenchymalis sejtcsoportokat, ahol átfednek (78). A syndecan-3 a fejlődő agyban, az idegsőben, főleg a bazális részén, a végtagbimbó disztális mesenchymasejtjeiben fordul elő, illetve átmenetileg a végtagkezdemény porcképző sejtcsoportjaiban, a szemlencséiben és a szklerotómban (79). A syndecan-4 a *Xenopus* embriókban a gasztrulációkor a betűződő dorzális mezodermasejtjeiben expresszálódik és a neuroektoderma elülső részében, később pedig a pronefroszokban, a kopoltyú ívekben, az agyban és a farokbimbóban mutatható ki. Felnőttekben a syndecan-4 a környéki idegrendszerben, a rostos kötőszövetekben, a placenta trophoblast sejtjeiben és a vesében van jelen (80).

A vese fejlődésekor a syndecan-1 expresszió eltűnik, ezzel párhuzamosan a syndecan-4 és -2 expressziója megemelkedik (81).

## 2.10 A syndecanok fiziológias funkciói

Egy kissé meglepő módon a syndecanokat újabban az alapanyagcsere szabályozásával is összefüggésbe hozták. Egy syndecan mutáns *drosophila* törzs vizsgálatával azt állapították meg, hogy ezek a legyek a csökkent zsírraktározási képességen túl tovább alszanak, anyagcseréjük alacsonyabb intenzitású, érzékenyebbek az éhezésre, rövidebb ideig élnek, kevésbé termékenyek és alacsonyabb a mitokondriális légzésük is. Egészséges korai pubertáskorú gyermekeknél a syndecan-4 SNP analízisével azt találták, hogy a két allél hordozói különböznek az éhomi vércukorszintjükben, az alvási idejükben, a hasi zsírszövetek mennyiségében, és az inzulin érzékenységükben (82). A syndecan-1 és -3 transzgenikus állatok hajlamosak az elhízásra (83). A hipotalamuszban a sejtfelszíni syndecan-3 mennyisége éhezéskor magas, táplálkozáskor viszont levágódnak az ektodomének (84).

Fontos szerepe van a syndecan-1-nek a sebgyógyulásban is, ahol a levágódott ektodomén a regenerálódást gyorsítja a hámsejtek  $\alpha 2\beta 1$  integrinjének működését befolyásolva (58), illetve a gyulladás szabályozásában is részt vesz [60].

A karmosbéka embrionális fejlődésének elején a syndecan-1 az ektoderma hát-hasi tagozódásában fontos a BMP jelátvitelre hatva (85). A syndecan-2 ugyanitt a bal-jobb tengely kialakulásában fontos. A korai gasztrulációkor a PKC $\gamma$  az ektoderma sejtekben expresszálódó syndecan-2 citoplazmás doménjét csak az embrió jobb oldalán foszforilálja, ezért az ektodermával érintkező mezoderma sejtek máshogyan migrálnak (86). A zebradánióban a syndecan-2 az erek fejlődésében játszik szerepet az embrionális fejlődés során (87), *Xenopus*-nál a syndecan-4 pedig a wnt jelátvitel mellékszereplőjeként a gasztrulációt elindító sejtmozgások kiváltásában (konvergens kiterjedés) és az idegcső záródásában vesz részt (88,89). A syndecan-4 az izmok regenerációjában is fontos lehet, expressziója megemelkedik simaizomsejteken mechanikai nyújtás hatására (72).

A syndecanok funkcióinak tanulmányozására létrehozott génkiütött állatok életképesek, jól szaporodnak, ugyanakkor fenotípusuk eltérő, utalva a különböző syndecanok eltérő funkciójára. A syndecan-1 knock-out egerek kevésbé fogékonyak mikrobiális fertőzésekre (90). Mint kiderült, tüdőben a levágódott syndecan-1 ektodomének elősegítik a *Pseudomonas aeruginosa* fertőzés kialakulását (91). A

syndecan-1 hiányos egerek mindemellett kevésbé hajlamosak bizonyos daganatokra - erről a következő fejezetben lesz még szó - és a sebgyógyulásuk lassabb (92). Syndecan-2 hiányos egeret még nem hoztak létre. A syndecan-3 hiányos egerekben az izomdisztrófia egyik formája alakul ki (93). A syndecan-3 legfontosabb szerepe talán az idegsejtek migrációjában lehet (94). A syndecan-4 kiütött egerekben lassabb a sebgyógyulás és az angiogenezis (95), és náluk is kialakul izomdisztrófia, bár enyhébb mértékben, mint a syndecan-3 null törzsben (93).

## **2.11 Syndecanok sokrétű szerepe a daganatok viselkedésében**

A syndecan-1 szerepe a daganatok kialakulásában, illetve fejlődésében tumortípusfüggő. Sok adatot találhatunk az irodalomban, melyek a tumorpromóter szerepére utalnak. Tüdőrákoknál az emelkedett syndecan-1 expresszió például rossz prognózissal és gyakran az agyi metasztázisok megjelenésével társul (53,96). Prostatarácok áttéteinél magasabb syndecan-1 expressziót találtak, mint az elsődleges tumorokban, ezenfelül a syndecan-1 pozitivitás ezeknél is rossz prognózist jelent (97,98). Syndecan-1 knock out egerekben kevesebb máj, tüdő és emlőtumor illetve limfóma alakul ki 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-es (DMBA) indukció hatására. Ez a proteoglikán tumorképzést és –fejlődést előmozdító szerepére utal (99). A fenti példákkal szemben, más daganatokkal kapcsolatos tanulmányok éppen a syndecan-1 daganatgátló szerepére mutatnak rá. Vastagbélráknál a syndecan-1 expressziója a differenciáltság elvesztésével párhuzamosan lecsökken (100,101), májrákoknál pedig a normális szövethez képest szintén csökkent expressziót találtak (102).

A syndecan-2-vel kapcsolatos eredmények is hasonló kettősséget mutatnak, mint ahogy azt a syndecan-1 esetében láthattuk. A normális prosztatahámhoz képest prosztatarácoknál magasabb a syndecan-2 expresszió és ez rossz prognózissal társul (103). A molekula fokozza vastagbélrák sejtek proliferációját és migrációját, valamint melanoma sejtek migrációját (104-106). Másfelől a syndecan-2 expressziója csökken oszteosarkómáknál (107), jelenléte pedig gátolja a Lewis tüdőráksejtek metasztatizáló képességét és oszteosarkóma sejtek migrációját (107-109).



## 2.12 A syndecanok szerepe a mesenchymalis tumorokban

Noha a malignus mesenchymalis tumorok, más néven szarkómák, vagy lágyrészsarkómák az összes rosszindulatú tumornak nem több, mint 1%-át képviselik, mégis egy rendkívül heterogén csoportot alkotnak. Osztályozásukhoz a citogenetikai, illetve a molekuláris biológiai markerek vizsgálata elengedhetetlen (110).

A mesenchyma egy korai, differenciálatlan embrionális szövetfeleség. A felnőttek összes kötő- és támasztószövet típusa ebből fejlődik, csakúgy, mint az izomszövet, a véredények és a húgy- és ivarszervek. Születéskor a köldökzsinórban, felnőtt korban pedig csak a fogpulpában található mesenchymalis szövet. A mesenchymát morfológiai szempontból igen hasonló, kis orsó alakú sejtek építik fel, amelyek a mesoderma hám jellegű szövetéből kivándorolva nyúlványokat képeznek, melyeken keresztül kapcsolatba kerülnek egymással, ezzel egy hálózatos szerkezetet hozva létre. Jellemzőjük az, hogy specializálatlanok és - szemben a hám jellegű sejtekkel - jó a migrációs készségük.

A mesenchyma sejtekhez hasonló, multipotens sejteket felnőtt egyének különböző szöveteiből (mint például csontvelőből) is lehet nyerni. Ezek a mesenchymalis őssejtek (MSCs), amelyek megfelelő körülmények között csont-, izom-, zsír- vagy porcsejteké differenciálódhatnak (111). Egyes elképzelések szerint a szarkómák ilyen mesenchymalis őssejtekből jöhetnek létre (112)

Egyes lágyrész tumorokban jelen van a syndecan-1. Immunhisztokémiával a megszokott sejtfelszíni eloszlás mellett némelyik típusban citoplazmás jelölődése is megfigyelhető (113). A malignus mesotheliománál is ez a helyzet. Itt a syndecan-1 expressziója a hám jellegén kívül még a beteg hosszabb túlélésével is társul (114). Ha epiteliális jellegű, differenciált mesothelioma sejteket EGF ill. IGF1 növekedési faktorokkal kezelnek, akkor azok fibroblaszt alakot öltenek, miközben a syndecan-1 és -2 expresszió lecsökken bennük (115). A B6FS fibroszarkóma sejtvonalon a syndecan-1 túltermelése a proliferáció gátlását (116), és a migrációs készség csökkenését okozza (117).

A fentiek alapján tehát joggal feltételezhetnénk, hogy a syndecan-1 a mesenchymalis tumorok malignitását csökkenti, az alábbi példák azonban cáfolják ezt.

Az egészséges csont syndecan-1 negatív, míg a benignus és a malignus csonttumороk gyakran pozitívak (118). A HT-1080 fibroszarkóma sejtvonal szolgáltatja a másik ellenpéldát. Ezekben a sejtekben a syndecan-1 túltermelés a proliferációs és a metasztatizáló képesség fokozódásához vezet (119). Azt tehát ki lehet jelenteni, hogy a syndecan-1 hatása itt is sejttípusfüggő, vagyis ahogy a karcinómáknál már láthattuk, úgy a mesenchyma eredetű tumorok is megoszlanak a molekula malignitásra gyakorolt hatása tekintetében.

Ugyanez a kijelentés a többi syndecan típusra is érvényes. A syndecan-2 például fokozza a HT-1080 fibroszarkóma sejtek migrációs képességét (120), ezzel szemben oszteoszarkómában alacsonyabb az expressziója a normális csontszövet oszteoblasztjaihoz és oszteocitáihoz képest. A syndecan-2 ebben a daganatban proapoptotikus hatással bír (107).

Manapság a myeloma multiplex diagnózisához a syndecan-1 kimutatását már a klinikai gyakorlatban rutinszerűen alkalmazzák. Ennél a tumornál a szérumban mért szolúbilis syndecan-1 nagy mennyisége rossz prognosztikus tényező (121,122). Jelenleg preklinikai vizsgálatok zajlanak annak eldöntésére, hogy a syndecan-1 lehet-e terápiás célpont ennél a tumornál (123).

### **2.13 A felnőttkori fibroszarkóma**

A felnőttkorban kialakuló fibroszarkóma egy malignus, mesenchymalis tumor, amely a szarkómák 1-3%-át teszi ki. A fibroszarkómák fájdalommentes tumorok, makroszkópos megjelenésükben jól körülírt, fehér vagy barnás csomók. Szöveti metszeteiken legtöbbször orsó alakú tumorsejtek figyelhetők meg, nagy sötéten festődő sejtmaggal és eozinofil citoplazmával. A sejtek gyakran széles kötegekbe rendeződnek. Főleg a tüdőbe, illetve az axiális csontokba (koponya, állkapocs, gerinc és bordák) adnak áttétet, ritkábban nyirokcsomókba. A betegek 9-63%-ában alakul ki metasztázis, az öt éves túlélés 39-54%. A rossz prognózis jelei a sejtmagvak nagy mérete, bazofíliaja, a többmagvú sejtek előfordulása, a nekrozis kialakulása, a magas cellularitás, illetve ha kevés / minimális mennyiségű kollagén figyelhető meg a sejtek között (124).

## 2.14 A HT-1080 fibroszarkóma sejtvonala

A sejtvonala egy 35 éves fehér férfi tumorából származik, amely az acetabulum mellett alakult ki. A biopsziát 1972 júliusában vették, a beteg három hónappal később, még az operáció előtt meghalt anélkül, hogy sugár- vagy kemoterápiában részesült volna. Nem végeztek boncolást, de klinikai bizonyítékok utaltak a kiterjedt metasztázisok jelenlétére. A biopszia szövettani diagnózisa gyengén differenciált fibroszarkóma volt. A primer tumor igen sejtgazdag volt, főként megnyúlt, ritkábban kerekded tumorsejtekből állt, kevés sejtközötti állománnyal. A tumor betört az acetabulum porcba is. Legfeltűnőbb jellegzetessége a pleiomorf- illetve a nagy sejtmagok és a gyakori mitózisok voltak. A tumor sok limfocitával volt infiltrálva. A hisztopatológiai megjelenése – az akkori kategóriák szerint – egy nagy malignitású, pleiomorf, anaplasztikus fibroszarkómának felelt meg. A biopsziából primer tenyészetet hoztak létre, amelyben a negyedik napon viszonylag kevés fibroblasztot lehetett megfigyelni a nagy mennyiségű, kerekded tumorsejtek kolóniái között, előbbiektől már a második passzázsra sikerült megszabadulni. További passzázsok után a sejt kultúrában nagyszámú, soksejtmagvas óriássejt is látható volt, mégis, elsősorban a kerekded, illetve a kissé megnyúlt sejt típusok domináltak. A sejtek a konfluencia elérése után több rétegben is nőttek, és mikrotumorokat, kis göböket formáltak. Elektronmikroszkóppal a hosszúkás és kerekded sejtek ultrastruktúrájában nem lehetett különbséget találni. Mindkettőnél a sejtmagok szabályos kerekdedek vagy oválisak, a citoplazmában kevés sejtszervecskével, kevés durva felszínű endoplazmás retikulummal (RER), viszont sok szabad riboszómával. Mikrofibillumokat csak a sima sejt felszín közelében lehetett látni. Víruspartikulumokat nem találtak elektronmikroszkópiával.

Citogenetikai elemzéssel a 9. passzázs után 46 kromoszómát számoltak, de gyakori volt a pszeudoploidia is. A 46 kromoszómájú sejtek 80%-ának átrendeződött a kariotípusa. Ezek mindegyike egy extra C-csoport-szerű szubtelocentrikus kromoszómát hordozott, egy B-csoport-szerű kromoszómája pedig hiányzott. A sejtek felében több, vagy kevesebb volt a kromoszómaszám 46-nál. A mérések alapján a sejtek duplázódási idejét 26 órában állapították meg (125).

### 3 Célkitűzések

Munkám elsődleges célja az volt, hogy tisztázza a syndecan-1 szerepét egy mesenchymalis eredetű tumorsejtvonal viselkedésében, különös tekintettel a proliferációra és a motilitásra. A molekula hatásmechanizmusába kétféle módon kívántunk betekintést nyerni. Egyfelől az ektodomén szerepét tisztázva, másrészt a syndecan-1 által befolyásolt jelátviteli utak vizsgálatával. Másodlagos célként a többi syndecan hatását, illetve a különböző syndecanok közötti funkcionális kapcsolatok mibenlétét kívántuk megismerni, tisztázni.

A kérdések megválaszolásához az alábbi kísérleteket terveztük meg:

1. Tanulmányozni a rekombináns syndecan-1 hatását a HT-1080 fibroszarkóma sejtvonal proliferációjára és motilitására, az eredményeket *in vivo* egérmodellben is igazolva.
2. A syndecan-1 ektodoménjének, ill. sheddingjének szerepét vizsgálni a syndecan-1 működésében.
3. A syndecan-1 hatásának háttérében álló jelátviteli utak vizsgálata molekuláris biológiai módszerekkel.
4. A syndecan-2 és a syndecan-4 túltermelés proliferációra és migrációra gyakorolt hatásának vizsgálata.
5. A syndecan-1 és a syndecan-2 között feltételezhető kapcsolat kísérletes jellemzése.

## 4 Módszerek

### 4.1 Felhasznált vegyszerek

Az I. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetben használt általános laboratóriumi vegyszereket a Merck Kft-től szereztük be. Ezen felül a dizertációmban előforduló speciálisabb reagensek eredete az alábbi felsorolásban látható:

RPMI-1640 tápfolyadék (Sigma-Aldrich, R8758)

FBS fetal bovine serum (Sigma-Aldrich, F4135),

FuGENE 6 transzfektáló reagenst (Roche, 11814443001)

Blaszticidin (Invitrogen, R210-01),

Geneticin (Sigma Aldrich, A1720)

SRB szulforodamin B (Sigma-Aldrich, A1720)

mátrigél (Sigma-Aldrich, E1270)

Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich P1860)

Bradford reagens (BioRad, 500-0006)

ECL: Super Signal West Pico Chemoluminescent Substrate (Pierce, 34080)

Tejpor: Blotting Grade Blocker Non-Fat Dry Milk (BioRad, 170-6404)

Tween-20 (Sigma-Aldrich, P5927)

Általánosan használt oldatok összetétele:

Foszfát pufferelt sóoldat (PBS): 170 mM NaCl, 33,5mM KCl, 18,4mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
76,6mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, pH = 7,4

Tris pufferelt sóoldat (TBS): 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH = 7,5

TBST (TBS + 0,05% Tween 20)

**2 táblázat.** Felhasznált elsődleges ellenanyagok és hígításai

<b>Antigén</b>	<b>Faj</b>	<b>Klón / azonosító</b>	<b>Módszer</b>	<b>Gyártó</b>	<b>Kat. sz.</b>	<b>Hígítás</b>
GFP	egér monoklonális	7.1; 13.1	IF	Roche	1 814 460	1:200
syndecan-1 ektodomén	egér monoklonális	B-B4	IF	AbD Serotec	MCA681	1:100
syndecan-1 ektodomén	egér monoklonális	B-B4	FACS	AbD Serotec	MCA681A647	1:10
syndecan-1 citopl. domén	kecske poliklonális	C-20	IF	Santa Cruz	Sc-7099	1:100
syndecan-2	kecske poliklonális	L-18	IF	Santa Cruz	sc-9492	1:100
syndecan-2	nyúl poliklonális	ZMD.308	WB FACS	Invitrogen	36-6200	1:500 1:50
syndecan-2	nyúl poliklonális	M-140	FACS	Santa Cruz	sc-15348	1:100
cyclin-E1	egér monoklonális	Ab-5 13A3	IF	Lab Vision	MS-1060	1:100
CDK2	nyúl poliklonális	-	WB	Sigma	C5223	1:1000
pRb(T373)	nyúl monoklonális	EP821Y	WB	Abcam	ab52975	1:2000
GAPDH	egér monoklonális	FF26A/F9	WB	AbD Serotec	MCA2427	1:2000
p44/42 MAPK	nyúl poliklonális	-	WB	Cell Signaling	9102	1:500
pp44/42 MAPK (T202/Y204)	nyúl monoklonális	-	WB	Cell Signaling	4370	1:500
p38 MAPK	nyúl poliklonális	-	WB	Cell Signaling	9102	1:100
pp38 MAPK	nyúl monoklonális	-	WB	Cell Signaling	4370	1:100
Ets-1	nyúl poliklonális	H-20	WB	Santa Cruz	Sc-350	1:250

IF: Immuncitokémia, immunhisztokémia

WB: Western blot

**3. táblázat.** Felhasznált másodlagos ellenanyagok és hígításaik

<b>Ellenanyag és jelölése</b>	<b>Faj</b>	<b>Módszer</b>	<b>Gyártó</b>	<b>Kat. sz.</b>	<b>Hígítás</b>
Anti-egér Alexa Fluor 555	szamár	IF	Invitrogen	A31570	1:200
Anti-kecske Alexa Fluor 555	szamár	IF	Invitrogen	A21432	1:200
Anti-nyúl HRP	kecske	WB	DakoCytomation	P0448	1:2000
Anti-egér HRP	kecske	WB	DakoCytomation	P0447	1:2000
Anti-nyúl CY5	szamár	FACS	Jackson ImmunoResearch	211-172-171	1:100

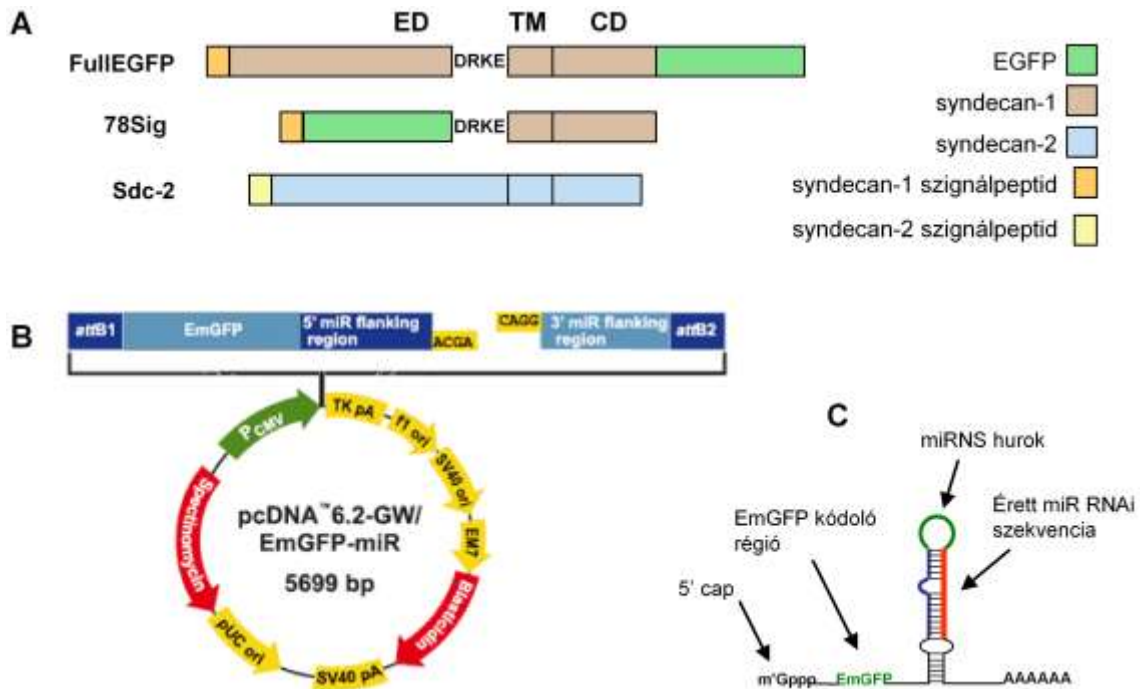
IF: Immuncitokémia, immunhisztokémia

WB: Western blot

**4.2 Plazmid konstrukciók**

A túlexpresszáltatási kísérletekhez a syndecan konstrukciókat Dr. Szilák László klónoztta (Szilák Labor Kft.) kontroll vektornak a Zöld Fluoreszcens Fehérjét (enhanced green fluorescent protein, EGFP) kódoló alapvektort (pEGFP-N1, BD Biosciences, Clontech) használtuk. A FulLEGFP plazmidnál a teljes hosszúságú syndecan-1 cDNS 3' végéhez volt ligálva az EGFP cDNS. A 78Sig esetében a létrejövő rekombináns fehérje felépítése a következő: az N-terminálison a szignálpeptidet az EGFP követi, majd a syndecan-1 csonkolt vázfehérjéje, melynek ektodoménje a négy membránproximális DRKE aminosavak kivételével hiányzik. A Sdc-1, Sdc-2 és a Sdc-4 plazmidok a teljes hosszúságú syndecan-1, -2 és -4-et kódolják EGFP nélkül (7. ábra A).

A géncsendesítéses kísérletekhez használt S1miRNA és S2miRNA plazmidok syndecan-1 ill. -2 specifikus mikro-RNS-t kódolnak (4. táblázat). A BLOCK-iT RNAi Designer (Invitrogen by Life Technologies) ingyenes programot használtuk a mikroRNS kódoló inzertek tervezéséhez. A megtervezett és leszintetizált forward

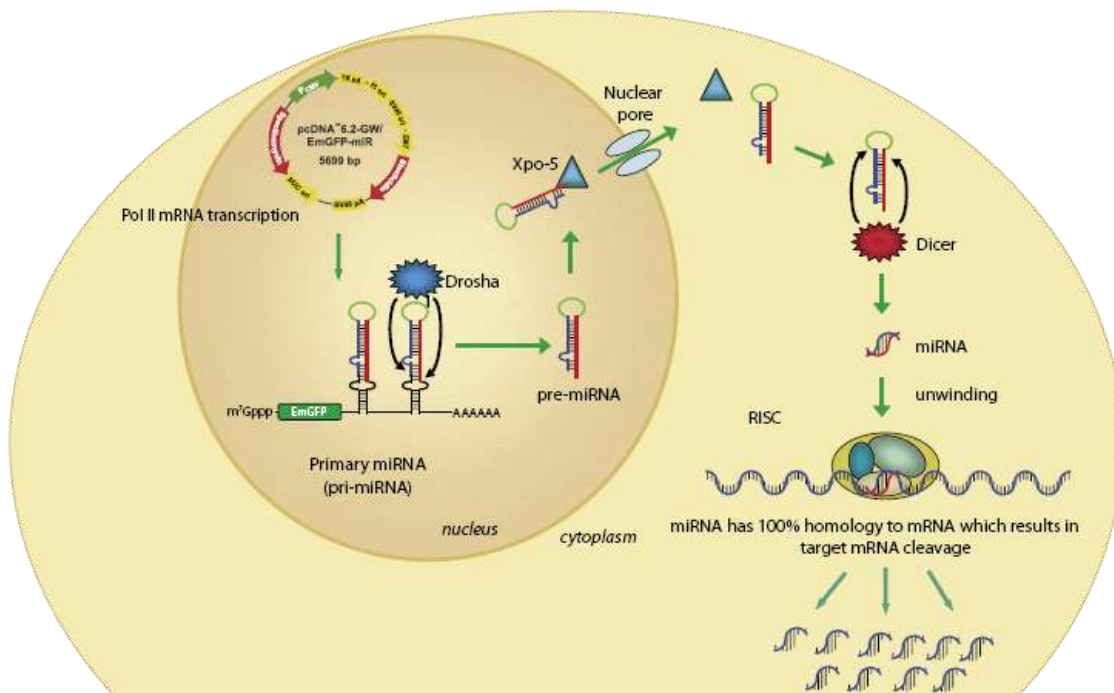


**7. ábra. Plazmid konstrukciók.** (A) Az overexpressziós kísérletekhez használt plazmidok fehérjetermékei. ED: ektodomén, TM: transzmembrán domén, CD: citoplazmás domén. (B) A géncsendesítéshez használt linearizált Block-iT<sup>TM</sup> pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR alapvektor áttekintő térképe és a klónozóhely környezete felnagyítva. (C) A Block-iT<sup>TM</sup> pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR vektorról átíródó primer mikro-RNS szerkezeti sajátosságai.

és reverz szálakat összeanellálásuk után a linearizált Block-iT<sup>TM</sup> pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR (Invitrogen) expressziós vektorba (7. ábra B) klónoztuk a gyártó munkautasításai szerint (BLOCK-iT<sup>TM</sup> Pol II miR RNAi Expression Vector Kit with EmGFP). A géncsendesítéses kísérletekhez negatív kontrollnak a  $\beta$ -D-Galaktózidáz specifikus mikro-RNS kódoló LacZ-miR vektort használtuk, melyet a gyártótól vásároltunk. A mikro-RNS kódoló plazmidokról egy speciális, primer mikro-RNS íródik át (pri-miRNA) (7. ábra C), amely minden konstrukciónál egy ugyanolyan 5' cap – azaz sapkával – kezdődik, az EGFP kódoló szakaszban folytatódik, majd egy önmagával hurkot képező pre mikro-RNS (pre-miRNA) szakaszban folytatódik. Ezen a szakaszon belül található a target mRNS egy 20 nukleotidos szakaszával komplementer, és egy vele azonos szekvencia (7. ábra C piros és kék színnel). Lényegében nekünk csak ezt a két szakaszt kellett megterveznünk és klónoznunk a linearizált alapvektorba.



A mikro-RNS plazmidok transzfekciója után a sejtmagban átíródik róluk a pri-miRNA. A Drosha nevű nukleáz enzim kivágja belőle a pre-miRNA hurkokat. A pre-miRNA-kat az Xpo-5 fehérje szállítja a sejtmagból a citoplazmába, ahol a Dicer levágja róluk a hurkokat, ezzel érett mikro-RNS-t hozva létre (miRNA), amely a RISC komplex segítségével a target mRNS szétadarabolását okozza (8. ábra). Mivel a plazmid egy transzkriptumon kódolja a zöld fluoreszcens fehérjét és a mikro-RNS-t ezért a stabil transzfektánsok antibiotikus szelekciója után a zöld fluoreszcencia alapján a mikro-RNS expresszáló sejtek áramlási citométer készülékkel kiválogathatóak.



**8. ábra. A géncsendesítés mechanizmusa.** A mikro-RNS kódoló vektorról. A mikro-RNS plazmidokról átíródik a primer-miRNS. Egy primer mikro-RNS átíraton egy zöld fluoreszcens fehérjét kódoló szakasz és egy, vagy akár többféle pre-miRNA hurok is lehet, így egy plazmiddal egyszerre több target is csendesíthető. A Drosha nevű nukleáz enzim kivágja az átíratból a pre-miRNA-kat. A pre-miRNA-kat az Xpo-5 fehérje szállítja a sejtmagból a citoplazmába, ahol a Dicer levágja róluk a hurkokat, ezzel érett mikro-RNS-t hozva létre (miRNA), amely a RISC komplex segítségével specifikusan beköt a target mRNS-hez, annak szétadarabolását okozva. A pri-miRNA átíratban visszamaradó EmGFP szekvenciáról zöld fluoreszcens fehérje íródik át, így azok a sejtek, amelyekben a mikro-RNS átíródik, zölden fluoreszkálnak. (A gyártó ismertetőjéből vett ábra).

**4 táblázat.** A géncsendesítéshez használt mikro-RNS kódoló vektorok és célszekvenciáik a target mRNS-en.

Plazmid	Target szekvencia	NCBI Referencia Szekvencia	Target pozíció a ref. Szek-en
S1miRNA-a	CCGCAAATTGTGGCTACTAAT	NM_001006946.1	455-475
S1miRNA-b	ACCAAACAGGAGGAATTCTAT	NM_001006946.1	1298-1318
S2miRNA-a	GGGAGCTGATGAGGATGTAGA	NM_002998.3	789-809
S2miRNA-b	CGAAGAGGATACAAATGTGTA	NM_002998.3	990-1010
LacZ-miRNA	GACTACACAAATCAGCGATTT	-	-

### 4.3 Sejtkultúra és transzfecció

A HT-1080 nevű humán fibroszarkóma sejtvonalat (ATCC szám: CCL-121) RPMI-1640 tápfolyadékban 10% fetal bovine serum (FBS), és penicillin-streptomycin antibiotikumok mellett (rendre 100U és 100 µg/ml koncentrációban) tenyésztettük. A sejteket 75 cm<sup>2</sup>-es szövettenyésztő flakában (Sarstedt) tartottuk 5% CO<sub>2</sub>-nál 37°C-on. A médiumot hetente kétszer cseréltük, a sejtenyészetek mikoplazma mentességét pedig rendszeresen ellenőriztük PCR-es módszerrel (126).

Transzfeccióhoz, 3x10<sup>5</sup> HT-1080 sejtet szélesztettünk 9,6 cm<sup>2</sup> felületű, hat lyukú tenyésztőedénybe. A transzfecció oldat összeméréséhez antibiotikum- és szérumentes RPMI-1640 médiumot használtunk. Lyukanként 60 µl médiumhoz 2 µl FuGENE 6 transzfecció reagenst és 0,8 µg plazmid DNS-t mértünk, majd vortexelés után 15 percig inkubáltunk szobahőmérsékleten. Ezt az oldatot 800-900µl-re egészítjük ki szérum- és antibiotikummentes médiummal. A sejtekről eltávolítottuk a médiumukat, majd a transzfecció oldatot a sejtekre csepegtettük. Négy órás inkubálás után a transzfecció oldatot a szokványos tenyésztőmédiumra cseréltük. A transzfecció hatékonyság általában 60-70% volt.

Stabil sejtvonalak szelektálásához a transzfecciót követő első, vagy második napon -amikor már zölden fluoreszkáltak a sejtek- adtunk a transzfecció médiumához 400 µg/ml Geneticin antibiotikumot az expressziós vektorral

transzfektálás esetében, illetve géncsendesítő plazmidoknál 5 µg/ml Blastidicint. Általában a transzfektálást követő 15-20. napon lehetett először passzálni a kisselektálódott, stabil transzfektáns sejteket. A mikro-RNS kódoló plazmidokkal transzfektált stabil sejtek közül kiválogattuk a zölden fluoreszkálókat szorterezéssel, amihez BD FACSAria Flow Cytometer készüléket használtunk (BD Biosciences). A továbbiakban ezeken a szorterezett sejteken végeztük a kísérleteinket.

#### **4.4 Konfokális mikroszkópia**

Az élő sejteken a rekombináns fehérjék lokalizációjának meghatározásához, valamint egyes fluoreszcens immunhisztokémiák mikroszkópos vizsgálatához az MRC 1024 típusú konfokális lézermikroszkópot használtuk (Bio-Rad). A készülék Kr/Ar lézer fényforrással van ellátva. Az élő sejtes vizsgálatok esetében a sejteket mikroszkópos vizsgálathoz fedőlemezre növesztettük, majd a fedőlemezt sejtekkel lefelé tárgylemezre helyeztük, melyre előtte tenyésztőmédiomot cseppentettünk. A rekombináns fehérjéket az EGFP zöld fluoreszcenciája révén detektáltuk.

#### **4.5 Proliferáció vizsgálat**

A növekedési görbéket szulforodamin B (SRB) kolorimetriás esszével készítettem, melynek elvi alapja az, hogy a szulforodamin B nevű festék a tenyésztőedény aljához fixált fehérjékkel komplexet képez, amiből 10 mM Trissel felszabadítható. A kísérleteket 96 lyukú edényekben végeztem, melyekbe az összehasonlítható sejtekből lyukanként 5000 sejtet szélesztettem 200µl médiumban. A méréshez a sejteket fixálni kell, ezért annyi edényre kell párhuzamosan széleszteni a sejteket, ahány időpontban kívánjuk mennyiségüket vizsgálni. Naponta fixálunk egy edényt triklór-acetáttal (TCA) 1 órán át, 4°C-on 10%-os végkoncentrációban. A TCA ebben a koncentrációban csak a letapadt sejteket rögzíti az edény falához, a médiumban oldott fehérjék és lebegő sejtek még oldott fázisban maradnak. Fixálás után óvatosan csapvízzel ötször átmoszuk az edényt. Ezt szárítás követi, majd 1% ecetsavban oldott 0,4% SRB-vel festés 20 percen át, szobahőn. A nem megkötődött festéket 1%

ecetsavval mossuk ki, majd ismét szárítunk. Végül a mérés előtt lyukanként 150 $\mu$ l pufferezetlen, 10mM-os Trissel oldjuk ki a megkötődött festéket. Teljes kioldódás után Labsystem Multiskan készülékkel 570 nm-en mért abszorbancia a sejtek mennyiségével arányos. Azok a lyukak tekinthetők a vaknak, amelyekbe eredetileg csak médiumot töltöttünk.

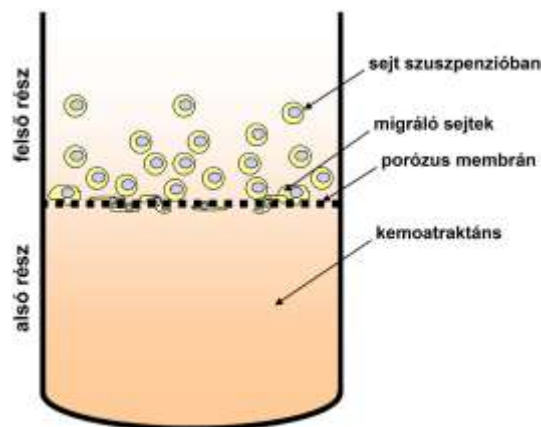
#### 4.6 Sejtmotilitás vizsgálat

A stabil transzfektánsok motilitását 48-lyukú Boydenkamrában vizsgáltuk (48-Well Micro Chemotaxis Chamber Neuro Probe, Gaithersburg, MD, USA, 9. ábra), melynek 48 darab vakon végződő alsó kamráit a felső kamráktól egy 8  $\mu$ m pórúsátmérőjű polikarbonát membrán választja el (Whatman, GE Healthcare Bio-Sciences Corp., Florham Park, NJ, USA). A kemotaxis vizsgálatához 10 % szérumos médiumban felvett sejtuszpenziót (50  $\mu$ l 10<sup>6</sup> sejt/ml) töltöttem a felső kamrába. Kemoattraktánsnak mátrigél fehérjéket használtam (ECM gel from Engelbreth-Holm-Swarm murine sarcoma, Sigma-Aldrich), amit előzőleg az alsó kamrába töltöttem 50  $\mu$ g/ml koncentrációban, szérummentes médiumban hígítva (10. ábra).



**9. ábra. A 48 mintás Boyden-kamra.** A képen a Boyden-kamra alsó- és felső egysége látható a köztes tömítő szilikonos gumilappal, valamint a két egységet összefogó csavarokkal. (Az illusztráció a gyártótól származik)

A kamra összeszerelésekor úgy töltöttem az oldott kemoattraktánst az alsó egység celláiba, hogy a folyadék meniszkusza enyhén kidomborodjon az alsó cellák nyílásából. A membránt egy precíz mozdulattal kellett ezekre a kidomborodó folyadékcseppekre helyezni, hogy elkerüljem a buborékképződést és a membrán oldalirányú elmozdulását a kemoattraktánsokon. A membránra került a tömítést szolgáló szilikongumi lap, amelyre pedig a felső egységet helyeztem (9. ábra). A sejtszuszpenziók betöltésekor a buborékok képződését elkerülendő a pipettát 45°-os szögben tartottam. Az így összeállított Boyden-kamrát 4 órán át inkubáltam 5 % CO<sub>2</sub> mellett 37°C-on, majd szétszedtem. A membránt a nem migrált sejtek eltávolítása után -20°C-os metanollal fixáltam. A migrált sejtek mennyiségét Toluidin-kék festés után denzitometriával mértem a Kodak Image Station 4000MM készülékkel (Carestream Health, Inc., Rochester, NY, USA) és a hozzá tartozó programmal.



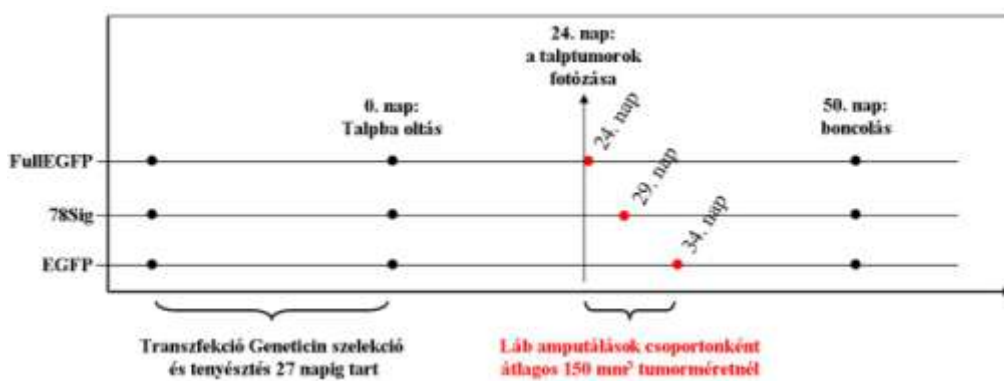
**10. ábra. A 48 mintás Boyden-kamra sematikus ábrája.** A képen a Boyden-kamra egy cellája látható egy kemotaxis vizsgálat közben. Az alsó egységben van a kemoattraktáns, ezt egy porózus polikarbonát membrán választja el a felső résztől, amelybe a vizsgálandó sejtek szuszpenzióját töltöttem.

#### 4.7 Állatkísérletek, tüdő metasztázis modell

Spontán tüdő metasztázisok fejlesztéséhez azt az egértalp modellt választottuk, amelyet Intézetünk állatházában Dr. Jeney András munkacsoportja már évek óta

alkalmaz. A HT-1080 sejteket immunhiányos SCID (severe combined immunodeficiency) egerek (CB17-Prkdc<sup>scid</sup> egértörzs) jobb talpába oltva azok a talpban egy elsődleges tumort alakítanak ki, majd pár héttel később megjelennek a tüdőáttétek is. Az elsődleges tumorokat az érintett láb amputálásával eltávolítják amikor a tumor eléri a 150 mm<sup>3</sup>-es térfogatot. Ez utóbbira a nekrotizáló talptumorok toxikus hatása, valamint a fertőzések elkerülése végett van szükség. Arra nem volt lehetőségünk, hogy mindhárom csoportnál azonos időpontban távolítsuk el a primer tumorokat, hiszen amikor a FullEGFP csoportban már nekrotizáltak, vérezttek a talptumorok, akkor a kontroll csoportban még éppen csak megeredtek.

Kísérleteink során az EGFP-vel, a FullEGFP-vel és a 78Sig plazmiddal transzfektált stabil sejtvonalakat oltottuk transzfektáns csoportonként 5-5 nőstény SCID egér egy-egy talpába, talpanként százezer sejtet. A talptumorok méretét digitális tolómérővel mértük két dimenzióban, majd a térfogatot ezek alapján, a következő formulával határoztuk meg:  $V = \pi/6 \cdot 1.63 (\text{hossz} \cdot \text{szélesség})^{3/2}$  (127). A FullEGFP csoportnál a 24., a 78Sig-nél a 29., míg az EGFP csoportnál a 34. napon amputáltunk ketamin-xilazinos altatásban. Az összes egeret megöltük az 50. napon (11. ábra), majd felboncolva a tüdőt formalinnal fixáltuk. A tüdők Hematoxilin-Eozin festett metszetein a metasztázisok területszázalékos arányát három véletlenszerűen választott metszési síkban határoztuk meg a Kodak Image Station 4000MM készülékkel és a hozzá tartozó programmal.



11. ábra. A tüdőmetasztázis egérmodell kezelési sémája.

#### 4.8 RNS izolálás, kvantitatív RT-PCR

A két napig növesztett stabil transzfektánsokból az RNeasy Mini Kit segítségével izoláltam össz RNS-t (Qiagen, Hilden, Germany). Az izolált RNS tisztaságát és mennyiségét az ND-1000 spektrofotométerrel mértem (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA). Az RNS integritását és méret eloszlását mikrokapilláris elektroforézissel határoztam meg az Experion RNS Chip és az Experion Automated Electrophoresis Station készülék segítségével (Bio-Rad).

Bizonyos gének mRNS-szintű expressziójának méréséhez kvantitatív reverz-transzkripció PCR-t alkalmaztam (RT-qPCR). A fentiek szerint izolált RNS mintákból cDNS átírást végeztem az M-MLV Reverse Transcriptase kit segítségével (Invitrogen, Life Technologies), a gyártó munkautasításait követve. A reakció összemérésének adatait az 5. táblázat tartalmazza.

5. táblázat.. A reverz transzkripció metodikája

reagens	Térfogat (μl)
random hexamer (3 μg/ml)	1
RNS (0,1 μg/μl)	10
dNTP mix (10 mM each)	1
65°C - 5 perc, majd jégen lehűtjük	
5x First Strand Buffer (250 mM Tris-HCl pH 8,3; 75 mM KCl; 15 mM MgCl <sub>2</sub> )	4
DTT (0,1 M)	2
RnaseOUT™ 40 U/μl	1
M-MLV RT 200 U/μl	1
	Σ 20 μl
25°C – 10 perc 37°C – 50 perc 70°C – 15 perc	

Az RT-qPCR vizsgálatokat a Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems by Life Technologies) segítségével és 1 µM végkoncentrációban alkalmazott saját tervezésű primerekkel végeztem (6. táblázatban). A SDC1-CD és SDC1-ED primerpárok a syndecan-1 cDNS citoplazmás, ill. ektodomént kódoló szakaszára specifikusak, míg a SDC2 és az EGFP primerpárok a syndecan-2, ill. az EGFP cDNS-re specifikusak. A PCR reakciókat 20 µl végtérfogatban, 20 ng cDNS templáttal végeztem, háromszori ismétléssel, az ABI Prism 7000 Sequence Detection System készülékkel (Applied Biosystems by Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Az alább részletezett kétlépéses PCR protokollnál a 2. és a 3. lépéseket 40x ismételtem.

1. 95°C 10 perc
2. 95°C 15 másodperc
3. 60°C 1 perc

A reakciógörbék elemzésével az ABI Prism 7000 szoftver a  $C_T$  értékeket adta meg. Az expressziós értékeket relatív kvantifikálással számoltam a  $2^{-\Delta\Delta CT}$  formulával. Referencia génnek a GAPDH-t választottuk, melynek mennyiségét nem saját primerekkel, hanem egy TaqMan génexpressziós esszével mértük (Applied Biosystems, Life Technologies).

**6. táblázat.** A munkához felhasznált, saját tervezésű primerek szekvenciája és felismerőhelyük pozíciója.

primerpár neve:	primer szekvencia (5'-3' orientáció) F: forward primer, R: reverse primer	primer pozíció a Ref. Seq-en	NCBI Referencia Szekvencia (Ref. Seq.)
EGFP	F: ATCGAGCTGAAGGGCATCG R: CCTTGATGCCGTTCTTCTGCT	367-385 467-487	gb GU112756.1
SDC1-ED	F: GCTGACCTTCACACTCCCA R: CAAAGGTGAAGTCCTGCTCCC	908-927 1011-1031	NM_001006946.1
SDC1-CD	F: GAAGAAGAAGGACGAAGGCAG R: CCTCCTGTTTGGTGGGC	1225-1245 1294-1310	NM_001006946.1
SDC2	F: AATGGACCCAGCCGAAGAG R: CAGCAATGACAGCTGCTAGGAC	978-996 1051-1072	NM_002998.3



#### 4.9 Oligoarray vizsgálat

Az RNS mintákat a Cancer PathwayFinder Oligo GEArray (SABiosciences, Qiagen, OHS-033) oligoarray módszerrel is vizsgáltuk. A módszer lényegében egy nylon membrán, amelyre 117 gén DNS próbája van meghatározott pozíciókban felkötve. A vizsgált gének a sejtciklus kontrolljában, a DNS hibajavításban, az apoptózisban, a sejtöregedésben, a jelátvitelben, az angiogenezisben, a sejtadhézióban, a sejt migrációban, vagy a metasztázis folyamataiban vesznek részt (7. táblázat).

**7 táblázat.** A Cancer PathwayFinder Oligo GEArray által vizsgált gének funkció szerinti besorolása (a táblázat a gyártó által közzétett termékleírás alapján készült)

<b>Sejtciklus kontroll / DNS hibajavítás:</b>
ATM, BRCA1, CCNE1 (cyclin E1), CDC25A, CDK2, CDK4, CDKN1A (p21Waf1), CDKN2A (p16Ink4), CHEK2 (chk2 / Rad53), E2F1, MDM2, RB1, S100A4, TP53 (p53).
<b>Apoptózis és sejtöregedés:</b>
APAF1, BAD, BAX, BCL2, BCL2L1 (bcl-X), CASP8, CFLAR (CASPER), FAS, GZMA, HTATIP2, TERT (telomeráz), TNFRSF1A (TNF-a receptor), TNFRSF10B (DR5), TNFRSF25 (DR3).
<b>Jelátviteli molekulák és transzkripció faktorok:</b>
AKT1, ERBB2, ETS2, FOS, JUN, MAP2K1 (MEK), MYC, NFKB1 (NFκB), NFKBIA (IκBα), PIK3R1 (PI3K p85α), RAF1, SNCG.
<b>Adhézió:</b>
ITGA1 (integrin α1), ITGA2 (integrin α2), ITGA3 (integrin α3), ITGA4 (integrin α4), ITGAV (integrin αV), ITGB1 (integrin β1), ITGB3 (integrin β3), ITGB5 (integrin β5), MCAM, MTSS1, PNN, SYK, EPDR1.
<b>Angiogenezis:</b>
ANGPT1 (angiopoietin-1), ANGPT2 (angiopoietin-2), COL18A1 (endostatin), FGFR2, IFNA1 (IFNα), IFNB1 (IFNβ), IGF1, IL8, PDGFA, PDGFB, TEK (tie-2), TGFB1, TGFB1 (ALK-5), THBS1 (thrombospondin-1), TNF, VEGFA.
<b>Invázió és angiogenezis:</b>
MET, MMP1 (kollagenáz-1), MMP2 (zselatináz A), MMP9 (zselatináz B), MTA1, MTA2, NME1, NME4, PLAU, PLAUR, S100A4, SERPINB5 (maspin), SERPINE1 (PAI1), TIMP1, TIMP3, TWIST1.

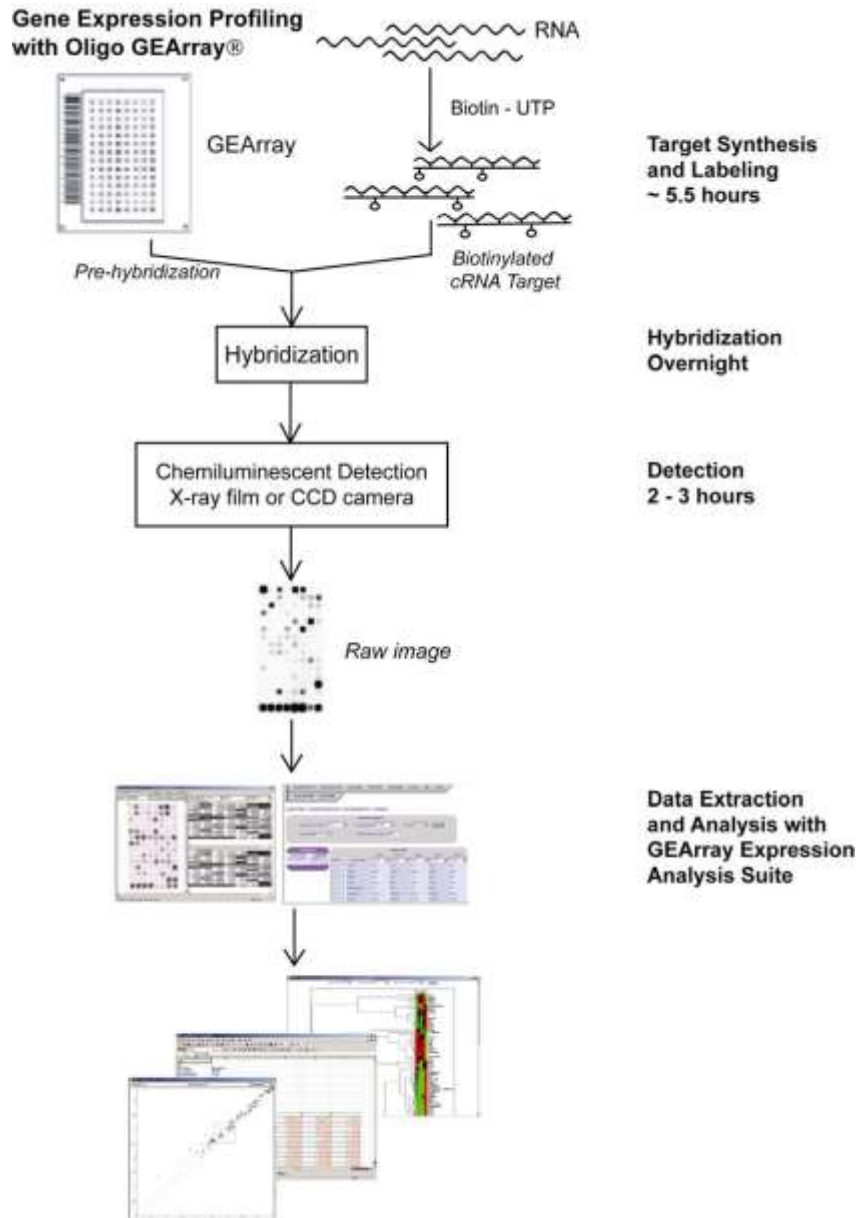
#### 4.9.1 cRNS szintézis és jelölés

A stabil transzfektánsok RNS mintáit a gyártó utasításai szerint a True-Labeling 2.0 Kit segítségével (SABiosciences) a következő módon biotináltuk:

Mindegyik RNS minta 2,5 µg-ját átírtuk cDNS-re, majd az elkészült cDNS mintákból *in vitro* transzkripcióval cRNS-t készítettünk. Az utóbbi lépéshez biotinált UTP-t használtunk, így a folyamat végére a cRNS már biotinált volt. Az *in vitro* transzkripció segítségével ugyanakkor a kiindulási anyagunk fel is amplifikálódik, miközben a különböző transzkriptek mennyiségi aránya elvileg változatlan marad (12. ábra).

#### 4.9.2 Hibridizáció

A jelölt RNS mintákat egy prehibridizációs lépés után egy-egy oligoarray membránra hibridizáltam, majd ugyancsak a gyártó útmutatásai alapján a megkötött RNS mennyiségét a sztreptavidinhez kötött alkalikus-foszfátáz enzim és egy kemolumineszcens szubsztrát (CDP-Star) segítségével mértem. Az egyes próbáknál a jelerősség tehát a specifikusan hozzákötődött RNS mennyiségével arányos. A membránokat az előhívás után ugyancsak a Kodak Image Station 4000MM készülékkel fényképeztük le, majd a fotókat a SABiosciences cég GEArray Expression Analysis Suite programjával denzitometráltuk és elemeztük (12. ábra). Az analízishez többféle normalizálási módszert használtunk és csak azokat a génexpressziós eltéréseket tekintettük elfogadhatónak, amelyek többféle normalizálással is szignifikánsnak mutatkoztak.



12. ábra. Az oligoarray vizsgálat metodikája vázlatosan. (a gyártó útmutatójából)

#### 4.10 Fehérje extrakció

A stabil transzfektánsokat, ill. a fagyasztott, majd folyékony nitrogénben porított talptumороkat fehérje lízispufferben vettük fel (20 mM Tris pH=7.5, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% Triton-X100, 2 mM nátrium ortovanadát, 10 mM NaF, 0.5% Protease Inhibitor Cocktail a Sigma-Aldrich cégtől). A sejt kultúrákat PBSsel mostuk, majd 1 ml

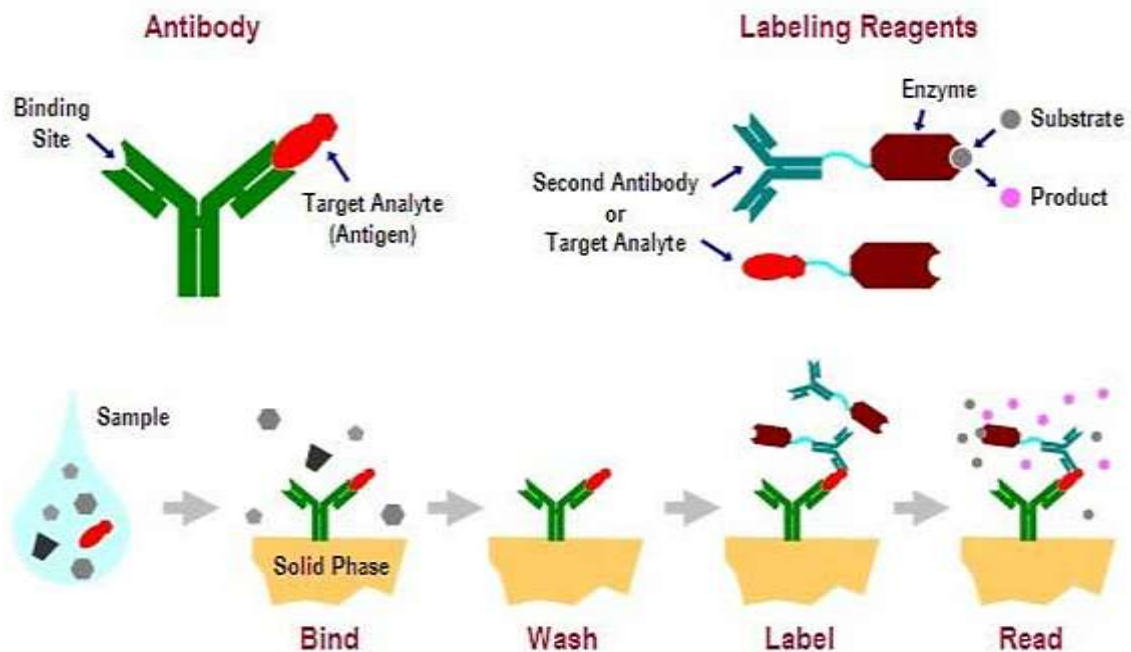
fehérje lízispuffer hozzáadása után sejtkaparóval szedtük fel a sejteket és kevertük a lízispufferrel össze. A lizátumokat eppendorf csövekbe tettük át és rövid szonikálás után 30 percig inkubáltuk jégen. Az esetleg megmaradt sejttörmelékeket centrifugálással távolítottuk el (15000 g, 20 perc), a felülúszókban a fehérje koncentrációt pedig Bradford módszerrel határoztuk meg (128), BSA koncentráció sort használva standardként. A fehérje extraktumokat -70°C-on tároltuk.

#### 4.11 Western Blot

A fehérje extraktumokban bizonyos fehérjék mennyiségét Western blot módszerrel határoztuk meg. Az extraktumokhoz 1/4 térfogat 5x-ös Laemli mintapuffert kevertünk (1250mM Tris pH6,8, 50% Glicerín, 5% Na-lauril-szulfát, 0,05% brómfenol-kék (telített oldatból 0,05v/v %), 7,5%  $\beta$ -merkaptó etanol), 5 percig 95°C-on inkubáltuk majd jégre raktuk. Az így denaturált mintákat 10 %-os poliakrilamid gélekre vittük fel (zsebenként 20  $\mu$ g összfehérje mennyiségben), majd 30 percen át 200 V-os feszültség mellett futtattuk. Az elválasztott mintákat a gélből polyvinylidene fluoride (PVDF) membránra vittük át (Millipore, pórusátmérő 0,45  $\mu$ m) 16 órás, 4°C-os és 75 mA-es blottolással. A művelet hatékonyságát a membránok Ponceau festésével ellenőriztük. Az immunjelölés előtt TBS pufferben oldott 3 %-os tejpor oldattal (Bio-Rad) blokkoltam a membránokat egy órán át. Az elsődleges ellenanyagokkal 4°C-on, egy éjszakán át inkubáltam (elsődleges ellenanyagok listája a 2. táblázatban). A membránokat 5-ször mostam TBS pufferben oldott 0,5 % Tween-20 oldattal, majd az elsődleges ellenanyag típusának megfelelő, HRP konjugált másodlagos ellenanyaggal inkubáltam 1 órán át (Dako, Glostrup, Denmark). A jeleket a Super Signal West Pico kemolumineszcens szubsztráttal hívtam elő (Pierce) és a Kodak Image Station 4000MM készülékkel dokumentáltam.

#### 4.12 CD138 ELISA

A syndecan-1 ektodomén detektálásához a Diaclone cég CD138 (Syndecan-1) ELISA KIT-jét használtam, amely egy szendvics ELISA (13. ábra). A 96 lyukú plate egy monoklonális ellenanyaggal van bevonva. Erre a rétegre kell rámérni a mintát 100 $\mu$ l térfogatban. Az elsődleges ellenanyag biotinált. Egy óra inkubálás után mosás következik (Labsystem Multiwash készülék), majd streptavidin-HRP hozzáadása. Félórás inkubálást ismét mosás követ és a 3,3',5,5' – tetramethylbenzidine substrate (TMB) rámérése. Az enzimreakciót 15 perc után kénsavval állítjuk le. A termék mennyisége fotometriásan detektálható 450 nm-en az abszorbancia mérésével.



13. ábra. A sandwich ELISA működési elve.. Forrás: 51protocol.com

A syndecan-1 shedding következtében levágódott ektodomén fragmentek a médiumba kerülnek, mennyiségüket a fent részletezett CD138 ELISA-val mértem. A stabil transzfektáns sejtkultúrák médiumait Centricon10 (Millipore) koncentráló centrifugacsövekkel töményítettük, annak érdekében, hogy bennük a syndecan-1

fragmentek koncentrációja az optimális mérési tartományba essen. A sejtek felszínéről nem levágódott syndecan-1 mennyiségét a sejtlizátumokból határoztam meg.

#### **4.13 Immuncitokémia, immunhisztokémia**

Immuncitokémiához lyukanként  $3 \times 10^5$  darab stabil transzfektáns sejtet szélesztettem 6-lyukú edényekbe, 24 x 24 mm-es üveg fedőlemezekre. A szélesztés után 24-48 órával a sejteket metanollal fixáltam (PBS-es mosás után 5 perc  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ -os metanol, majd acetonos öblítés, szárítás és  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ -on tárolás), vagy paraformaldehiddel (médiüm eltávolítás,  $4\text{ }^\circ\text{C}$ -os paraformaldehides fixálás 10 percig, PBS öblítés majd permeabilizálás 0,5 % Triton-x-szel). A talptumorminták esetében gyorsfagyasztás után fagyasztó mikrotómmal készítettünk  $15\text{ }\mu\text{m}$  vastag metszeteket, melyeket szintén  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ -os metanollal fixáltunk. Az így előkészített mintákat a fixálás után és az egyes lépések között is PBS-sel mostam (3 X 5perc), majd az aspecifikus kötődések megakadályozása végett PBS-ben oldott 3%-os BSA-val blokkoltam. Kétlépcsős immunhisztokémiát alkalmaztam. Az elsődleges ellenanyagot 1%-os BSA oldatba mértem, a mintákat egy éjszakán át  $4\text{ }^\circ\text{C}$ -on inkubáltam vele. A fluoreszcens festékekkel jelzett másodlagos ellenanyagokat 1:200 arányban hígítottam szintén 1%-os BSA oldattal, és szobahőmérsékleten, sötétben hagytam állni a mintákon fél órát. Fluoreszcens fedőanyaggal fedtem. A negatív kontrolloknál kihagytam az elsődleges ellenanyag, illetve a másodlagos ellenanyag ráakását, ami a másodlagos ellenanyag keresztreakciójának és az autofluoreszcencia lehetőségének kizárását szolgálja. A sejtmagokat 4'6-diamidin-2-fenilindol-dihidrokloriddal (DAPI), vagy propidium-jodiddal festettem meg. Ha többféle sejtvonalon végeztem egyszerre ugyanazt a jelölést, akkor a készítményeket ugyanazokkal a beállítással fotóztam, ezért várhatóan a fluoreszcens jel erőssége a kérdéses fehérje mennyiségével arányos.

#### 4.14 Tirozinkináz array

A transzfektánsokban a tirozin kináz receptorok foszforilációs profilját a Human Phospho-Receptor Tyrosine Kinase Array Kit segítségével vizsgáltuk (R&D Systems). Az array segítségével 42 különböző tirozin kináz receptor relatív foszforiláltságát lehet meghatározni egyszerre (8. táblázat). Lényegében egy nitrocellulóz membránból és az arra meghatározott elrendezésben felrögzített ellenanyag foltokból áll (mindegyik ellenanyagból két folt). A vizsgálni kívánt fehérje extraktumot a membránon inkubáljuk, közben a rajta található ellenanyagok megkötik a megfelelő tirozinkináz receptorokat. Mosást követően egy univerzális, HRP jelölt anti-foszfo-tirozin ellenanyaggal inkubáljuk a membránt, majd lumineszcens szubsztráttal hívjuk elő a jeleket. Természetesen minél nagyobb a mennyisége, és minél inkább foszforilált a mintában egy tirozin kináz, annál intenzívebb jelet detektálhatunk az ennek megfelelő foltból, amit a Kodak Image Station 4000MM készülékkel dokumentáltunk.

8. táblázat. A Human Phospho-Receptor Tyrosine Kinase Array Kit által vizsgált receptorok listája

Axl	EphA6	ErbB3	HGF R	PDGF R $\alpha$	Tie-2
Dtk	EphA7	ErbB4	IGF-I R	PDGF R $\beta$	TrkA
EGF R	EphB1	FGF R1	Insulin R	c-Ret	TrkB
EphA1	EphB2	FGF R2 $\alpha$	M-CSF R	ROR1	TrkC
EphA2	EphB4	FGF R3	Mer	ROR2	VEGF R1
EphA3	EphB6	FGF R4	MSP R	SCF R	VEGF R2
EphA4	ErbB2	Flt-3	MuSK	Tie-1	VEGF R3

#### 4.15 Áramlási Citometria (FACS)

A syndecan-1 és -2 expressziójának kvantitatív, fehérjeszintű vizsgálatához alkalmaztuk ezt a módszert. A sejteket tripszin nélkül, PBS-ben oldott 5 mM-os EDTA oldattal mobilizáltuk, majd 5 percen át jéghideg etanolban fixáltuk. A mintákat PBS-ben mostuk és 3% BSA-val blokkoltuk 37°C-on 30 percig, az ellenanyagok aspecifikus kötődését elkerülendő. A syndecan-1 kimutatásához az Alexa Fluor® 647 festékkel

konjugált monoklonális BB4 ellenanyaggal, míg a syndecan-2 detektálásához a jelöletlen M140 vagy a ZMD.308 ellenanyaggal (2. táblázat) inkubáltuk a sejteket egy órán át. Utóbbiaknál egy mosást is beiktattunk, amely után a megfelelő, Cy5 jelölt másodlagos ellenanyagot (3. táblázat) adtuk a mintához. A jelölt sejteket egy utolsó mosás után egy FACScalibur flow cytometer készülékkel (BD Biosciences) mértük le, mintánként 5000-10000 sejtet mérve.

#### **4.16 Statisztika**

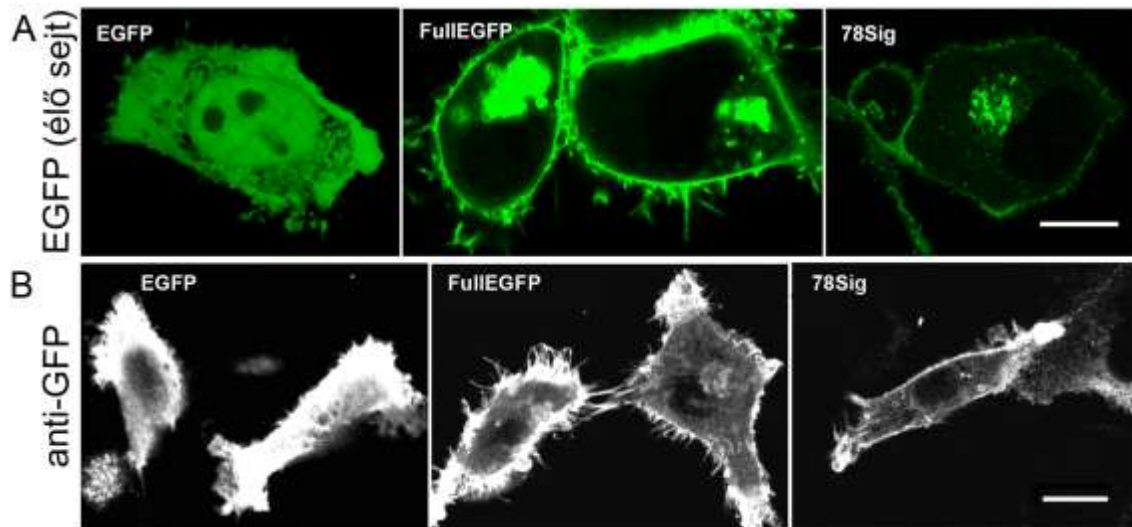
A statisztikai elemzésekhez az F-próbát követően Student-féle kétmintás t-próbát, vagy Mann-Whitney U-próbát használtunk. Azokat a különbségeket fogadtuk el szignifikánsnak, ahol a p érték kisebb volt 0,05-nél.



## 5 Eredmények

### 5.1 A syndecan-1 fúziós konstrukciók kifejeződnek, fehérje termékük pedig a sejtmembránba kerül

A rekombináns fehérjék jelenlétét és sejten belüli lokalizációját élő sejteken konfokális lézermikroszkóppal vizsgáltuk, kihasználva az EGFP autofluoreszcenciáját. Azt tapasztaltuk, hogy a transzfekció másnapján az EGFP a kontroll sejteknél a citoplazmában és a sejtmagban lokalizálódott, míg a FullEGFP és 78Sig sejteknél a zöld szignálok az endomembrán rendszerben és a sejtfelszínen voltak megfigyelhetők (14. ábra A).



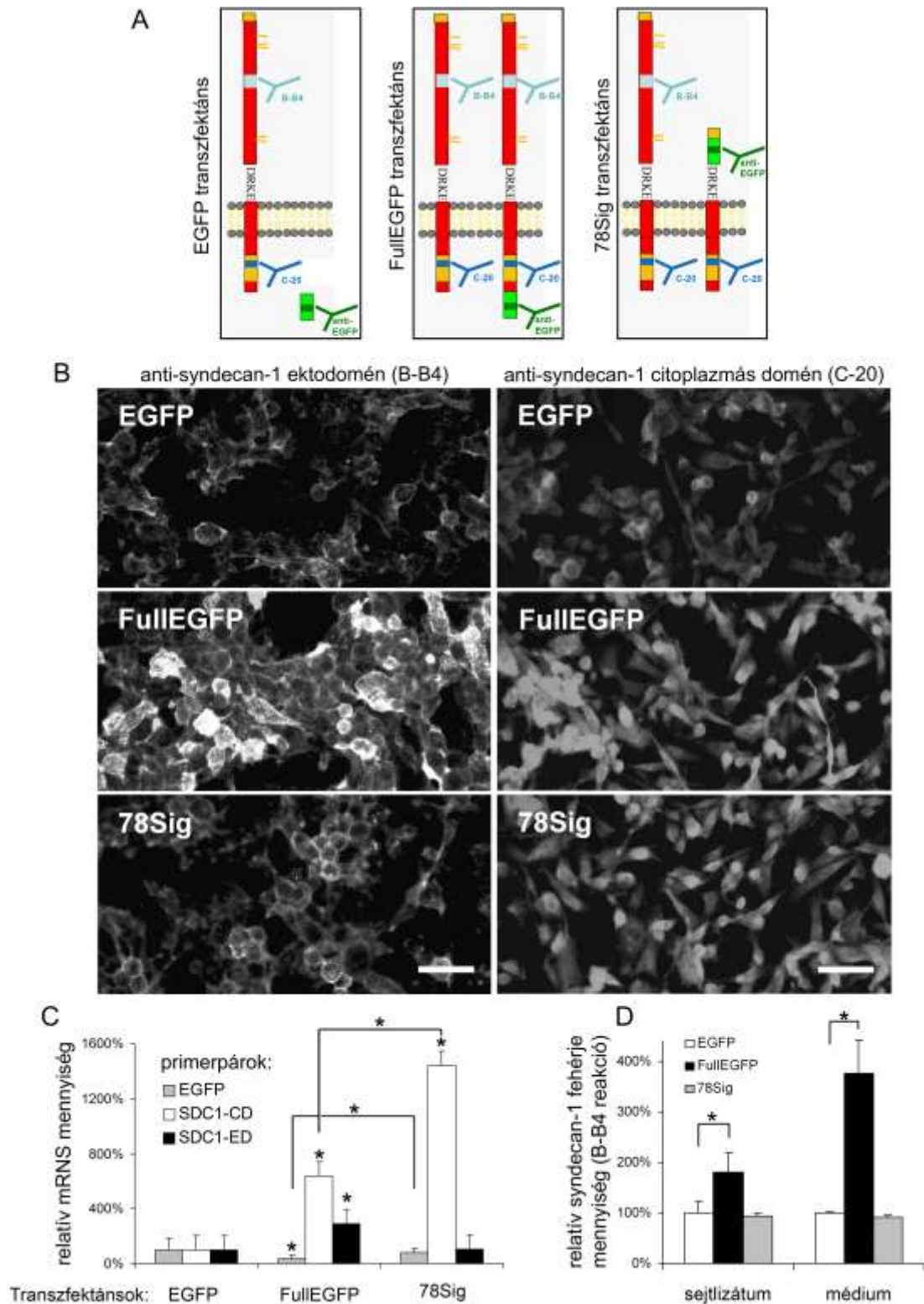
**14. ábra.** A rekombináns fehérjék kimutatása az EGFP fúziós fehérje segítségével. (A) A rekombináns fehérjék lokalizációja a transzfekciót követő napon. Az EGFP zöld fluoreszcenciáját konfokális lézermikroszkóppal detektáltuk élő, fedőlemezre növesztett sejteken. A kontroll alapvektorral transzfektált sejteken az EGFP a sejtmagban és a citoplazmában lokalizálódott, míg a FullEGFP és a 78Sig is a sejtfelszínen, illetve az endomembrán rendszerben lokalizálódott. Lépték: 10  $\mu\text{m}$ . (B) a transzfektánsok anti-GFP immunjelölése paraformaldehides fixálás után. A 78Sig sejteken is ugyanakkora intenzitású a sejtfelszíni jel, mint a FullEGFP-nél. Lépték: 10  $\mu\text{m}$

A csonkolt 78Sig esetében a fluoreszcens jelek intenzitása jóval alacsonyabb volt, mint a FullEGFP-nél. Mivel a zöld fehérje az előbbinél szokatlan módon a csonka syndecan-1 fehérje N-terminusán, az extracelluláris térben helyezkedik el, utóbbinál pedig intracellulárisan, ezért nem volt egyértelmű, hogy az alacsony jelintenzitás oka a csonkolt syndecan kisebb mennyisége, vagy pedig csökkent fluoreszkálóképessége. Ennek eldöntésére további immuncitokémiai vizsgálatokkal mutattam ki az EGFP-t (14. ábra B). A mintákon megfigyelhető volt ugyan a fixálás hatására a sejtek zsugorodása is, azonban az egyértelműen látható volt, hogy a 78Sig sejtek felszínén a jelintenzitás – azaz a rekombináns fehérje mennyisége - nem alacsonyabb, mint a FullEGFP-nél, vagyis a csonkolt fehérje hatékonyan kifejeződik, csak gyengébben fluoreszkál, mint a teljes hosszúságú változat.

## **5.2 A FullEGFP és a 78Sig transzfekciós hatékonysága, és a syndecan-1 expresszióra, ill. sheddingre gyakorolt hatása**

Hogy pontosan megismerjük a transzfekciók syndecan-1 kifejeződésére gyakorolt közvetlen hatását, a rekombináns- illetve az endogén syndecan-1 különböző doménjeit mutattuk ki mRNS és fehérje szinten.

Immuncitokémiával megjelöltük a transzfektánsokat a syndecan-1 ektodoménjére (B-B4) illetve citoplazmás doménjére specifikus (Santa Cruz C-20) ellenanyaggal (15. ábra A). Mindkét ellenanyag jelölte az EGFP transzfektánsokat, rámutatva, hogy a sejtvonal eredetileg is expresszálja a syndecan-1-et (a továbbiakban ez az endogén syndecan-1). Az előbbi ellenanyagnál metanol fixált sejteken tipikus sejtfelszíni jelölődést tapasztaltam (15. ábra B bal oldal), míg az utóbbiról paraformaldehides fixálás mellett ezt nem lehetett egyértelműen kijelenteni (15. ábra B jobb oldal). A kontroll EGFP sejtekhez viszonyítva a B-B4 ellenanyaggal csak a FullEGFP transzfektánsok jelölődtek erősebben, míg a citoplazmás doménra specifikus C-20szal a 78Sig sejtek is. Fontos hangsúlyozni, hogy a B-B4 által felismert epitóp a 78Sig fehérjetermékén nem található meg, a C-20-é viszont igen (15. ábra A). Ezek az immuncitokémiai eredmények arra utalnak, hogy a 78Sig, amelynek nincsen ektodoménje, nem befolyásolta az endogén syndecan-1 expresszióját.



**15. ábra.** A FullEGFP és a 78Sig syndecan-1 expressziójára és sheddingjére gyakorolt hatása. (A és B) A stabilan transzfectált HT-1080 sejtek immuncitokémiai jelölése syndecan-1 ektodóménre specifikus B-B4 ellenanyaggal metanol-fixált sejteken (B, bal oldal), ill. citoplazmás domén specifikus C-20 ellenanyaggal (B, jobb oldal), paraformaldehid fixált sejteken. Lépték: 50  $\mu$ m. (A) Mivel a 78Sig

konstrukció nem tartalmaz ektodomént, ezért az ektodomén kimutatásával ebben a transzfektánsban az endogén syndecan-1 expresszióját mérhetjük. A citoplazmás domén kimutatásával mind az endogén, mind a rekombináns syndecan-1 együtt detektálható. (C) A stabil transzfektánsok syndecan-1 és EGFP mRNS expressziója RT-qPCR-rel mérve, a citoplazmás domén régióra specifikus SDC1-CD és az ektodomén specifikus SDC1-ED primerpárokkal. Relatív kvantifikálás, GAPDH referenciagénnel. Az EGFP kimutatásával a plazmidok transzfekciós hatékonyságára lehet következtetni. (D) Syndecan-1 fehérjemennyiségek a sejtízátumban és a médiumban a CD138 ELISA-val mérve, amely egy ektodomén specifikus ellenanyaggal mutatja ki a syndecan-1 mennyiségét. \* $P < 0.05$ .

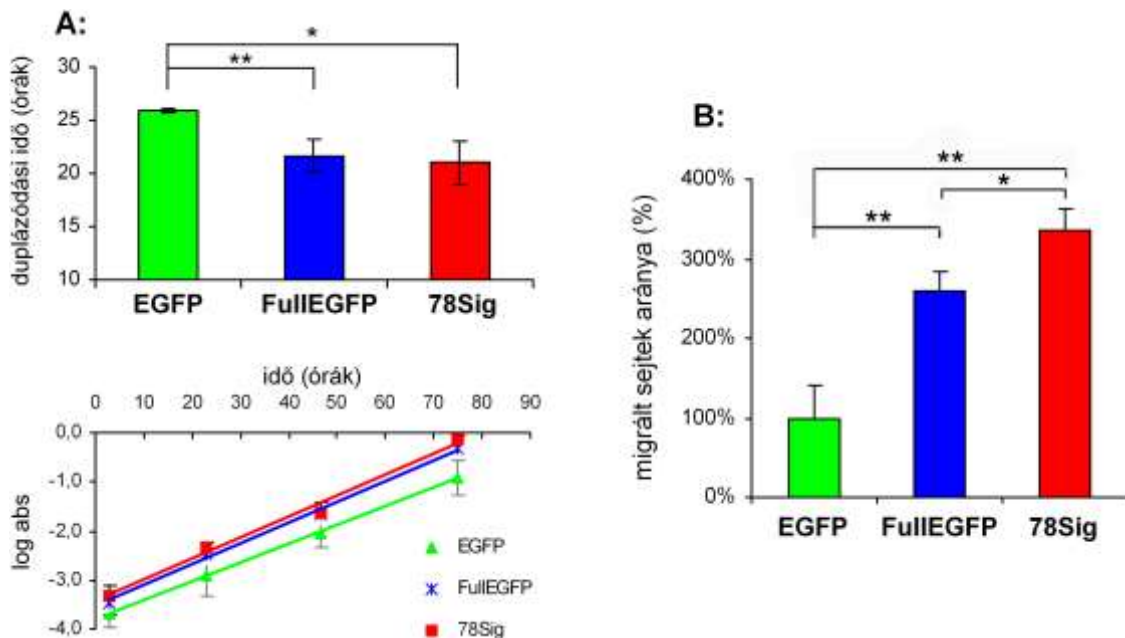
Mivel az EGFP fehérje mindhárom transzfektánsban jelen van, ezért kvantitatív RT-PCR-rel, EGFP cDNS-re specifikus primerekkel a rekombináns konstrukciók átíratainak mennyiségét, vagyis a transzfekció hatékonyságát elemeztük. Az eredmények szerint szignifikánsan kevesebb a FullEGFP átíratok mennyisége a sejtekben, mint a kontroll EGFP, vagy 78Sig (15. ábra C). A citoplazmás domén specifikus SDC1-CD primerpárral - amely egyszerre detektálja a rekombináns és az endogén syndecan-1 átíratokat - azt kaptuk, hogy a kontroll EGFP-hez képest a FullEGFP transzfekciója 6-szoros, a 78Sig pedig 14-szeres syndecan-1 expressziót eredményezett mRNS szinten. Az ektodomén specifikus SDC1-ED primerek - amelyek nem amplifikálnak a 78Sig cDNS-ről – csak a FullEGFP transzfektánsoknál detektáltak emelkedett mRNS szintet. Az RT-qPCR vizsgálatok tehát alátámasztották az immuncitokémia eredményeit (15. ábra B).

A CD138 ELISA a syndecan-1 ektodomén egyik epitópját detektálja. A módszerrel  $315 \pm 13$ ,  $570 \pm 8$  és  $294 \pm 8$  ng / mg összfehérje syndecan-1-et mértem rendre az EGFP, FullEGFP és 78Sig sejtek lizátumában. A sejtek médiumában  $5.5 \pm 0.02$ ,  $20.5 \pm 0.72$  és  $5.0 \pm 0.06$  ng / ml syndecan-1 fragmentet mértem. Az adatokat a kontroll EGFP transzfektánsokhoz viszonyítva azt kaptam, hogy fehérje szinten is csak a FullEGFP transzfektánsokban emelkedett meg a syndecan-1 ektodomén mennyisége, a sejteken kétszeresen, a médiumban négyszeresen (15. ábra D).

A csonkolt variáns transzfekciója tehát hatékonyabb volt, mint a FullEGFP változaté (15. ábra C, EGFP primerpár eredményei), ugyanakkor hatékony túltermelése sem az endogén syndecan-1 szintjét sem pedig a sheddingjét nem befolyásolta. A FullEGFP bár kisebb mennyiségben termelődött, mégis a syndecan-1 összesített mennyiségében számottevő emelkedést okozott, ami a médiumban oldott syndecan-1 frakciójában még kifejezettebb volt.

### 5.3 A teljes hosszúságú és a csonkolt syndecan-1 fokozza a HT-1080 sejtek proliferációját és kemotaxisát

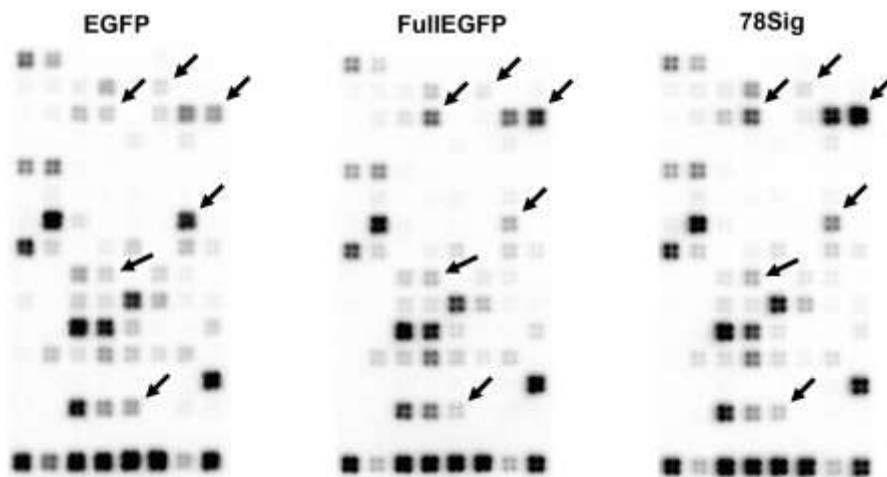
A transzfektánsok proliferációját a SRB esszével mértem. A duplázódási időket a növekedési görbék Log fázisából számoltam. Ekkor a sejtek mennyisége exponenciálisan növekszik az idő függvényében, mivel növekedésüket nem korlátozza táplálékhiány, helyhiány, vagy bármilyen káros hatás. Ennek ellenőrzésére a növekedési görbén a sejtmennyiség értékek (abs) logaritmusát ábrázoljuk az idő függvényében. Ha valóban Log fázisban voltak a sejtek, akkor a logaritmálás után a növekedési görbékből egyenest kell kapnunk (16. ábra A lent). Mindkét syndecan konstrukció fokozta a HT-1080 sejtek proliferációját. A kontroll EGFP esetében  $25,6 \pm 0,2$  órás duplázódási időt mértem, míg  $21,7 \pm 1,5$  és  $21,7 \pm 2,0$  órát kaptam a FullEGFP és a 78Sig esetében. A migrációs képességük tesztelésére alkalmazott Boydenkamrás kemotaxis vizsgálattal azt tapasztaltam, hogy mindkét syndecan konstrukció fokozza a HT-1080 sejtek kemotaxisát ECM fehérjék irányába, sőt, a 78Sig szignifikánsan nagyobb mértékben, mint a FullEGFP (16. Ábra B).



**16. ábra.** A FullEGFP és a 78Sig hatása a HT-1080 sejtek proliferációjára és kemotaxisára. (A) A duplázódási időket (felül) a növekedési görbék log szakaszából (alul) számítottuk az SRB esszével. (B) Az ECM fehérjék irányába migrált transzfektánsok relatív aránya Boyden kemotaxis kamrával mérve. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ .

#### 5.4 Változások a sejtproliferáció és a sejtmigráció szabályozásában résztvevő gének expressziójában

A syndecan túlexpresszáltatás által a jelátviteli utakban okozott eltérések jellemzésére oligoarray vizsgálatot végeztünk a HT-1080 transzfektánsokon. A három transzfektáns membránjain a jelek mintázatában detektálható eltérések (nyilak) a transzfektánsok génextpressziós mintázata közötti eltérésekre utalnak (17. ábra).



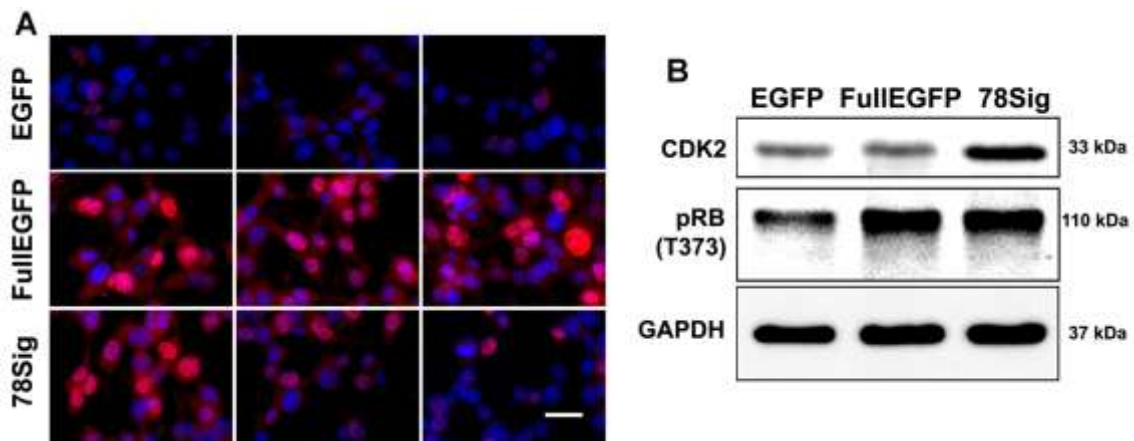
**17. ábra.** Az oligoarray membránok a jelek előhívása után. Minden membránon egy-egy transzfektáns mintáját vizsgáltuk. A membránokon a jelek mintázatában látható eltérések (nyilak) a transzfektánsok közötti génextpressziós mintázatbeli eltéréseket tükrözik. A pontos elemzéshez a felvételeket denzitometráltuk és a jelintenzitás értékeket normalizáltuk.

A nyers adatok denzitometriás elemzésével kapott eredmények arra utaltak, hogy a legtöbb gén, melynek expressziója mRNA szinten megváltozott a transzfekció hatására, a sejtciklus G1/S átmenet szabályozásában vesz részt (9. táblázat).

9. táblázat. Az oligoarray vizsgálat eredményei. R. E.: relatív expresszió az EGFP sejtekhez képest.

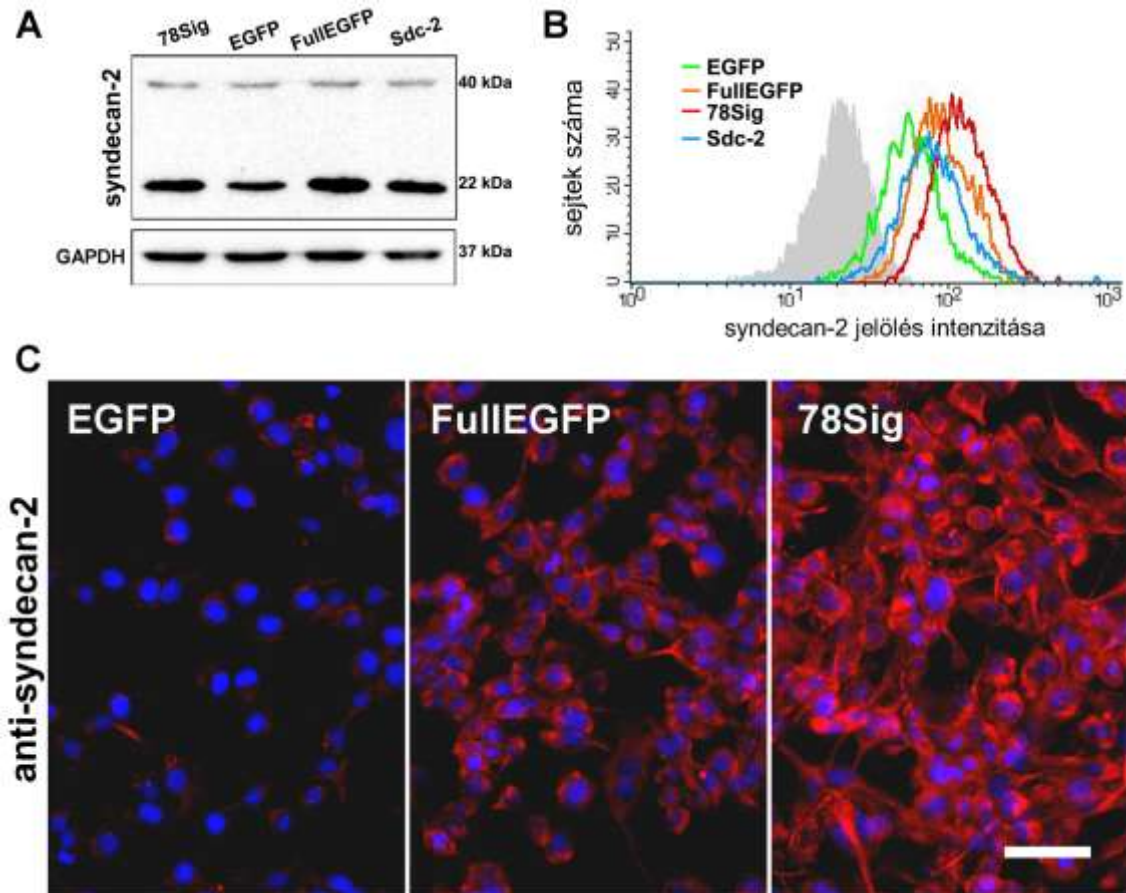
Gén Szimbólum	A gén angol neve	FullEGFP		78Sig	
		R.E.	p-érték	R.E.	p-érték
<b>Felülszabályozott gének:</b>					
MDM2	Mdm2 p53 binding protein homolog	1.17	0.136	6.92	0.042
CDC25A	cell division cycle 25 homolog A	2.83	0.016	3.17	0.002
CCNE1	cyclin E1	2.29	0.043	3.00	0.015
CDKN1A	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	1.78	0.052	2.28	0.044
CDK2	cyclin-dependent kinase 2	0.93	0.430	2.19	0.039
CASP9	caspase 9, apoptosis-related cysteine peptidase	1.54	0.030	1.61	0.024
<b>Alulszabályozott gének:</b>					
RAF1	v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1	1.00	0.136	0.62	0.005
ITGB1	integrin, beta 1	0.59	1.28E-04	0.68	0.003
ITGA4	integrin, alpha 4	0.59	8.36E-05	0.64	1.84E-04
SERPINE1	serpin peptidase inhibitor, clade E (PAI-1)	0.59	0.002	0.63	0.001
MMP1	matrix metallopeptidase 1	0.37	0.001	0.30	5.45E-07

A fokozott E-ciklin expressziót az immuncitokémia is megerősítette (18. ábra A). A CDK2 esetében is fehérje szinten sikerült alátámasztani az oligoarray eredményeket western blottal (18. ábra B). Mivel a CDK2 az E-ciklinnel kapcsolódva a retinoblasztóma (Rb) fehérjét foszforilálja, ezért Western blottal megmértem a Thr373 pozícióban foszforilált Rb fehérjék mennyiségét. Azt tapasztaltam, hogy mind a FullEGFP, mind a 78Sig fokozta a HT-1080 sejtekben a Rb foszforilációját.



18. ábra. Változások a syndecan transzfekció után a sejtproliferáció szabályozásában. (A) Három különböző látómező a HT-1080 transzfektánsok immuncitokémiai E-ciklin jelölése után. Lépték: 20  $\mu$ m, piros: E-ciklin, kék: DAPI magfestés. (B) A HT-1080 transzfektánsok CDK2, foszfo-Rb, és GAPDH western blotjai.

Mindezek mellett két különböző ellenanyagot használva, western blot, FACS és immuncitokémia technikákkal azt is kimutattam, hogy a két syndecan-1 konstrukció a syndecan-2 expresszió felülszabályozását is okozta (19. ábra A, B és C).



**19. ábra.** A syndecan-1 transzfekciója után a syndecan-2 expressziója is fokozódik. (A) A transzfektánsok anti-syndecan-2 Western blot eredménye a ZMD.308 ellenanyagot használva, és az anti-GAPDH loading kontrollja. (B) A HT-1080 transzfektánsok anti-syndecan-2 FACS vizsgálata. (C) Anti-syndecan-2 immuncitokémia metanol fixált transzfektánsokon. Lépték: 50  $\mu$ m, piros: syndecan-2, kék: DAPI magfestés.

A Western blot membránon a ZMD.308 ellenanyaggal 22 és 40 kDa-nál kaptam jeleket a mintákban. A 22 kDa a syndecan-2 vázfehérje méretének felel meg, a halványabb 40 kDa pedig feltehetően a glikozilált formájának (19. ábra A). A jelek



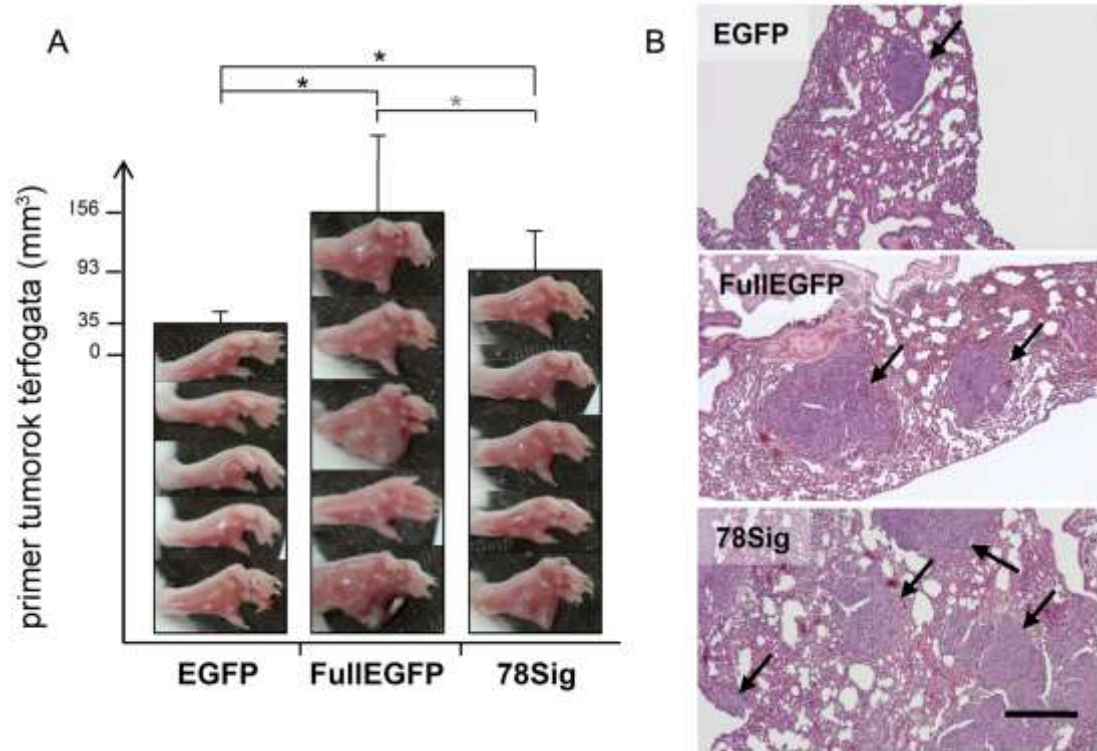
intenzitása hasonlóan alakult, mint az ugyanennek az ellenanyagának a FACS-szal kapott intenzitása (19. Ábra B), vagyis az EGFP-hez képest a FullEGFP majdnem kétszeres, a 78Sig pedig 2,5-szörösre emelte a syndecan-2 expresszióját (10. táblázat). A pozitív kontrollnak használt, syndecan-2-vel transzfektált sejtekben is kimutattuk a syndecan-2 expresszió emelkedését, de érdekes módon a 78Sig jóval hatékonyabban fokozta a syndecan-2 expresszióját, mint maga a syndecan-2 transzfekciója. A fenti arányok az L-18 ellenanyaggal végzett immuncitokémiánál is kijöttek (19. ábra C). A képen megfigyelhető a syndecan-2 sejt felszíni jelölődése.

**10. táblázat. A syndecan-2 FACS mérési eredményei.** Az értékek a fluoreszcencia intenzitásra vonatkoznak. NK: az immunjelölés negatív kontrollja; Rel. Int.: relatív intenzitás értékek.

	EGFP	FullEGFP	78Sig	Sdc-2	NK
Átlag Int.	66,84	100,32	131,78	106,66	21,49
Átl. - NK	45,35	78,83	110,29	85,17	0
Rel. Int.	100%	174%	243%	188%	

### 5.5 A syndecan konstrukciók hatása a HT-1080 sejtek malignitására, in vivo egérkísérletek

A stabil transzfektánsokat csoportonként 5-5 egér jobb talpába oltottuk. A huszonnegyedik napon a kialakult primer talptumorok mérete az EGFP csoportban  $35,0 \pm 11,7 \text{ mm}^3$  volt. A 78Sig-nél a tumorméret ennél szignifikánsan nagyobb volt,  $92,8 \pm 44,2 \text{ mm}^3$ , a FullEGFP csoportban pedig az EGFP és a 78Sig-hez képest is szignifikánsan nagyobb,  $156,3 \pm 86,0 \text{ mm}^3$  (20. ábra A). Míg az EGFP csoportnál 34 napra volt szükség ahhoz, hogy a talptumorok elérjék az átlagos  $150 \text{ mm}^3$ -es méretet, a FullEGFP és a 78Sig csoportoknál az ehhez szükséges idő mindössze 24 és 29 nap volt.



**20. ábra. In vivo egérkísérlek a syndecan konstrukciók HT-1080 sejtekre gyakorolt hatásának vizsgálatára.** (A) A primer talptumороk mérete a transzfektánsok beoltása után 24 nappal. A talptumороk fényképei és a mérési eredményeik egy diagrammon. (B) A transzfektánsok tüdőáttéteinek (nyilak) szövettani képe, HE festett metszetek, lépték: 200  $\mu\text{m}$ . \* $P < 0.05$

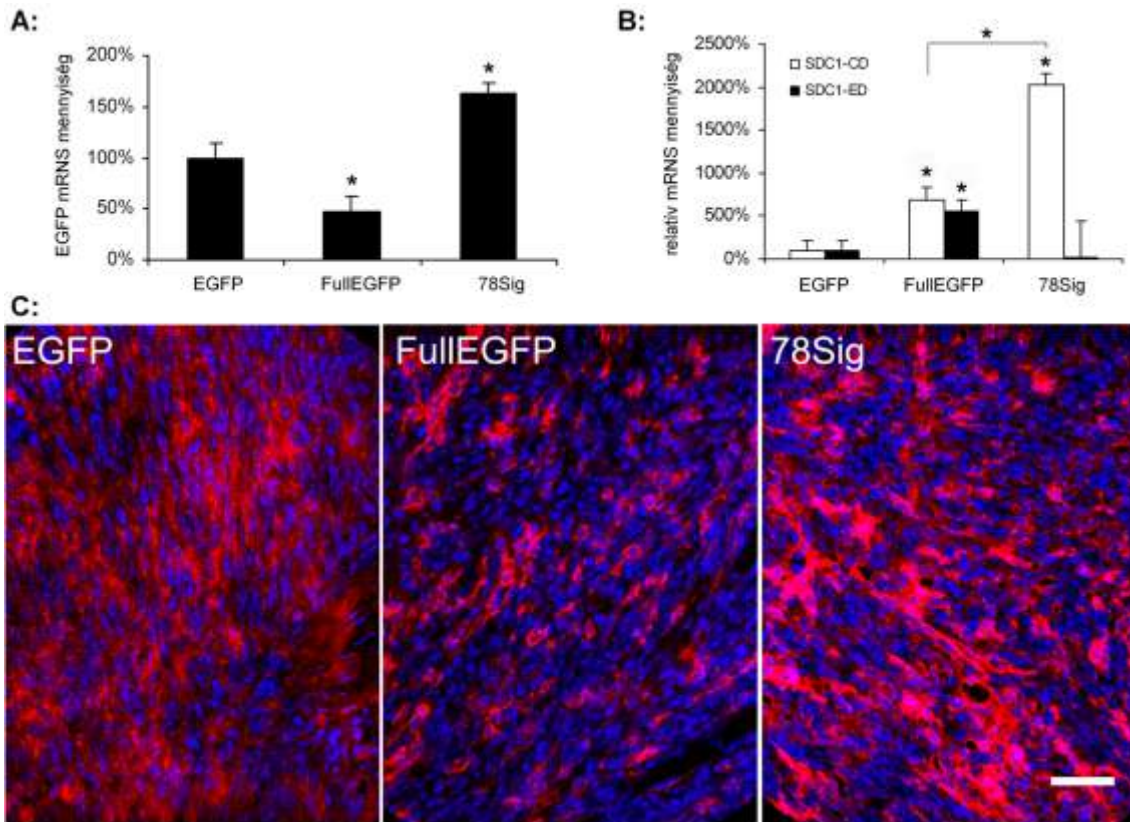
Mindhárom csoportnál az egereket az 50. napon boncoltuk fel, a tüdőáttétek mennyiségét pedig a szövettani feldolgozás után 5 random metszési síkban számoltam ki a HE festett metszeteken (20. ábra B) végzett morfolometriával. Az EGFP csoportból egy egérben találtam tüdőmetasztázist, elhanyagolható mennyiségben. A FullIEGFP és 78Sig csoportoknál az áttétes egyedek száma rendre 4 és 3 volt, és ezeknél már jelentős volt a daganatos szövetek mennyisége is (11. táblázat). Mind az áttétes egerek száma, mind a tüdőáttétek átlagos térfogataránya szignifikánsan magasabb volt a FullIEGFP és 78Sig csoportoknál, mint a kontroll EGFP csoportban.

**11. táblázat. A tüdőáttétek területaránya a transzfektánsok egértalpra oltása után 50 nappal.** Az EGFP, a FullEGFP és a 78Sig transzfektánsokat csoportonként 5-5 SCID egérbe oltottuk. Az arányokat az egerek tüdejéből készült HE metszetein mértem morfometriával, öt véletlenszerűen választott metszési síkban.

csoport	egér	A tüdőáttétek területaránya (%)				
		1. sík	2. sík	3. sík	4. sík	5. sík
EGFP	1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	5	0,46	0,00	0,00	0,00	0,00
FullEGFP	1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	2	35,34	12,53	20,08	14,90	21,48
	3	58,69	0,00	56,52	0,00	50,45
	4	19,55	3,78	3,08	4,64	12,55
	5	0,00	0,00	0,12	1,87	0,00
78Sig	1	65,29	41,30	53,31	48,92	56,39
	2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	3	58,45	10,37	37,41	17,76	41,25
	4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	5	0,91	0,00	0,00	0,00	0,00

## 5.6 Az endogén és a rekombináns syndecan-1 kimutatása a talptumorokban

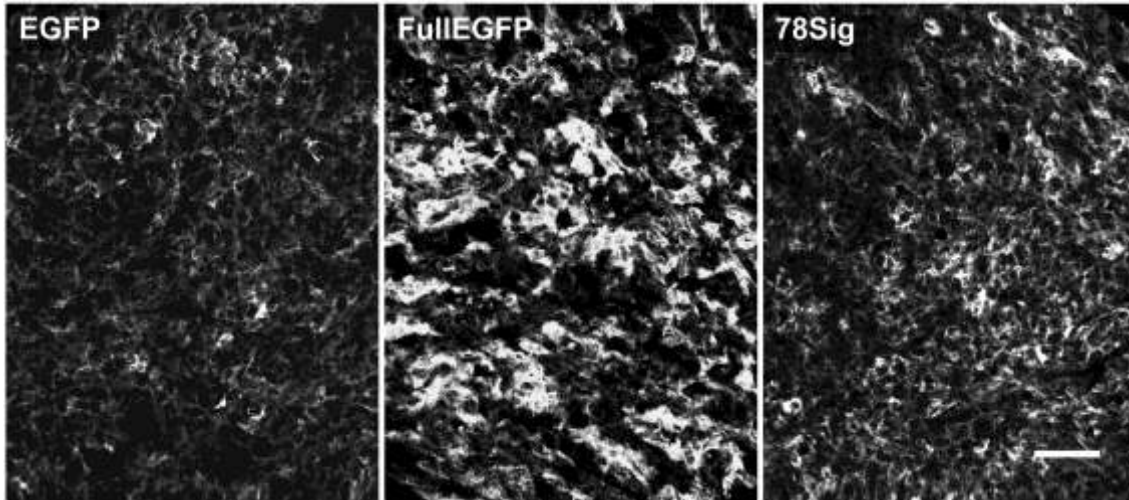
Akárcsak a sejt kultúráknál, a primer tumorokban *in vivo* is megvizsgáltam a transzfektált konstrukciók kifejeződését és a syndecan-1 expressziójára gyakorolt közvetlen hatását az EGFP és a syndecan-1 citoplazmás, illetve ektodoménjének kimutatásával. Elvégeztem a RT-qPCR-t az EGFP primerekkel a talptumorokon is, valamint az anti-GFP immuncitokémiát a talptumorok fagyasztott metszetein a rekombináns fehérjék specifikus detektálására. A FullEGFP átiratai az EGFP kimutatás alapján itt is – akárcsak a sejt kultúrájánál (15. ábra C, EGFP adatsor) – kisebb mennyiségben voltak jelen a transzfektánsokban, mint a kontroll EGFP, a 78Sig mennyisége viszont szignifikánsan nagyobb volt annál (21. ábra A). Az EGFP kimutatásával tehát megbizonyosodhattunk, hogy a rekombináns fehérjéket nem veszítették el a transzfektánsok, és a talptumorokban is expresszálják azokat.



**21. ábra. A rekombináns syndecan-1 kimutatása a talptumorokban.** (A) A rekombináns fehérjék mRNS átíratainak mennyisége EGFP specifikus RT-qPCR-rel mérve. Relatív kvantifikálás, GAPDH belső kontrollal. (B) A talptumorok syndecan-1 mRNS expressziója RT-qPCR-rel mérve, a citoplazmás domén régióra specifikus SDC1-CD és az ektodomén specifikus SDC1-ED primerpárokkal. Relatív kvantifikálás, GAPDH referenciagénnel. \* $P < 0.05$ , a kontroll EGFP-hez képest. (C) Anti-GFP immunhisztokémia a talptumorok fagyasztott metszetein. Lépték: 50  $\mu\text{m}$ . Piros: GFP, kék: DAPI magfestés.

A SDC1-CD primerpárral mérve az EGFP-hez képest a FullEGFP-ben szignifikánsan nagyobb, 6-szoros, a 78Sig-ben pedig 20-szoros expressziós értéket kaptam. A FullEGFP és a 78Sig közötti a különbség is szignifikáns. A SDC1-ED primerpár itt is - csakúgy, mint a sejt kultúráknál - egyedül a FullEGFP esetében detektált emelkedett mRNS mennyiséget (21. ábra B). A talptumorok fagyasztott metszeteit anti-GFP immunhisztokémiával megjelölve mindhárom transzfektáns talptumorai pozitívak voltak (21. ábra C), bizonyítva a rekombináns fehérjék jelenlétét. Ahogy az RT-PCR-nél, itt az anti-GFP immunhisztokémiánál is szembeűnő volt az, hogy a 78Sig transzfektánsok talptumorában intenzívebb volt az EGFP jel intenzitása, mint a

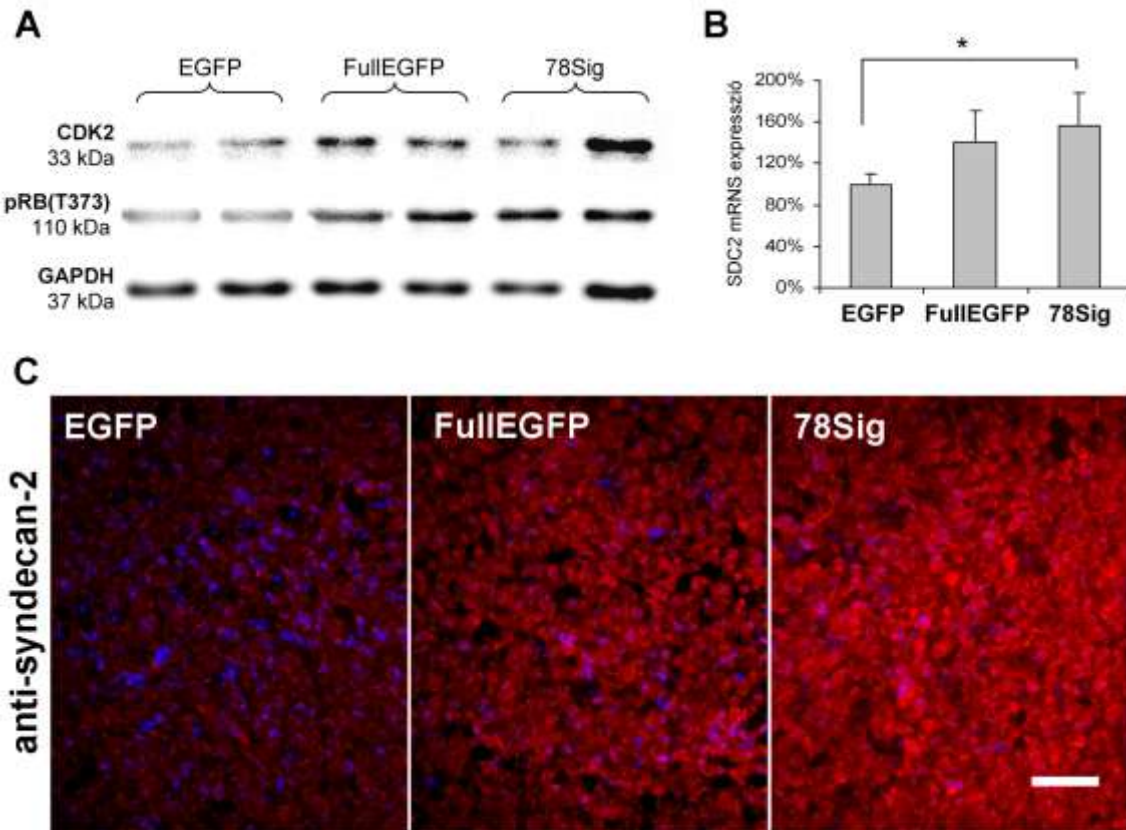
kontroll sejtekben. A FullEGFP talptumorok a sejt kultúrához hasonlóan, a syndecan-1 ektodomén specifikus BB-4 ellenanyaggal erősebben jelölődtek, mint az EGFP, vagy a 78Sig (22. ábra).



**22. ábra. Syndecan-1 ektodomén kimutatása a talptumorokban.** Syndecan-1 immunhisztokémia a talptumorok fagyasztott metszetein az ektodomén specifikus BB-4 ellenanyaggal, konfokális mikroszkóppal. Lépték: 50  $\mu$ m.

### 5.7 A FullEGFP és a 78Sig *in vivo* is fokozza a CDK2, a syndecan-2 expresszióját és a retinoblasztóma foszforilációját

Annak megállapítására, hogy a sejt kultúráknál a proliferáció és a migráció szabályozásában résztvevő gének expressziójában talált változások *in vivo* is érvényesek, a vizsgálatokat a talptumorokon is elvégeztük. Western blottal a CDK-2 mennyiségének és a Rb fehérje T373 aminosav foszforilációjának emelkedését a syndecan transzfektánsok talptumoraiban is kimutattam (23. ábra A). Ezen kívül RT-qPCR-rel (23. ábra B) és immunhisztokémiával (23. ábra C) a syndecan-2 emelkedett mRNS és fehérje expresszióját is sikerült kimutatnom.

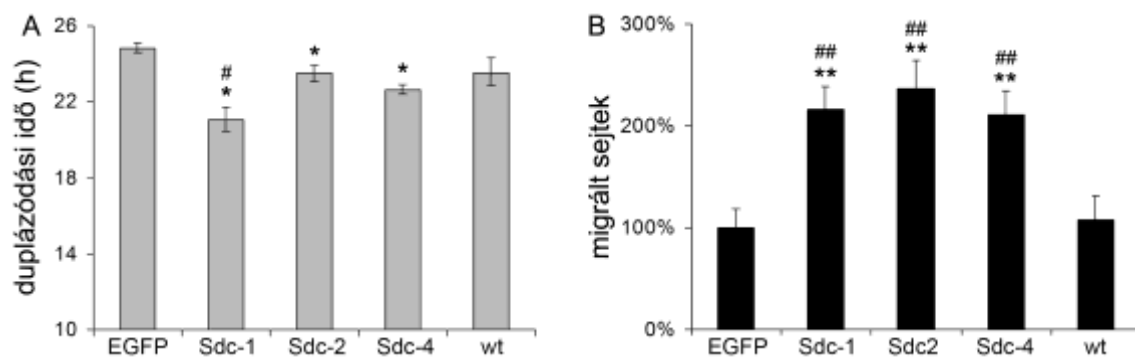


**23. ábra.** A FullEGFP és a 78Sig a talptumorokban is fokozta a CDK2, a syndecan-2 expresszióját és a retinoblasztóma foszforilációját. (A) A transzfektánsok talptumorainak CDK2, foszfo-Rb, syndecan-2 és GAPDH western blotjai. (B) A talptumorok syndecan-2 mRNA expressziója RT-qPCR-rel mérve, az SDC2 primerpárokkal. Relatív kvantifikálás, GAPDH referenciagénnel. \*P<0.05, a kontroll EGFP-hez képest. (C) Anti-syndecan-2 immunhisztokémia a talptumorok fagyasztott metszetein. Lépték: 50 μm. Piros: syndecan-2, kék: DAPI magfestés.

### 5.8 A syndecan-1 -2 és -4 hatása a HT-1080 sejtek proliferációjára és migrációjára

Az eddigi eredményekből egyértelműen kiderült, hogy a syndecan-1 fokozza a sejtproliferációt, a migrációt és, ami különösen fontos, a syndecan-2 expresszióját is. A következőkben az a kérdés merült fel bennünk, hogy vajon van-e hatása a többi syndecannak is a sejt viselkedésére? A kérdés megválaszolására a syndecan-1 -2 és a syndecan-4 plazmiddal is (Sdc-1, Sdc-2 és Sdc-4) transzfektáltam a sejteket. Ezúttal azonban különös figyelmet fordítottam arra, hogy a lehető legtöbb faktort, amely műterméket eredményezhet, kiküszöböljem. Ezért a natív, vad típusú syndecanokkal végeztem a kísérleteket, amelyekhez semmilyen egyéb fehérjét nem fuzionáltattam, és

az eddig kontrollnak használt EGFP transzfektánsok mellett a nem transzfektált HT-1080 sejteken (wt) is elvégeztem a kísérleteket. Míg az EGFP sejtekhez képest a syndecan-1 jelentősen, a syndecan-2 és -4 pedig kis mértékben fokozta a sejtproliferációt az SRB teszt szerint, addig a wt kontrollhoz képest csak a syndecan-1 fokozta a proliferációt szignifikánsan (24. ábra A). A wt sejtek proliferációja kis mértékben intenzívebb volt, mint az EGFP transzfektánsoké. A Boyden kamrában a kemotaxis mindhárom syndecan nagymértékben stimulálta, és ez a hatás a wt és az EGFP sejtekhez képest is szignifikánsnak bizonyult (24. ábra B).



**24. ábra. A különböző vad típusú syndecanok egyformán serkentik a HT-1080 sejtek migrációját, a proliferációt viszont csak a syndecan-1 fokozza szignifikánsan.** (A) A HT-1080 sejtek proliferációja a vad típusú, tehát fúziós fehérjéktől mentes syndecan-1, -2 és -4 (Sdc-1, Sdc-2, Sdc-4) expressziós plazmidok stabil transzfekciója után. Kontrollnak az EGFP-vel transzfektált (EGFP) és a nem transzfektált (wt) sejteket használtam. (B) Ugyanezen transzfektánsok kemotaxisa ECM fehérjékre. #:  $p < 0,05$  a wt sejtekhez képest, \* $p < 0,05$  az EGFP sejtekhez képest.

### 5.9 A syndecan-1 és -2 géncsendesítésének hatása a HT-1080 sejtek proliferációjára és migrációjára

Miután többféle módszerrel is a syndecan-2 expresszió fokozódását mutattam ki a syndecan-1 variánsok transzfekciója után, és láttuk, hogy a syndecan család több tagja is befolyásolja a HT-1080 sejtek viselkedését, indokoltá vált eldönteni, hogy melyik syndecan szerepe meghatározó a sejtek viselkedése szempontjából. A syndecan-1 és -2 kapcsolatának további vizsgálatához ezért géncsendesítési kísérleteket végeztem. A syndecan-1 és -2 specifikus, rekombináns mikro-RNS-t kódoló plazmidokkal (S1miRNA-a, -b és S2miRNA-a, -b) transzfektáltam a HT-1080 sejteket a két

proteoglikán expressziójának szelektív csökkentésére. Kontrollnak a  $\beta$ -galaktozidáz specifikus LacZ-miRNA plazmidot használtam. A RT-qPCR szerint mindegyik vektor a megfelelő syndecan expresszióját csökkentette, ez a csökkenés a S2miRNA-a kivételével minden esetben szignifikáns volt (25. ábra A). A géncsendesítést fehérje szinten is megvizsgáltam FACS-szal, a syndecan-1 jelölésére a B-B4 ellenanyagot, a syndecan-2 jelölésére az M-140 ellenanyagot használva (25. ábra B és C). A FACS mérés szerint a syndecan-1 expressziót a S1miRNA-a 48%-kal a S1miRNA-b 50%-kal csökkentette, míg a syndecan-2 expresszióját a S2miRNA-a 17%-kal, a S2miRNA-b pedig 54%-kal mérsékelte (12. és 13. táblázat), a különbség ezúttal minden esetben szignifikáns volt. A sejtproliferációt csak a S2miRNA-b gátolta (25. ábra D), az ECM fehérjék által kiváltott kemotaxist viszont a S2miRNA-a és a -b is szignifikánsan csökkentette, míg a syndecan-1 csendesítése nem befolyásolta (25. ábra E).

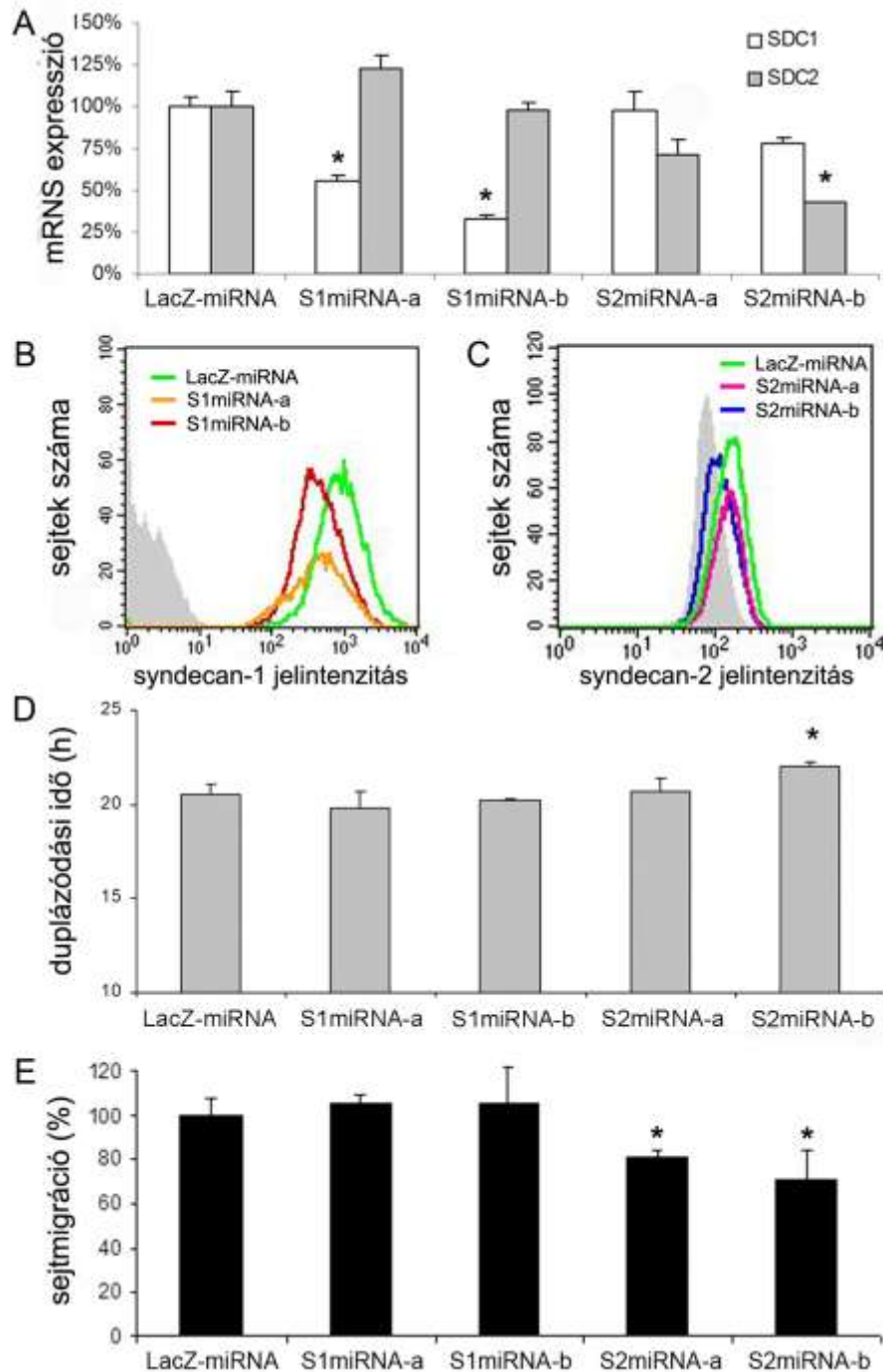
**12. táblázat. A syndecan-1 FACS mérési eredményei.** Az értékek a fluoreszcencia intenzitásra vonatkoznak. NK: az immunjelölés negatív kontrollja; Rel. Int.: relatív intenzitás értékek.

	LacZ-miRNA	S1miRNA-a	S1miRNA-b	NK
Átlag Int.	787,19	408,93	390,66	1,66
Átl. - NK	785,53	407,27	389	0
Rel. Int.	100%	52%	50%	

**13. táblázat. A syndecan-2 FACS mérési eredményei.**

	LacZ-miRNA	S2miRNA-a	S2miRNA-b	NK
Átlag Int.	153,57	141,58	116,03	84,52
Átl. - NK	69,05	57,06	31,51	0
Rel. Int.	100%	83%	46%	

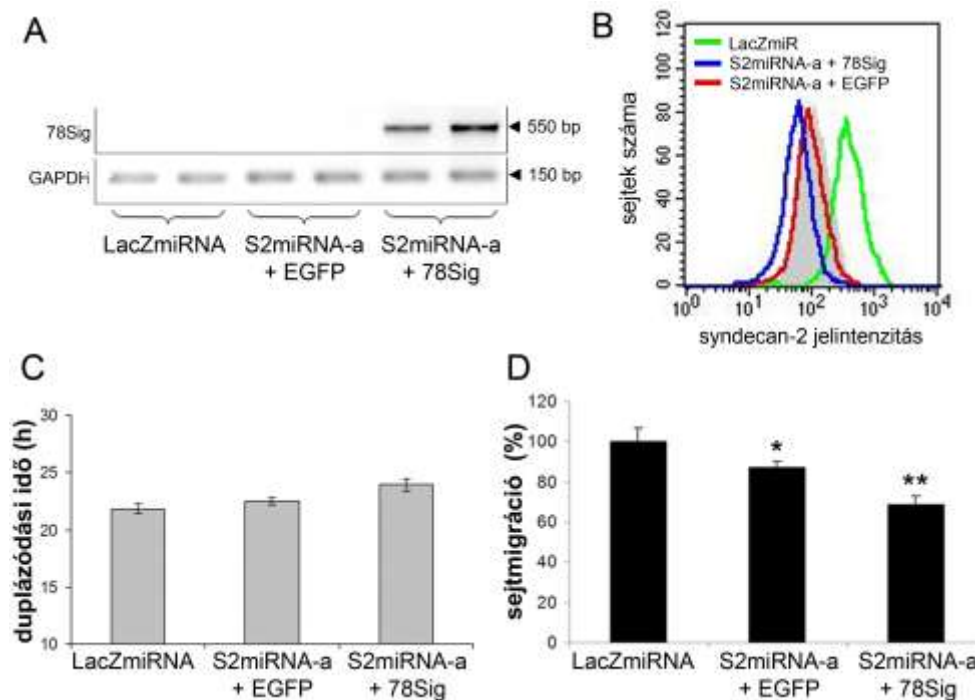




**25. ábra.** A syndecan-1 géncsendesítésnek nincs hatása a HT-1080 sejtek viselkedésére, míg a syndecan-2 silencing jelentősen csökkenti a migrációt és kis mértékben a proliferációt is. (A) A HT-1080 sejtek relatív syndecan-1 (SDC1) és syndecan-2 (SDC2) mRNS mennyiségei,  $\beta$ -D-galaktózidáz (LacZ-miRNA), syndecan-1 (S1miRNA-a és -b) és syndecan-2 (S2miRNA-a és -b) specifikus mikro-RNS-ek stabil transzfekciója után. RT-qPCR eredmények relatív kvantifikálása GAPDH referenciagénnel. \* $p < 0.05$  a LacZ-miR kontrollhoz képest. (B és C) A mikro-RNS alapú géncsendesítés hatékonysága fehérje szinten. (B) Syndecan-1 jelölés, (C) syndecan-2 jelölés. (D és E) Ugyanezen transzfektánsok proliferációja SRB esszével mérve (D) és migrációja Boyden-kamrában ECM fehérjékre (E) \* $p < 0.05$  a LacZ-miRNA kontrollhoz képest.

### 5.10 A csonka syndecan-1 proliferáció és migráció stimuló hatását a syndecan-2 csendesítés megakadályozza

A fenti eredményeink szerint míg a syndecan-1 esetében csak a túlexpresszáltatása volt hatással a sejtek viselkedésére, addig a syndecan-2 túltermelése és géncsendesítése is befolyásolta a proliferációt és migrációt. Ezek alapján a syndecan-2 domináns szerepére következtettünk. Ennek igazolására vagy cáfolására az alábbiakban bemutatott kísérletben a 78Sig sejteket „felül” transzfektáltuk a S2miRNA-a konstrukcióval (S2miRNA-a + 78Sig). Ezzel az volt a célunk, hogy megakadályozzuk a csonka syndecan-1 transzfekciójára bekövetkező syndecan-2 expresszió fokozódást. Kontrollként az EGFP transzfektánsokat a syndecan-2 csendesítő plazmiddal transzfektáltam felül (S2miRNA-a + EGFP), ezen kívül a LacZ-miRNA sejteket is alávettem a proliferáció és migráció vizsgálatoknak (26. ábra).



**26. ábra.** A csonkolt syndecan-1 konstrukció nem képes kifejteni a proliferáció és a migráció serkentő hatását, ha a syndecan-2-t legátoljuk. (A) A csonka 78Sig RNS átiratainak kimutatása RT-PCR-rel kettős transzfektánsokban. A 78Sig specifikus primer pár PCR terméke 550 bp hosszú, míg a PCR kontrollnak használt GAPDH primerek ampliconja 150 bp hosszúságú. A stabil transzfektánsok a következők: syndecan-2 specifikus mikro-RNS plazmid (S2miRNA-a) együtt transzfektálva a 78Sig plazmiddal (S2miRNA-a + 78Sig), illetve ugyanez együtt transzfektálva az EGFP kontroll plazmiddal (S2miRNA-a + EGFP). LacZmiRNA:  $\beta$ -D-galaktózidáz specifikus kontroll mikro-RNS vektor. (B) A syndecan-2 csendesítés eredményessége fehérje szinten, a syndecan-2 kimutatásával FACS-szal. A

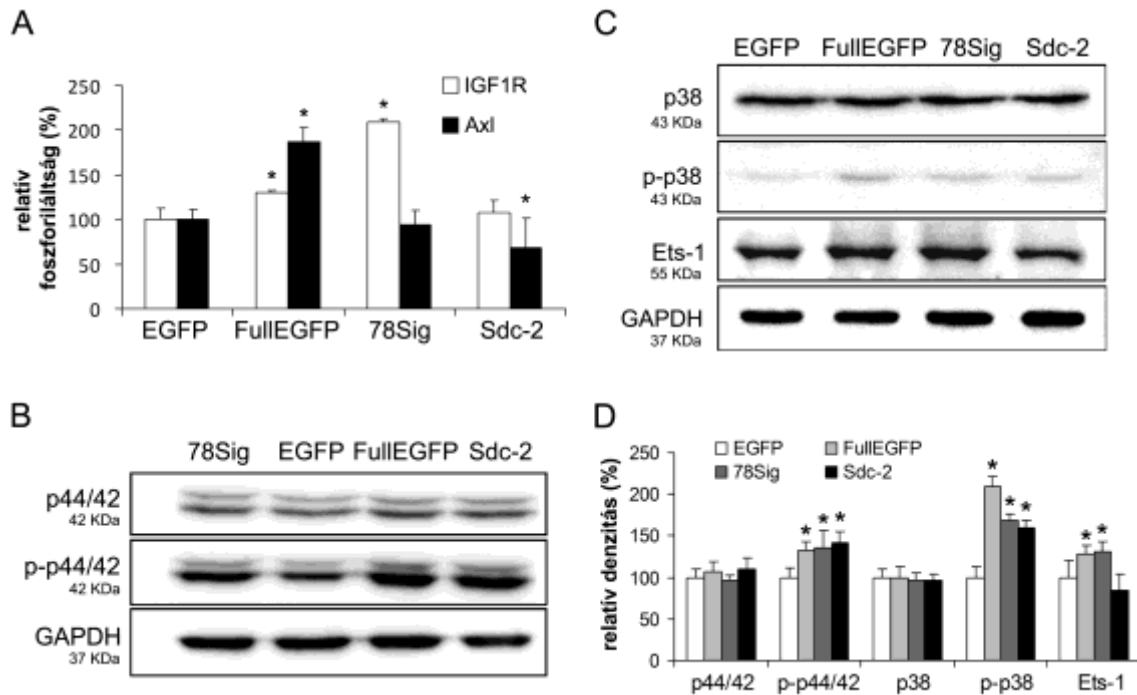
jelölésre az M-140 ellenanyagot használtam. (C és D) Ugyanezen transzfektánsok proliferációja SRB esszével mérve (C) és migrációja Boyden-kamrában ECM fehérjékre (D) \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  a LacZ-miRNA kontrollhoz képest.

A stabil kettős transzfektánsokban a 78Sig konstrukciót RT-PCR segítségével mutattam ki egy arra specifikus primerpárral (az SDC1-CD és az EGFP primereket kombináltam össze). Csak a S2miRNA-a + 78Sig sejtek mintáiból képződött az 550 bp hosszú, 78Sig specifikus amplikon. A GAPDH specifikus primerekről - amelyeket PCR kontrollnak használtam – mindhárom transzfektáns esetében képződött 150 bp hosszú specifikus termék (26. ábra A). A syndecan-2 expressziójának csökkenését FACS-szal ellenőriztem (26. ábra B). Láthatóan mind a S2miRNA-a + 78Sig, mind a S2miRNA-a + EGFP transzfektánsokban alacsonyabb volt a syndecan-2 expresszió, mint a LacZ-miRNA sejtekben. Az SRB vizsgálattal a S2miRNA-a + 78Sig transzfektánsok proliferációját találtam legalacsonyabbnak, bár szignifikáns különbség nem volt a három csoport között (26. ábra C). A kettős transzfektánsok kemotaxisa viszont szignifikánsan lecsökkent a LacZ-miRNA sejtekhez képest, legnagyobb mértékben a S2miRNA-a + 78Sig esetében (26. ábra D).

### **5.11 A syndecan-1 és -2 kooperációjának hátterében az IGF1R és az Ets-1 transzkripciós faktor állhat**

A funkcionális kísérletekkel kiderítettük, hogy működéséhez a syndecan-1-nek indukálnia, illetve serkentenie kell a syndecan-2 expressziót. Hogy ennek az indukciónak a mechanizmusát pontosabban megismerjük, az EGFP, a FullEGFP, a 78Sig és a Sdc-2 transzfektánsokat foszfo-receptor tirozinkináz esszével és Western blottal hasonlítottam össze. Ezúttal azokat a jelátvivő fehérjéket kerestem, melyek aktivitása a syndecan-1 transzfekció hatására megváltozik, a syndecan-2 viszont nem befolyásolja. Ezen kritériumoknak az IGF1R, az Axl tirozin kinázok és az Ets-1 transzkripciós faktor felelt meg. Mindkét kináz foszforilációja megemelkedett a FullEGFP hatására, azonban csak az IGF1R volt hiperfoszforilált a 78Sig transzfekciója után is. Az Axl foszforilációja a Sdc-2 transzfektánsban kis mértékben, de szignifikánsan csökkent (27. ábra A). A p44-42 és a p38 MAP-kinázok foszforilációja a

FullEGFP, a 78Sig és a Sdc-2 sejtekben is fokozódott (27. ábra B és C). Az Akt-1 foszforilációjában nem találtam változást (az ábrán nem szerepel), viszont az Ets-1 expressziója ha kis mértékben is, de szignifikánsan csak a FullEGFP és 78Sig sejtekben fokozódott (27. ábra C és D).



**27. ábra. A syndecan-1 és -2 transzfekciók hatása a HT-1080 sejtek jelátvitelére.** (A) Foszfotirozinkináz-receptor array eredmények. A FullEGFP, a 78Sig és a syndecan-2 (Sdc-2) transzfekciója nyomán tapasztalt változások az inzulinszerű növekedési faktor receptor 1 (IGF1R), illetve az Axl foszforilációjában. (B) A p44/42 MAPK foszforilációja ugyanezekben a transzfektánsokban. A Western blot vizsgálatokat két különböző ellenanyaggal végeztem, melyek közül az első az összes kinázra (p44/42), a másik csak a foszforiláltakra (p-p44/42) specifikus. A GAPDH volt a loading kontroll. (C) A transzfektánsok Western blotjai az összes p38 MAPK-ra (p38), csak a foszforiláltakra (p-p38) és az Ets-1 transzkripciósfaktorra (Ets-1) specifikus ellenanyagokkal. A loading kontroll itt is a GAPDH volt. (D) A foszfotirozinkináz array denzitometria eredmények. Minden ellenanyagnál a relatív denzitás értékeket az EGFP transzfektánsokhoz viszonyítva lehet látni. \* $p < 0.05$  az EGFP sejtekhez képest.

## 6 Megbeszélés

A syndecan kutatásban korábban az a tendencia érvényesült, hogy a szöveti expressziójuknak megfelelően a syndecan-1 szerepét epitheliális eredetű karcinóma sejtekben vizsgálták. Az elgondolás háttérében az az előfeltételezés húzódhatott, hogy az adott proteoglikán nyilván csak egy olyan sejttípus viselkedését tudja befolyásolni, amilyenben normális körülmények között fejeződik ki. Újabban azonban egyre több olyan közlemény lát napvilágot, ahol a syndecan-1 hatását kötőszöveti eredetű sejtekben tanulmányozzák.

Sok megfigyelés alapján közvetett bizonyítékok vannak arra, hogy a syndecan-1 mesenchymalis sejtek viselkedését is befolyásolhatja, azonban ezek esetében is az adatok ugyanolyan ellentmondásosak, mint ahogyan a bevezetésben a karcinómáknál részleteztem. A strómasejtek fokozott syndecan-1 expressziója több tumorféleségnél számos tanulmány szerint kedvezőtlen prognózist jelent, így emlőráknál, hasnyálmirigyráknál, gyomorráknál, ovárium ráknál és szájüregi laphámrákoknál (129-133). A kísérletes munkák alapján közvetlen bizonyítékok támasztják alá azt, hogy mesenchymalis eredetű sejtek viselkedésére többféle mechanizmuson keresztül, akár ellentétesen is hathat a syndecan-1. Malignus mesothelioma és a B6FS fibroszarkóma sejtek proliferációját a syndecan-1 transzfekciója csökkentette (116). A HT-1080 sejtek esetében a syndecan-1 sheddingje fokozza azok migrációs képességét (67). Disszertációmmal a fenti ismereteket kívántam bővíteni. Bemutattam, hogy a syndecan-1 teljes hosszúságú és a shedding utáni állapotát modellező, ektodoménjében csonkolt változata is egyaránt fokozza a HT-1080 fibroszarkóma sejtek proliferációját, migrációját és metasztatizáló képességét, valamint a konstrukciók működési mechanizmusáról is levontam néhány következtetést.

A konstrukciók szerkezetében szembevetendő, hogy a 78Sig esetében az N-terminálisra, a FullEGFP-nél pedig a C-terminálisra lett az EGFP fuzionáltatva. Az utóbbinál elvileg a syndecan citoplazmás domén PDZ kötő C2 régióját sztérikusan gátolhatja a hozzá kapcsolt EGFP fehérje. Az eredményekből azonban kiderült, hogy mind a 78Sig, mind a FullEGFP ugyanazt a hatást fejtik ki a sejtekre, mint a Sdc-1, ami nem más, mint a natív, vad típusú syndecan-1. Ebből pedig az következik, hogy a

citoplazmás doménhez kapcsolt EGFP nem zavarja a syndecan-1 molekula működését, legalábbis ezen a sejtvonalon az általam vizsgált funkciókban.

A munka első lépéseként a transzfekció után ellenőrizni kívántam a sejteken a rekombináns konstrukciók kifejeződését és lokalizációját. Az EGFP fúziós konstrukciók mRNS és fehérjetermékeit az EGFP-re specifikus primerekkel, ellenanyaggal és az EGFP zöld fluoreszcenciáját kihasználva mutattam ki. A RT-qPCR-rel és konfokális mikroszkópiával igazoltuk, hogy a FullEGFP és a 78Sig konstrukció is átíródik, és fehérjetermékei a sejtfelszínen megjelennek. A 78Sig transzfekciója hatékonyabb volt, illetve magasabb szinten expresszáldott, mint a FullEGFP. A konstrukciók kifejeződése a stabil transzfektánsok egértalpra oltása után a kialakult elsődleges tumorokban is megmaradt, sőt, a 78Sig esetében az expresszió fokozódását tapasztaltam. Ezek az eredmények azt bizonyítják, hogy a HT-1080 transzfektánsok valóban stabilan expresszálták a bevitt konstrukciókat.

Mivel sok gén esetében tapasztalható olyan visszacsatolási mechanizmus, mellyel saját expresszióját szabályozza, célszerűnek tartottuk a rekombináns syndecan konstrukciók syndecan-1 expreszióra gyakorolt hatását felmérni. A sejt kultúrákban a syndecan-1 mRNS mennyisége szignifikánsan emelkedett a FullEGFP transzfekciójára, míg a 78Sig esetében csak a citoplazmás domén specifikus primerekkel, illetve ellenanyagokkal lehetett emelkedett syndecan-1 mennyiséget detektálni. Ez arra utal, hogy a csonkolt 78Sig transzfekciója nem befolyásolja az endogén syndecan-1 expresszióját. A talptumor mintákban is ugyanezt tapasztaltam a syndecan-1 expresszió tekintetében.

A syndecan konstrukciók fenotípusra gyakorolt hatását a HT-1080 transzfektánsokon elvégzett *in vitro* proliferáció vizsgálattal, Boyden kemotaxis teszttel vizsgáltam, valamint *in vivo* egérbeoltással. Az eredmények egyöntetűen arra utaltak, hogy mind a teljes hosszúságú, mind a csonkolt syndecan-1 fokozza a sejtek proliferációját, kemotaxisát és áttétképző képességét. Az egérkísérletekkel kapcsolatban azonban felmerülhet néhány kérdés. Az első az, hogy miért nem adtak a kontroll EGFP sejtek tüdőáttéteket. Valójában az előkísérletek során ezek is adtak áttétet, ám lényegesen lassabban. Az egerek leölését úgy kellett időzítenünk, hogy még egyik csoportban se legyen elhullás, ekkor az EGFP egerekben még nem volt számottevő mennyiségű áttét. Sok fejtörést okozott az is, hogy mikor távolítsuk el a talptumorokat.

Végül az Anyag Módszer fejezetnél említett szempontok alapján azt az időpontot választottuk az amputálás elvégzéséhez, amelynél az adott csoportban a talptumороk elérik az átlagos  $150 \text{ mm}^3$ -es térfogatot, amivel életszerű helyzetet teremtettünk. A daganatos betegségek kórtörténete, illetve kezelésekor is a primer tumort csak egy bizonyos méret elérése fölött lehet észlelni és kezelni. A klinikusok tapasztalatain (kis primer tumornál gyakran sok a metasztázis, nagy primer tumornál pedig kevés) alapszik egy elmélet, mely szerint a primer tumor gátolhatja a metasztázisok fejlődését. Ha ez a HT-1080 sejtekre is igaz, akkor azért fejlődhetett az EGFP csoportnál a legkevesebb tüdőáttét, mert náluk volt a legkésőbb eltávolítva a primer tumor. Ha ez igaz volna, akkor a 78Sig csoport egereiben lényegesen kevesebb tüdőáttétet kellett volna találnunk, mint a FullEGFP-nél, hiszen e két csoport amputációja között is öt nap telt el, akárcsak az EGFP és FullEGFP amputálások között. Mivel azonban a 78Sig és a FullEGFP csoportok között nem volt jelentős különbség a tüdőáttétek mennyiségének tekintetében, ezért az amputálások időzítése nem befolyásolhatta lényegesen az eredményeket, a csonka és a teljes hosszúságú syndecan-1 túltermelése valóban fokozza a HT-1080 sejtek áttétképzését. Ezzel összhangban a HT-1080 sejtek proliferációs és migrációs képessége az *in vitro* eredmények alapján is fokozódott a syndecan-1 transzfekció hatására. Egy japán csoport munkája szerint a HT-1080 sejtekből fejlődő primer tumor angiogenezist serkentő faktorokat termel, és anti-VEGF ellenanyag adásával a tüdőáttétek nem alakulnak ki. Ez pedig arra utalhat, hogy a HT-1080 sejtek esetében a primer tumor nemhogy gátolná, hanem éppen serkenti az áttétek fejlődését az általa termelt VEGF révén (134).

Tudjuk tehát, hogy a FullEGFP és a shedding utáni csonka syndecan-1-et modellező 78Sig is fokozza a HT-1080 sejtek malignitását. Az ELISA, RT-qPCR és immuncitokémia eredmények alapján tudjuk azt is, hogy a 78Sig nem befolyásolta az endogén syndecan-1 expresszióját, sem pedig a sheddinget, így kijelenthetjük, hogy a csonka syndecan-1 önmagában is képes előidézni a proliferáció és a migráció változásait. A FullEGFP-nél a médiumban a szolúbilis syndecan-1 mennyiségének fokozott emelkedése feltehetően a molekula fokozott termelése, és az ennek következtében fokozódó shedding miatt detektálható. Mindkét konstrukció transzfekciójának végeredményben az az egyik fontos következménye, hogy a csonka, ektodomén nélküli syndecan-1 peptidek mennyisége megemelkedik a sejtmembránban.

A japán Kazuhira Endo szerint a syndecan-1 sheddingje fokozza a HT-1080 sejtek migrációját (67). Mások azt írták le, hogy egy olyan pontmutáns syndecan-1 expresszálatása, amely képtelen a sheddingre, nem fokozta az MCF-7 sejtek migrációját, szemben a vad típusú syndecan-1-gyel (135). Ha összegezzük a fentieket, vagyis hogy a 78Sig önmagában is fokozza a malignitást, a syndecan-1 shedding úgyszintén, a sheddinget követően a FullEGFP is csonka peptiddé alakul, továbbá hogy a shedding nélkül a syndecan-1 nem fokozza a malignitást, akkor csupán egyetlen logikus következtetés vonható le, mégpedig az, hogy a shedding révén létrejövő csonka syndecan-1 a molekula aktív formája, nem a teljes hosszúságú. A dolog érdekessége az, hogy míg számtalan közlemény foglalkozik a molekula ektodoménjével és a hozzá kapcsolódó GAG láncával (136-138), vagy az ektodoménjének membránkött, illetve szolubilis helyzetével (135,139), addig egyetlen olyan közleményt sem találtam, amelyik ennek a csonka peptidnek különösebb jelentőséget tulajdonítana, vagy valamilyen módon a szerepét vizsgálná. Tudomásom szerint még senki nem feltételezte, hogy a syndecan-1 a shedding által aktiválódik, és a jelátvitelt a csonka syndecan indítaná el.

A FullEGFP és a 78Sig által fokozott proliferáció lehetséges okaként a megemelkedett E-ciklin és CDK-2 expressziót azonosítottuk, valamint a Rb fehérje 373-as treoninjének fokozott foszforilációját. A ciklin-E fehérje a CDK2-vel alkot komplexet, és a sejtciklus restrikciós pontjánál jelenik meg, funkciója a G1/S fázis átmenet szabályozásával kapcsolatos (140). A CDK2 / ciklin-E komplex a retinoblasztóma fehérjét négy kitüntetett helyen foszforilálja: T373, S612, S795 és T821-en, melyek közül a T373 foszforilációjának legnagyobb a jelentősége (141). Mindezek együttesen arra utalnak, hogy a HT-1080 sejtekben a teljes hosszúságú és a csonkolt syndecan-1 overexpressziója is a retinoblasztóma fehérje CDK2 / Ciklin-E komplex általi hiperfoszforilációját okozza, ami a sejtek proliferációjának fokozódásához járulhat hozzá. A HT-1080 sejteknél a MAPK útvonal gátlása a PD98059 inhibitor kezeléssel a ciklin-E / CDK2 komplex gátlásához vezetve a sejtciklus G1 fázisban megrekedését eredményezi (142), tehát ezen fibroszarkóma sejtvonal proliferációjában ennek a komplexnek a szerepe valóban meghatározó. A jelen munkában is használt syndecan-1 plazmidok transzfektálása a STAV-AB mesothelioma- és a B6FS fibroszarkóma sejteknél is a sejtciklus G0/G1 ill. S fázisában



hatott az osztódási ciklusra, azonban ezeknél a sejteknél a transzfekció a sejtproliferáció csökkenését okozta (116), tehát a syndecan-1 serkentheti és gátolhatja is a sejtproliferációt, azonban még nem ismert, hogy milyen mechanizmussal, így azt sem tudjuk, hogy a jelátviteli kaszkádok melyik szintjén dől el az, hogy a syndecan-1 pozitív vagy negatív irányba változtatja a sejtproliferációt.

A syndecan-1 konstrukciók kemotaxis fokozó hatása egyenes arányban volt az expressziójuk mértékével és a syndecan-2 expressziójának mértékével is. Egy koreai csoport közleménye szerint ugyanezen sejtvonal migrációját a syndecan-2 túltermeltetése is fokozza (120), ezért felvetődött a kérdés, hogy vajon van-e kapcsolat a syndecan-2 és a syndecan-1 között a HT-1080 fibroszarkóma sejtek migrációjában. Syndecan-2 cDNS transzfekciója után a HT-1080 sejtek migrációja nálunk is fokozódott, igazolva ezzel azt, hogy a kísérlet a mi módszerünkkel is reprodukálható. A syndecan-1 és syndecan-2 kapcsolatának további vizsgálatára syndecan-1 ill. syndecan-2 csendesítő mikroRNS kódoló plazmidokkal transzfektáltuk a HT-1080 sejteket, majd a kisselektált stabil sejtvonalak viselkedését hasonlítottuk össze. Azt találtuk, hogy a sejtek migrációja lecsökkent a syndecan-2 silencing következtében, a syndecan-1 csendesítés viszont nem változtatott rajta. Mindez arra utalt, hogy a syndecan-2 szerepe a meghatározó, a syndecan-1 overexpressziója a syndecan-2 befolyásolásával képes a sejtmigrációra hatni, tehát a két molekula kooperál egymással, és ebben a funkcionális kapcsolatban a syndecan-2 downstream helyezkedik el a syndecan-1-hez képest. A kettős transzfekciók eredményei ezt a következtetésünket alátámasztották, hiszen a csonka 78Sig konstrukció migráció stimuláló hatását is gátolta a syndecan-2 géncsökkentése.

Valamivel nehezebb volt a syndecan-1 és -2 szerepét tisztázni a sejtproliferáció viszonylatában. Ehhez talán az is hozzájárult, hogy jóval mérsékeltebb hatást gyakoroltak a transzfekciók a sejtproliferációra, mint a migrációra. Csak a syndecan-1 overexpressziója fokozta a proliferációt, a syndecan-2 önmagában nem. Fontos megjegyezni, hogy a syndecan-1 transzfekciója nyomán a syndecan-2 expressziója is megemelkedett. A syndecan-1 csökkentése nem befolyásolta a sejtnövekedést, a syndecan-2-é viszont csökkentette azt. Végül a kettős transzfekció eredménye arra is rámutatott, hogy a csonka syndecan-1 nem tudja fokozni a sejtproliferációt, ha a syndecan-2-t egyidejűleg gátoljuk, megakadályozva ezzel a syndecan-1 transzfekció

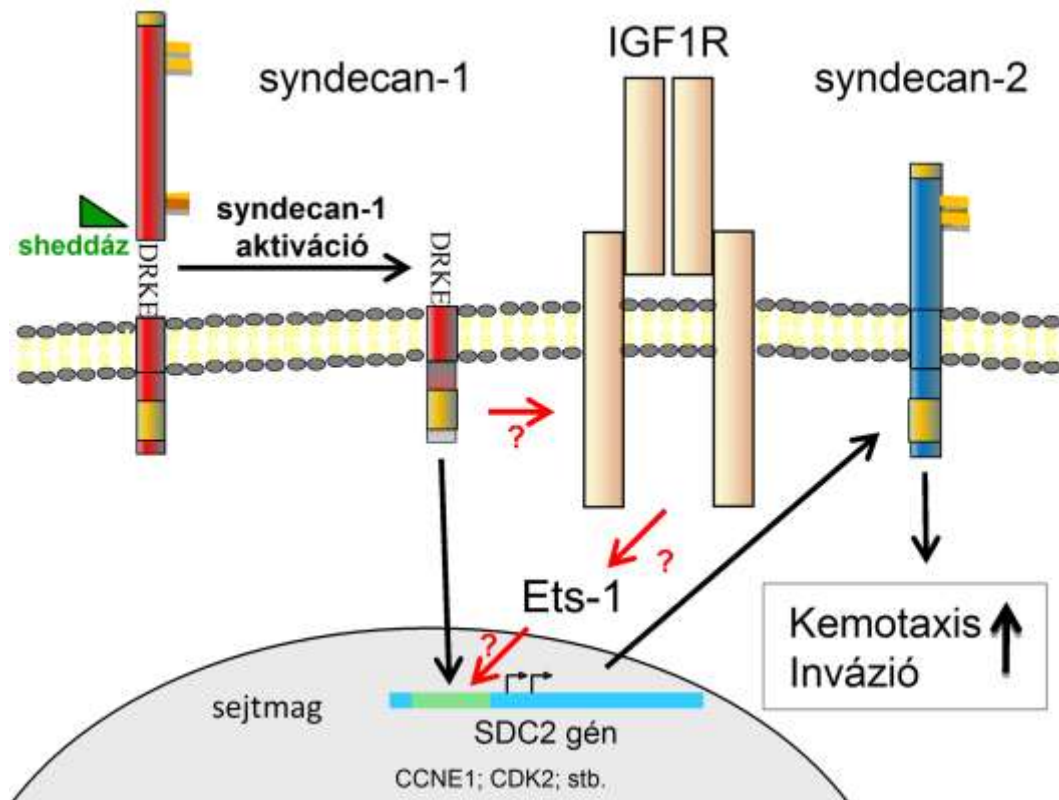
miatti syndecan-2 expresszió emelkedést. A fenti eredmények alapján tehát csak azt lehet biztosan megállapítani, hogy a HT-1080 sejtek proliferációjának fokozásához mind a syndecan-1, mind a -2 fokozott expressziója szükséges.

Az, hogy a syndecan-1 csendesítés nem gátolta a HT-1080 migrációját, valószínűleg annak köszönhető, hogy a syndecan-2 egy alapexpressziós szinttel rendelkezik, amit a syndecan-1 csak pozitív irányba képes befolyásolni. Feltehetőleg a syndecan-2 transzkripcióját más faktorok is szabályozzák, nem csak a syndecan-1. A miénkhez hasonló géncsökkentési módszerekkel korábban a syndecan-2 és a syndecan-4 között hasonló kooperációt találtak a Lewis tüdőkarcinóma eredetű P29 és LM66-H11 sejtek aktin stressz rost formálódásában (143). Syndecan-1 és syndecan-4 között dendritikus sejtek érésében is leírtak funkcionális kapcsolatot (144). Itt a syndecan-4 expresszió növekedik, a syndecan-1 pedig lecsökken a lipopoliszacharid kezelés indukált dendritikus sejt érés első óráiban.

Számos közlemény számolt be arról, hogy egy biológiai folyamatban - mint például a daganat metasztázis, vagy citokin ill. növekedési faktorokra adott sejtválasz - egyszerre több syndecan paralóg expressziója is megváltozik. Itt is az a helyzet, hogy sejtípus függő, hogy ugyanaz a hatás milyen irányba változtatja az egyes syndecanok expresszióját. A fokozott peritoneális áttétképzésre szelektált GC9811 humán gyomorráksejteknel a syndecan-1 és a syndecan-2 expressziója is megnövekedett, miközben proliferációjuk és migrációjuk is fokozódott (145). Máj fibroblasztoknál az IL-6 hatására a syndecan-1 és -2 RNS mennyisége is megemelkedett, míg ugyanez a citokin csökkenti az expressziójukat bőr fibroblasztoknál (146). Növekedési faktor kezeléssel mesothelioma sejtekben is több syndecan forma expressziója változik egyszerre (115). Anders Hjerpe munkacsoportja a STAV-AB mesothelioma sejteken azt állapította meg, hogy a syndecan-1 túlexpresszáltatásakor a syndecan-2 expressziója lecsökkent, a B6FS fibroszarkóma sejtek esetében viszont megemelkedik (116).

Az a tény, hogy a csonka syndecan-1 az ektodomén nélkül is ugyanazt a változást okozta a fibroszarkóma sejtjeink *in vitro* viselkedésében, a transzmembrán és a citoplazmás domén szerepére irányítja figyelmünket. A transzmembrán domén és azon belül a GxxxG motívum szükséges és egyben elégséges a syndecan-2 és -4 működéséhez (43). A transzmembrán doménjük révén a syndecan paralógok heterodimerizálódhatnak (44), így nem lehet kizárni azt sem, hogy esetünkben a

syndecan-1 és -2 heterodimerizációja állhat a kooperációjuk mögött. A syndecan-1 konstrukciók ugyanakkor a syndecan-2 expressziót mRNS szinten is fokozták, ami arra utal, hogy a syndecan-1 transzkripciós szinten hat a syndecan-2-re, így a közvetlen interakció lehetősége kevésbé tűnt valószínűnek. Ezek alapján tehát nem lehetett megállapítani, hogy ez a funkcionális kapcsolat milyen formában, milyen mechanizmussal valósul meg. A kérdés megválaszolására kerestünk a tirozinkináz esszével és Western blottal syndecan-1 transzfekcióra specifikus, syndecan-2-től független változásokat a jelátvivő fehérjék aktivációjában. Így jutottunk el az IGF1R-hez és az Ets-1 transzkripciós faktorhoz, melyek foszforilációja illetve mennyisége megemelkedett. A syndecan-1 kapcsán már megállapították, hogy képes az IGF1R-el interakcióba lépni és aktiválni azt (147). Az Ets-1 fehérjét a tumorok inváziós- és metasztatizáló képességének szabályozásával hozzák összefüggésbe (148). Talán nem elképzelhetetlen, hogy a syndecan-1 a HT-1080 sejteken az IGF1 receptor működését serkentve fokozza az Ets-1 expresszióját, amely a syndecan-2 transzkripcióját aktiválja (28. ábra). A MAP kinázok viszont mind a syndecan-1, mind a syndecan-2 hatására hiperfoszforilálódtak. Ez pedig azt magyarázná meg, hogy miért csak együtt fokozta a syndecan-1 és -2 a sejtproliferációt, csak ha mindkettő expressziója megnőtt.



28. ábra. A syndecan-1 és -2 transzfekciók hatása a HT-1080 sejtek jelátvitelére. A képen az *in vitro* kísérletek interpretációja látható.

A munka során egyik érdekes tapasztalatunk az volt, hogy a syndecan-1 és -2 mellett a syndecan-4 is ugyanúgy fokozza a fibroszarkóma sejtek migrációját. A PCR vizsgálatok szerint a többi syndecan expresszióját nem befolyásolta a syndecan-4 transzfekciója, ezért valószínűleg ugyanolyan mechanizmussal fokozza a sejtmigrációt, mint a syndecan-2. Ez pedig ismét csak a transzmembrán és citoplazmás doménekre hívja fel a figyelmet, hiszen ez a két domén szinte teljesen megegyezik a syndecan-2 és -4 között. Ez rögtön egy újabb kérdést vet fel: szükség van-e a syndecan-2 ektodoménjére a migráció fokozó hatásához a HT-1080 sejteknél?

Noha a sejtkultúrák *in vitro* vizsgálatainak során a csonka és a teljes hosszúságú syndecan-1 variáns gyakorlatilag ugyanúgy működött, az *in vivo* egérmodellben egy fontos különbséget tapasztalhattunk: a FullEGFP lényegesen nagyobb mértékben fokozta a talptumorkok proliferációját, mint a 78Sig. Ez a hatás syndecan-2 független, hiszen a FullEGFP sejteken a talptumorkokban - csakúgy, mint a sejtkultúráknál - kevesebb a syndecan-2, mint a 78Sig transzfektánsokon. Ez arra utal, hogy a syndecan-

1 ektodoménje *in vivo* körülmények között egy ismeretlen, de syndecan-2 független mechanizmussal is segíti a tumor fejlődését. Mivel myeloma sejteken már leírták, hogy a sejtfelszínről leváló syndecan-1 ektodomén az angiogenezist serkenti (66), ezért elméletileg elképzelhető, hogy a teljes hosszúságú syndecan-1-gyel transzfektált HT-1080 sejtek talptumorai is ezért növekedtek jóval gyorsabban.

Manapság általánosan elfogadott tény, hogy a különböző syndecanok funkciói gyakran egymással átfednek. Ha csak a sejtmigrációt számítjuk, a syndecan-1-ről sok sejtvonal esetén leírták, hogy befolyásolja azt, így például kornea strómasejteknel, fejnnyaki laphámrák sejteknel és humán hepatómasejteknel (149-151). A syndecan-2 sok adat szerint ugyancsak hatással van a sejtmigrációra vastagbélrák sejteknel és melanóma sejteknel (104,105,152). A HT-1080 példáján keresztül most az is kiderült, hogy akár egy sejten belül is ugyanazt a funkciót láthatják el különböző syndecanok. Eredményeim arra hívják fel a figyelmet, hogy az átfedő funkciók háttérben könnyen lehet, hogy a syndecan paralógok közti funkcionális kapcsolat, azaz kooperáció állhat. Munkámnak tehát a különböző syndecan paralógok változatos biológiai hatásainak, az ezek háttérben álló mechanizmusok megértésében lehet jelentősége.

Eredményeim egyúttal arra is felhívják a figyelmet, hogy sok esetben nem elég, ha egyszerre csak egy syndecan féleségre koncentrálnunk, amikor meg akarjuk érteni egy adott daganattípusban betöltött szerepüket. Igen fontos, hogy lehetőleg mind a négy syndecan expresszióját, illetve mintázatának változásait tisztázzuk a betegség előrehaladása során. Ebben a tekintetben a jelen munka sem tekinthető teljesnek, hiszen a syndecan-3 szerepét nem vizsgáltuk. Ennek az az oka, hogy mint a legtöbb tumorféleség és -sejtvonal, a HT-1080 sem fejezi ki azt, túlexpresszáltatásához pedig nem állt rendelkezésünkre syndecan-3 konstrukció.

Mint ahogyan az embrionális fejlődésnél a különböző szövetek differenciálódása közben kialakul egy speciális, arra a szövetféleségre jellemző expressziós mintázat (70), úgy a daganatok keletkezése illetve fejlődése során is jellegzetes irányba tolódhat el a különböző syndecanok expressziós aránya. Ha azonban a szakirodalomból szeretnénk ezeket az arányokat, változásokat, mintázatokat kideríteni, akkor bizony komoly hiányosságokkal találjuk szembe magunkat. Gyakorlatilag egyetlen olyan tumor típus sincsen, amelynél többféle syndecanra is találhatunk elegendő adatot. Ha a vastagbélrákot vesszük példának, tudjuk, hogy ezekben a daganatokban lecsökken a

syndecan-1 expressziója (101,153,154), azonban a syndecan-1 szerepét még senki sem vizsgálta vastagbélrák sejtvonalakban. A syndecan-2 hatásával viszont több közleményben is foglalkoznak sejtvonalakon (104,155,156), de arra nincs adat, hogy egyáltalán expresszálódik-e vastagbélrákban, illetve egy elmúlt évben megjelent közlemény szerint sem a normális, sem pedig a gyulladt vastagbél hámban nem expresszálódik a fehérje (157).

További lehetőségek, tervek:

A dolgozatomban bemutatott munka számomra egyik legfontosabb hozománya kétségkívül egyfajta szemléletváltás volt. A syndecan paralógok kooperációját feltételezve, a további kutatásokat szükségszerűen más szempontok szerint tervezném. Természetesen nem gondolom, hogy az eddigi erőfeszítések hiábavalók lettek volna, sőt, hiszem, hogy az eddigi kutatások folytatásával pontosabb képet kaphatunk a HT-1080 sejtek nyújtotta modellen keresztül a syndecan-1 és -2 kooperációjának mechanizmusáról.

A továbbiakban tehát három módon folytatnám ezt a kutatást:

1. Ugyanezzel a transzfekciós módszerrel a következő kérdésekre keresném a választ: Van-e közvetlen interakció a syndecan-1 és -2 között? Első lépésként a transzmembrán domén, illetve a dimerizáció szerepét tisztáznám olyan syndecan-1 konstrukciók transzfekciójával, amelyekből az ektodomén és a citoplazmatikus domén is hiányzik, illetve amelyekben a transzmembrán doménban a dimerizációhoz szükséges GxxxG glicinek el vannak mutálva. Mivel a HT-1080 sejtvonal migrációjának szabályozásában a syndecan-2 eredményeink szerint a syndecan-1-től downstream pozícióban helyezkedik el, ezért tisztáznám, hogy a syndecan-2 melyik doménja nélkülözhetetlen a migráció fokozáshoz. A stabil transzfektánsok ugyanakkor alkalmasak arra is, hogy kiderítsük, hogy a syndecan-2 proliferációra / migrációra gyakorolt hatásában van-e szerepe növekedési faktoroknak, azaz szérumfüggetlen-e a hatás, vagy hogy van-e köze az integrinekhez, vagy egyéb kemotaxis receptorokhoz. A kemotaxis vizsgálatoknál a kemoattraktánsnak használt ECM

fehérjékből a különböző komponensek szelektív kitiatrálásával, vagy a vizsgált sejteken az integrinek, ill. egyéb receptorok, az IGF1R vagy az Ets-1 szelektív gátlásával szerepüket tisztázni lehetne.

2. A másik stratégia az lenne, hogy biokémiai módszerekkel (pl. *in vivo* FRET, vagy ko-immunprecipitáció) keresném a syndecan-2-vel fizikai kapcsolatba lépő fehérjéket a HT-1080-ban. Az így talált fehérjék szerepét a syndecan-2 működésében a már bemutatott funkcionális vizsgálatokkal lehetne cáfolni vagy bizonyítani.
3. Vizsgálnám a syndecan-1 ektodoménjének az angiogenezisben betöltött szerepét, továbbá a syndecan-1 expresszióját, valamint a sheddinget a tumorsejtek hipoxiára adott válaszában. Ezek a vizsgálatok azokon az *in vivo* eredményeken alapulnának, amelyek a FulLEGFP fokozott tumornövekedést stimuláló hatására utaltak.

Amennyiben nem a HT-1080 modellen folytatnám a kutatásokat, akkor mindenképpen a syndecanok expressziós mintázatát és kooperációját vizsgálnám egy bizonyos daganattípusban. Ezzel a megközelítéssel a szakirodalom talán sok fehér foltját lehetne eltüntetni. Ha a példaként már felhozott vastagbélrákot vesszük, akkor első lépésként tisztáznám, hogy milyen syndecanok expresszálódnak itt, illetve, hogyan változik az expressziójuk az embrióban a vastagbél kialakulásakor, daganat fejlődésével, vagy a vastagbél gyulladásos betegségeinél, illetve azt, hogy a változások hogyan függenek össze a klinikai adatokkal, a jelenleg használt diagnosztikai vizsgálatok eredményeivel. A következő lépésben pedig több vastagbélrák sejtvonalon is vizsgálnám a syndecanok expressziós mintázatát, hogy az mennyiben hasonlít a tumorokéra, illetve a sejteken funkcionális tesztekre is volna lehetőség, melyek segítségével a különböző syndecanok szerepét lehetne meghatározni, illetve tisztázni egymással való kapcsolatukat.

## 7 Következtetések

Eredményeim elemzéséből az alábbi következtetéseket vonhatjuk le:

1. A syndecan-1 a HT-1080 sejtek malignitását fokozza. A molekula túltermelésekor a sejtek proliferációja és migrációs képességük is fokozódik. Ez a hatás egy egérmodellben, *in vivo* is igazolható.
2. A fibroszarkóma sejt vonal sejt kultúráiban a syndecan-1 a fent vázolt hatását az ektodoménje nélkül is kifejti, feltehetően a molekula vázfehérjéje a shedding által aktiválódik. Az ektodoménnek ezen felül *in vivo* további proliferáció fokozó hatása is lehet.
3. A syndecan-1 a ciklin-E, a CDK2, az Ets-1 transzkripciós faktor és a syndecan-2 expresszióját megemeli, a retinoblasztóma fehérje és az IGF1R foszforilációját pedig fokozza.
4. A HT-1080 sejtek proliferációját csak a syndecan-1 transzfekciója fokozza, a migrációját viszont a syndecan-2 és a syndecan-4 túltermelése is.
5. A syndecan-1 a syndecan-2 indukcióján keresztül serkenti a migrációt, a syndecan-2 szerepe ebben a tekintetben meghatározó. A sejtproliferáció fokozásához a syndecan-1 és -2 együttes túltermelése szükséges.



## 8 Összefoglalás

A syndecanok transzmembrán heparánszulfát proteoglikánok. A malignus fenotípusban játszott szerepük a tumor típusától függően lehet pozitív vagy éppen negatív. Ugyanakkor a daganatterápia ígéretes célpontjai, ezért fontos megismernünk a sejtműködésre gyakorolt sokféle hatásuk mögött álló mechanizmusokat. A HT-1080 fibroszarkómasejtek malignitását mind a syndecan-1, mind a syndecan-2 előmozdítja. Hogy részleteiben megismerhessük a sejt viselkedésében betöltött szerepüket, a különböző syndecanok expresszióját befolyásoltam a HT-1080 sejtekben, majd a proliferációjukat, valamint a kemotaxisukat vizsgáltam. A transzfektánsok *in vivo* teszteléséhez egerekbe is beoltottuk őket. Nem csak a teljes hosszúságú, hanem az ektodoménből csak a négy membránközeli aminosavat tartalmazó, csonka syndecan-1 variáns is fokozta mind a proliferációt, mind a migrációt. Ezek a változások a syndecan-2-expresszió megemelkedésével párosultak. A syndecan-2-géncsendesítés csökkentette a migrációt, a jelentős mértékű syndecan-2-gátlás pedig kis mértékben a proliferációt is gátolta. A csonka syndecan-1 nem tudta migráció- és proliferációserkentő hatását kifejteni, ha egyidejűleg a syndecan-2 expresszióját géncsendesítéssel csökkentettük. A syndecan-1-géncsendesítésnek nem volt hatása. A csonka és a teljes hosszúságú syndecan-1 variánsok *in vivo* is fokozták a tumornövekedést és a metasztázisképzést is. Az *in vitro* eredmények alapján a syndecan-1 ektodoménnek nincs szerepe a molekula hatásában, azonban *in vivo* a primer tumorok számára további proliferációs előnyt biztosít. A syndecan-1 tehát a migrációt a syndecan-2 által serkenti, azonban a proliferáció fokozásához a syndecan-1 és -2 egyidejű overexpressziójára szükség van. A syndecan-1-transzfektáció hatására az IGF1R foszforilációja és az Ets-1 expressziója is fokozódott. Ugyanezt a syndecan-2 overexpresszáltatásakor nem tapasztaltam. Ez arra utal, hogy az IGF1R és az Ets-1 a syndecan-2 bioszintézisének indukálásában vehetnek részt. Ez a munka elsőként számol be egy olyan mesenchyma-eredetű sejtvonalról, amelyben a syndecan-1 a syndecan-2 indukciója fokozza a malignitást.

## 9 Summary

Syndecans are transmembrane heparan sulphate proteoglycans. Their role in the development of the malignant phenotype is ambiguous and depends upon the particular type of cancer. Nevertheless, syndecans are promising targets in cancer therapy, and it is important to elucidate the mechanisms controlling their various cellular effects. Both syndecan-1 and syndecan-2 promote malignancy of HT-1080 human fibrosarcoma cells, by increasing the proliferation rate and the metastatic potential and migratory ability, respectively. To better understand their tumour promoter role in this cell line, syndecan expression levels were modulated in HT-1080 cells and their growth rate and chemotaxis capacity were studied. For *in vivo* testing, syndecan-1 overexpressing cells were also inoculated into mice. Overexpression of full length or truncated syndecan-1 lacking the entire ectodomain but containing the four juxtamembrane amino acids promoted proliferation and chemotaxis. These effects were accompanied by a marked increase in syndecan-2 protein expression. Silencing of syndecan-2 inhibited migration, and slightly proliferation, which effect was not reverted by transfection of the truncated syndecan-1 at the same time. Antisense silencing of syndecan-1 did not inhibit cell migration or proliferation. *In vivo*, both full length and truncated syndecan-1 increased tumour growth and metastatic rate. Based on our *in vitro* results, we conclude that the tumour promoter role of syndecan-1 observed in HT-1080 cells is independent of its ectodomain; however, *in vivo* the presence of the ectodomain further increases tumour proliferation. The enhanced migratory ability induced by syndecan-1 overexpression is mediated by syndecan-2. However, overexpression of both syndecan-1 and -2 are needed to promote proliferation. Overexpression of syndecan-1 also leads to activation of IGF1R and increased expression of Ets-1. These changes were not evident when syndecan-2 was overexpressed. These findings suggest the involvement of IGF1R and Ets-1 in the induction of syndecan-2 synthesis.

This work demonstrates for the first time that syndecan-1 enhances malignancy of a mesenchymal tumour cell line, via induction of syndecan-2 expression.

## 10 Irodalomjegyzék

1. Yurchenco PD, Schittny JC. (1990) Molecular architecture of basement membranes. *FASEB J*, 4, 1577-1590.
2. Tlsty TD, Hein PW. (2001) Know thy neighbor: stromal cells can contribute oncogenic signals. *Curr Opin Genet Dev*, 11, 54-59.
3. Olumi AF, Grossfeld GD, Hayward SW, Carroll PR, Tlsty TD Cunha GR. (1999) Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. *Cancer Res*, 59, 5002-5011.
4. Iozzo RV. (1985) Neoplastic modulation of extracellular matrix. Colon carcinoma cells release polypeptides that alter proteoglycan metabolism in colon fibroblasts. *J Biol Chem*, 260, 7464-7473.
5. Castellani AA, Zonta L, Balduini C, Laterza L. (1966) The protein-polysaccharide linkages in some proteoglycans. *Experientia*, 22, 225.
6. Eichwald E. (1865) *Liebigs Ann.*, 184, 177.
7. Obolensky S. (1871) *Med. chem. Unters. v. Hoppe Zeyler*, 4, 590.
8. Wolfenden RN. (1884) *J. Physiol.*, 5, 91-102.
9. Bray HG, Gregory JE, Stacey M. (1944) Chemistry of tissues: I. Chondroitin from cartilage. *Biochem J*, 38, 142-146.
10. Meyer K. (1938) The chemistry and Biology of Mucopolysaccharides. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 6, 91-102.
11. Jeanloz RW. (1960) The nomenclature of mucopolysaccharides. *Arthritis Rheum*, 3, 233-237.
12. Snow AD, Willmer J, Kisilevsky R. (1987) Sulfated glycosaminoglycans: a common constituent of all amyloids? *Lab Invest*, 56, 120-123.
13. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. (2007) Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol*, 7, 678-689.
14. Gandhi NS, Mancera RL. (2008) The structure of glycosaminoglycans and their interactions with proteins. *Chem Biol Drug Des*, 72, 455-482.
15. Kudchadkar R, Gonzalez R, Lewis KD. (2008) PI-88: a novel inhibitor of angiogenesis. *Expert Opin Investig Drugs*, 17, 1769-1776.

16. Imberty A, Lortat-Jacob H, Perez S. (2007) Structural view of glycosaminoglycan-protein interactions. *Carbohydr Res*, 342, 430-439.
17. Kovalszky I, Dudas J, Gallai M, Hollosi P, Tatrai P, Tatrai E Schaff Z. (2004) [Proteoglycans in the liver]. *Magy Onkol*, 48, 207-213.
18. Lindahl U, Kusche-Gullberg M, Kjellen L. (1998) Regulated diversity of heparan sulfate. *J Biol Chem*, 273, 24979-24982.
19. Zhang L. (2010) Glycosaminoglycan (GAG) biosynthesis and GAG-binding proteins. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 93, 1-17.
20. Jackson RL, Busch SJ, Cardin AD. (1991) Glycosaminoglycans: molecular properties, protein interactions, and role in physiological processes. *Physiol Rev*, 71, 481-539.
21. Casu B, Lindahl U. (2001) Structure and biological interactions of heparin and heparan sulfate. *Adv Carbohydr Chem Biochem*, 57, 159-206.
22. Kjellen L, Lindahl U. (1991) Proteoglycans: structures and interactions. *Annu Rev Biochem*, 60, 443-475.
23. Beauvais DM, Rapraeger AC. (2004) Syndecans in tumor cell adhesion and signaling. *Reprod Biol Endocrinol*, 2, 3.
24. Iozzo RV, San Antonio JD. (2001) Heparan sulfate proteoglycans: heavy hitters in the angiogenesis arena. *J Clin Invest*, 108, 349-355.
25. Iozzo RV, Sanderson RD. (2011) Proteoglycans in cancer biology, tumour microenvironment and angiogenesis. *J Cell Mol Med*, 15, 1013-1031.
26. Friedl A. (2010) Proteoglycans: master modulators of paracrine fibroblast-carcinoma cell interactions. *Semin Cell Dev Biol*, 21, 66-71.
27. Wang J, Svendsen A, Kmiecik J, Immervoll H, Skaftnesmo KO, Planaguma J, Reed RK, Bjerkvig R, Miletic H, Enger PO, Rygh CB, Chekenya M. (2011) Targeting the NG2/CSPG4 proteoglycan retards tumour growth and angiogenesis in preclinical models of GBM and melanoma. *PLoS One*, 6, e23062.
28. Rapraeger A, Jalkanen M, Endo E, Koda J, Bernfield M. (1985) The cell surface proteoglycan from mouse mammary epithelial cells bears chondroitin sulfate and heparan sulfate glycosaminoglycans. *J Biol Chem*, 260, 11046-11052.

29. Saunders S, Jalkanen M, O'Farrell S, Bernfield M. (1989) Molecular cloning of syndecan, an integral membrane proteoglycan. *J Cell Biol*, 108, 1547-1556.
30. Marynen P, Zhang J, Cassiman JJ, Van den Berghe H, David G. (1989) Partial primary structure of the 48- and 90-kilodalton core proteins of cell surface-associated heparan sulfate proteoglycans of lung fibroblasts. Prediction of an integral membrane domain and evidence for multiple distinct core proteins at the cell surface of human lung fibroblasts. *J Biol Chem*, 264, 7017-7024.
31. Mali M, Jaakkola P, Arvilommi AM, Jalkanen M. (1990) Sequence of human syndecan indicates a novel gene family of integral membrane proteoglycans. *J Biol Chem*, 265, 6884-6889.
32. Putnam NH, Butts T, Ferrier DE, Furlong RF, Hellsten U, Kawashima T, Robinson-Rechavi M, Shoguchi E, Terry A, Yu JK, Benito-Gutierrez EL, Dubchak I, Garcia-Fernandez J, Gibson-Brown JJ, Grigoriev IV, Horton AC, de Jong PJ, Jurka J, Kapitonov VV, Kohara Y, Kuroki Y, Lindquist E, Lucas S, Osoegawa K, Pennacchio LA, Salamov AA, Satou Y, Sauka-Spengler T, Schmutz J, Shin IT, Toyoda A, Bronner-Fraser M, Fujiyama A, Holland LZ, Holland PW, Satoh N, Rokhsar DS. (2008) The amphioxus genome and the evolution of the chordate karyotype. *Nature*, 453, 1064-1071.
33. Koshier RA. (1998) Syndecan-3 in limb skeletal development. *Microscopy research and technique*, 43, 123-130.
34. Hall BK, Miyake T. (1995) Divide, accumulate, differentiate: cell condensation in skeletal development revisited. *The International journal of developmental biology*, 39, 881-893.
35. Bernfield M, Gotte M, Park PW, Reizes O, Fitzgerald ML, Lincecum J, Zako M. (1999) Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Biochem*, 68, 729-777.
36. Couchman JR. (2003) Syndecans: proteoglycan regulators of cell-surface microdomains? *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4, 926-937.
37. Kokenyesi R, Bernfield M. (1994) Core protein structure and sequence determine the site and presence of heparan sulfate and chondroitin sulfate on syndecan-1. *J Biol Chem*, 269, 12304-12309.

38. Shworak NW, Shirakawa M, Mulligan RC, Rosenberg RD. (1994) Characterization of ryudocan glycosaminoglycan acceptor sites. *J Biol Chem*, 269, 21204-21214.
39. Beauvais DM, Ell BJ, McWhorter AR, Rapraeger AC. (2009) Syndecan-1 regulates alphavbeta3 and alphavbeta5 integrin activation during angiogenesis and is blocked by synstatin, a novel peptide inhibitor. *J Exp Med*, 206, 691-705.
40. Reiland J, Sanderson RD, Waguespack M, Barker SA, Long R, Carson DD, Marchetti D. (2004) Heparanase degrades syndecan-1 and perlecan heparan sulfate: functional implications for tumor cell invasion. *J Biol Chem*, 279, 8047-8055.
41. Lambaerts K, Wilcox-Adelman SA, Zimmermann P. (2009) The signaling mechanisms of syndecan heparan sulfate proteoglycans. *Curr Opin Cell Biol*, 21, 662-669.
42. Reiland J, Ott VL, Lebakken CS, Yeaman C, McCarthy J, Rapraeger AC. (1996) Pervanadate activation of intracellular kinases leads to tyrosine phosphorylation and shedding of syndecan-1. *Biochem J*, 319 ( Pt 1), 39-47.
43. Choi S, Lee E, Kwon S, Park H, Yi JY, Kim S, Han IO, Yun Y, Oh ES. (2005) Transmembrane domain-induced oligomerization is crucial for the functions of syndecan-2 and syndecan-4. *J Biol Chem*, 280, 42573-42579.
44. Dews IC, Mackenzie KR. (2007) Transmembrane domains of the syndecan family of growth factor coreceptors display a hierarchy of homotypic and heterotypic interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 20782-20787.
45. Lebakken CS, Rapraeger AC. (1996) Syndecan-1 mediates cell spreading in transfected human lymphoblastoid (Raji) cells. *J Cell Biol*, 132, 1209-1221.
46. Yamashita Y, Oritani K, Miyoshi EK, Wall R, Bernfield M, Kincade PW. (1999) Syndecan-4 is expressed by B lineage lymphocytes and can transmit a signal for formation of dendritic processes. *J Immunol*, 162, 5940-5948.
47. Horowitz A, Simons M. (1998) Regulation of syndecan-4 phosphorylation in vivo. *J Biol Chem*, 273, 10914-10918.
48. Multhaupt HA, Yoneda A, Whiteford JR, Oh ES, Lee W, Couchman JR. (2009) Syndecan signaling: when, where and why? *J Physiol Pharmacol*, 60 Suppl 4, 31-38.

49. Maday S, Anderson E, Chang HC, Shorter J, Satoh A, Sfakianos J, Folsch H, Anderson JM, Walther Z, Mellman I. (2008) A PDZ-binding motif controls basolateral targeting of syndecan-1 along the biosynthetic pathway in polarized epithelial cells. *Traffic*, 9, 1915-1924.
50. Jalkanen M, Rapraeger A, Saunders S, Bernfield M. (1987) Cell surface proteoglycan of mouse mammary epithelial cells is shed by cleavage of its matrix-binding ectodomain from its membrane-associated domain. *J Cell Biol*, 105, 3087-3096.
51. Fitzgerald ML, Wang Z, Park PW, Murphy G, Bernfield M. (2000) Shedding of syndecan-1 and -4 ectodomains is regulated by multiple signaling pathways and mediated by a TIMP-3-sensitive metalloproteinase. *J Cell Biol*, 148, 811-824.
52. Vassilakopoulos TP, Kyrtsolis MC, Papadogiannis A, Nadali G, Angelopoulou MK, Tzenou T, Dimopoulou MN, Siakantaris MP, Kontopidou FN, Kalpadakis C, Kokoris SI, Dimitriadou EM, Tsaftaris P, Pizzolo G, Pangalis GA. (2005) Serum levels of soluble syndecan-1 in Hodgkin's lymphoma. *Anticancer Res*, 25, 4743-4746.
53. Joensuu H, Anttonen A, Eriksson M, Makitaro R, Alfthan H, Kinnula V, Leppa S. (2002) Soluble syndecan-1 and serum basic fibroblast growth factor are new prognostic factors in lung cancer. *Cancer Res*, 62, 5210-5217.
54. Anttonen A, Leppa S, Ruotsalainen T, Alfthan H, Mattson K, Joensuu H. (2003) Pretreatment serum syndecan-1 levels and outcome in small cell lung cancer patients treated with platinum-based chemotherapy. *Lung Cancer*, 41, 171-177.
55. Kim JM, Lee JA, Cho IS, Ihm CH. (2010) Soluble syndecan-1 at diagnosis and during follow up of multiple myeloma: a single institution study. *Korean J Hematol*, 45, 115-119.
56. Subramanian SV, Fitzgerald ML, Bernfield M. (1997) Regulated shedding of syndecan-1 and -4 ectodomains by thrombin and growth factor receptor activation. *J Biol Chem*, 272, 14713-14720.
57. Manon-Jensen T, Itoh Y, Couchman JR. (2010) Proteoglycans in health and disease: the multiple roles of syndecan shedding. *FEBS J*, 277, 3876-3889.

58. Chen P, Abacherli LE, Nadler ST, Wang Y, Li Q, Parks WC. (2009) MMP7 shedding of syndecan-1 facilitates re-epithelialization by affecting alpha(2)beta(1) integrin activation. *PLoS One*, 4, e6565.
59. Brule S, Charnaux N, Sutton A, Ledoux D, Chaigneau T, Saffar L, Gattegno L. (2006) The shedding of syndecan-4 and syndecan-1 from HeLa cells and human primary macrophages is accelerated by SDF-1/CXCL12 and mediated by the matrix metalloproteinase-9. *Glycobiology*, 16, 488-501.
60. Pruessmeyer J, Martin C, Hess FM, Schwarz N, Schmidt S, Kogel T, Hoettecke N, Schmidt B, Sechi A, Uhlig S, Ludwig A. (2010) A disintegrin and metalloproteinase 17 (ADAM17) mediates inflammation-induced shedding of syndecan-1 and -4 by lung epithelial cells. *J Biol Chem*, 285, 555-564.
61. Rodriguez-Manzaneque JC, Carpizo D, Plaza-Calonge Mdel C, Torres-Collado AX, Thai SN, Simons M, Horowitz A, Iruela-Arispe ML. (2009) Cleavage of syndecan-4 by ADAMTS1 provokes defects in adhesion. *Int J Biochem Cell Biol*, 41, 800-810.
62. Cohen I, Pappo O, Elkin M, San T, Bar-Shavit R, Hazan R, Peretz T, Vlodaysky I, Abramovitch R. (2006) Heparanase promotes growth, angiogenesis and survival of primary breast tumors. *Int J Cancer*, 118, 1609-1617.
63. Zetser A, Bashenko Y, Miao HQ, Vlodaysky I, Ilan N. (2003) Heparanase affects adhesive and tumorigenic potential of human glioma cells. *Cancer Res*, 63, 7733-7741.
64. Yang Y, Macleod V, Miao HQ, Theus A, Zhan F, Shaughnessy JD, Jr., Sawyer J, Li JP, Zcharia E, Vlodaysky I, Sanderson RD. (2007) Heparanase enhances syndecan-1 shedding: a novel mechanism for stimulation of tumor growth and metastasis. *J Biol Chem*, 282, 13326-13333.
65. Purushothaman A, Chen L, Yang Y, Sanderson RD. (2008) Heparanase stimulation of protease expression implicates it as a master regulator of the aggressive tumor phenotype in myeloma. *J Biol Chem*, 283, 32628-32636.
66. Purushothaman A, Uyama T, Kobayashi F, Yamada S, Sugahara K, Rapraeger AC, Sanderson RD. (2010) Heparanase-enhanced shedding of syndecan-1 by myeloma cells promotes endothelial invasion and angiogenesis. *Blood*, 115, 2449-2457.



67. Endo K, Takino T, Miyamori H, Kinsen H, Yoshizaki T, Furukawa M, Sato H. (2003) Cleavage of syndecan-1 by membrane type matrix metalloproteinase-1 stimulates cell migration. *J Biol Chem*, 278, 40764-40770.
68. Wang Z, Gotte M, Bernfield M, Reizes O. (2005) Constitutive and accelerated shedding of murine syndecan-1 is mediated by cleavage of its core protein at a specific juxtamembrane site. *Biochemistry*, 44, 12355-12361.
69. Choi S, Lee H, Choi JR, Oh ES. (2010) Shedding; towards a new paradigm of syndecan function in cancer. *BMB Rep*, 43, 305-310.
70. Kim CW, Goldberger OA, Gallo RL, Bernfield M. (1994) Members of the syndecan family of heparan sulfate proteoglycans are expressed in distinct cell-, tissue-, and development-specific patterns. *Mol Biol Cell*, 5, 797-805.
71. Yung S, Woods A, Chan TM, Davies M, Williams JD, Couchman JR. (2001) Syndecan-4 up-regulation in proliferative renal disease is related to microfilament organization. *FASEB J*, 15, 1631-1633.
72. Julien MA, Wang P, Haller CA, Wen J, Chaikof EL. (2007) Mechanical strain regulates syndecan-4 expression and shedding in smooth muscle cells through differential activation of MAP kinase signaling pathways. *Am J Physiol Cell Physiol*, 292, C517-525.
73. Woods A, Couchman JR. (1994) Syndecan 4 heparan sulfate proteoglycan is a selectively enriched and widespread focal adhesion component. *Mol Biol Cell*, 5, 183-192.
74. Vainio S, Jalkanen M, Bernfield M, Saxen L. (1992) Transient expression of syndecan in mesenchymal cell aggregates of the embryonic kidney. *Dev Biol*, 152, 221-232.
75. Vainio S, Jalkanen M, Thesleff I. (1989) Syndecan and tenascin expression is induced by epithelial-mesenchymal interactions in embryonic tooth mesenchyme. *J Cell Biol*, 108, 1945-1953.
76. Bai XM, Van der Schueren B, Cassiman JJ, Van den Berghe H, David G. (1994) Differential expression of multiple cell-surface heparan sulfate proteoglycans during embryonic tooth development. *J Histochem Cytochem*, 42, 1043-1054.

77. Solursh M, Reiter RS, Jensen KL, Kato M, Bernfield M. (1990) Transient expression of a cell surface heparan sulfate proteoglycan (syndecan) during limb development. *Developmental biology*, 140, 83-92.
78. David G, Bai XM, Van der Schueren B, Marynen P, Cassiman JJ, Van den Berghe H. (1993) Spatial and temporal changes in the expression of fibroglycan (syndecan-2) during mouse embryonic development. *Development*, 119, 841-854.
79. Gould SE, Upholt WB, Kosher RA. (1995) Characterization of chicken syndecan-3 as a heparan sulfate proteoglycan and its expression during embryogenesis. *Developmental biology*, 168, 438-451.
80. Kojima T. (2000) Molecular biology of ryudocan, an endothelial heparan sulfate proteoglycan. *Semin Thromb Hemost*, 26, 67-73.
81. Steer DL, Shah MM, Bush KT, Stuart RO, Sampogna RV, Meyer TN, Schwesinger C, Bai X, Esko JD, Nigam SK. (2004) Regulation of ureteric bud branching morphogenesis by sulfated proteoglycans in the developing kidney. *Dev Biol*, 272, 310-327.
82. De Luca M, Klimentidis YC, Casazza K, Chambers MM, Cho R, Harbison ST, Jumbo-Lucioni P, Zhang S, Leips J, Fernandez JR. (2010) A conserved role for syndecan family members in the regulation of whole-body energy metabolism. *PLoS One*, 5, e11286.
83. Bellin R, Capila I, Lincecum J, Park PW, Reizes O, Bernfield MR. (2002) Unlocking the secrets of syndecans: transgenic organisms as a potential key. *Glycoconj J*, 19, 295-304.
84. Schwartz GJ. (2000) The role of gastrointestinal vagal afferents in the control of food intake: current prospects. *Nutrition*, 16, 866-873.
85. Olivares GH, Carrasco H, Aroca F, Carvallo L, Segovia F, Larrain J. (2009) Syndecan-1 regulates BMP signaling and dorso-ventral patterning of the ectoderm during early *Xenopus* development. *Dev Biol*, 329, 338-349.
86. Kramer KL, Barnette JE, Yost HJ. (2002) PKC $\gamma$  regulates syndecan-2 inside-out signaling during *xenopus* left-right development. *Cell*, 111, 981-990.
87. Chen E, Hermanson S, Ekker SC. (2004) Syndecan-2 is essential for angiogenic sprouting during zebrafish development. *Blood*, 103, 1710-1719.

88. Munoz R, Larrain J. (2006) xSyndecan-4 regulates gastrulation and neural tube closure in *Xenopus* embryos. *ScientificWorldJournal*, 6, 1298-1301.
89. Munoz R, Moreno M, Oliva C, Orbenes C, Larrain J. (2006) Syndecan-4 regulates non-canonical Wnt signalling and is essential for convergent and extension movements in *Xenopus* embryos. *Nat Cell Biol*, 8, 492-500.
90. Haynes A, 3rd, Ruda F, Oliver J, Hamood AN, Griswold JA, Park PW, Rumbaugh KP. (2005) Syndecan 1 shedding contributes to *Pseudomonas aeruginosa* sepsis. *Infect Immun*, 73, 7914-7921.
91. Park PW, Pier GB, Hinkes MT, Bernfield M. (2001) Exploitation of syndecan-1 shedding by *Pseudomonas aeruginosa* enhances virulence. *Nature*, 411, 98-102.
92. Stepp MA, Gibson HE, Gala PH, Iglesia DD, Pajooohesh-Ganji A, Pal-Ghosh S, Brown M, Aquino C, Schwartz AM, Goldberger O, Hinkes MT, Bernfield M. (2002) Defects in keratinocyte activation during wound healing in the syndecan-1-deficient mouse. *Journal of cell science*, 115, 4517-4531.
93. Cornelison DD, Wilcox-Adelman SA, Goetinck PF, Rauvala H, Rapraeger AC, Olwin BB. (2004) Essential and separable roles for Syndecan-3 and Syndecan-4 in skeletal muscle development and regeneration. *Genes Dev*, 18, 2231-2236.
94. Hienola A, Tumova S, Kuleskiy E, Rauvala H. (2006) N-syndecan deficiency impairs neural migration in brain. *J Cell Biol*, 174, 569-580.
95. Echtermeyer F, Streit M, Wilcox-Adelman S, Saoncella S, Denhez F, Detmar M, Goetinck P. (2001) Delayed wound repair and impaired angiogenesis in mice lacking syndecan-4. *J Clin Invest*, 107, R9-R14.
96. Papay J, Krenacs T, Moldvay J, Stelkovics E, Furak J, Molnar B, Kopper L. (2007) Immunophenotypic profiling of nonsmall cell lung cancer progression using the tissue microarray approach. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 15, 19-30.
97. Shariat SF, Svatek RS, Kabbani W, Walz J, Lotan Y, Karakiewicz PI, Roehrborn CG. (2008) Prognostic value of syndecan-1 expression in patients treated with radical prostatectomy. *BJU Int*, 101, 232-237.
98. Brimo F, Vollmer RT, Friszt M, Corcos J, Bismar TA. (2009) Syndecan-1 expression in prostate cancer and its value as biomarker for disease progression. *BJU Int*.

99. McDermott SP, Ranheim EA, Leatherberry VS, Khwaja SS, Klos KS, Alexander CM. (2007) Juvenile syndecan-1 null mice are protected from carcinogen-induced tumor development. *Oncogene*, 26, 1407-1416.
100. Lundin M, Nordling S, Lundin J, Isola J, Wiksten JP, Haglund C. (2005) Epithelial syndecan-1 expression is associated with stage and grade in colorectal cancer. *Oncology*, 68, 306-313.
101. Pap Z, Pavai Z, Denes L, Kovalszky I, Jung J. (2009) An immunohistochemical study of colon adenomas and carcinomas: E-cadherin, Syndecan-1, Ets-1. *Pathol Oncol Res*, 15, 579-587.
102. Matsumoto A, Ono M, Fujimoto Y, Gallo RL, Bernfield M, Kohgo Y. (1997) Reduced expression of syndecan-1 in human hepatocellular carcinoma with high metastatic potential. *Int J Cancer*, 74, 482-491.
103. Popovic A, Demirovic A, Spajic B, Stimac G, Kruslin B, Tomas D. (2009) Expression and prognostic role of syndecan-2 in prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis*.
104. Choi Y, Kim H, Chung H, Hwang JS, Shin JA, Han IO, Oh ES. (2009) Syndecan-2 regulates cell migration in colon cancer cells through Tiam1-mediated Rac activation. *Biochemical and biophysical research communications*.
105. Lee JH, Park H, Chung H, Choi S, Kim Y, Yoo H, Kim TY, Hann HJ, Seong I, Kim J, Kang KG, Han IO, Oh ES. (2009) Syndecan-2 regulates the migratory potential of melanoma cells. *J Biol Chem*, 284, 27167-27175.
106. Park H, Kim Y, Lim Y, Han I, Oh ES. (2002) Syndecan-2 mediates adhesion and proliferation of colon carcinoma cells. *J Biol Chem*, 277, 29730-29736.
107. Orosco A, Fromigue O, Bazille C, Entz-Werle N, Levillain P, Marie PJ, Modrowski D. (2007) Syndecan-2 affects the basal and chemotherapy-induced apoptosis in osteosarcoma. *Cancer Res*, 67, 3708-3715.
108. Munesue S, Kusano Y, Oguri K, Itano N, Yoshitomi Y, Nakanishi H, Yamashina I, Okayama M. (2002) The role of syndecan-2 in regulation of actin-cytoskeletal organization of Lewis lung carcinoma-derived metastatic clones. *Biochem J*, 363, 201-209.

109. Munesue S, Yoshitomi Y, Kusano Y, Koyama Y, Nishiyama A, Nakanishi H, Miyazaki K, Ishimaru T, Miyaura S, Okayama M, Oguri K. (2007) A novel function of syndecan-2, suppression of matrix metalloproteinase-2 activation, which causes suppression of metastasis. *J Biol Chem*, 282, 28164-28174.
110. Pollock R, Kufe D, Weichselbaum R, Robert B, Ted G (eds.) (2003) *Holland-Frei Cancer Medicine*. 6 ed. BC Decker, Hamilton.
111. Prockop DJ. (1997) Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*, 276, 71-74.
112. Mohseny AB, Hogendoorn PC. (2011) Concise review: mesenchymal tumors: when stem cells go mad. *Stem cells*, 29, 397-403.
113. Orosz Z, Kopper L. (2001) Syndecan-1 expression in different soft tissue tumours. *Anticancer Res*, 21, 733-737.
114. Kumar-Singh S, Jacobs W, Dhaene K, Weyn B, Bogers J, Weyler J, Van Marck E. (1998) Syndecan-1 expression in malignant mesothelioma: correlation with cell differentiation, WT1 expression, and clinical outcome. *J Pathol*, 186, 300-305.
115. Dobra K, Nurminen M, Hjerpe A. (2003) Growth factors regulate the expression profile of their syndecan co-receptors and the differentiation of mesothelioma cells. *Anticancer Res*, 23, 2435-2444.
116. Zong F, Fthenou E, Castro J, Peterfia B, Kovalszky I, Szilak L, Tzanakakis G, Dobra K. (2009) Effect of syndecan-1 overexpression on mesenchymal tumour cell proliferation with focus on different functional domains. *Cell Prolif*.
117. Zong F, Fthenou E, Mundt F, Szatmari T, Kovalszky I, Szilak L, Brodin D, Tzanakakis G, Hjerpe A, Dobra K. (2011) Specific syndecan-1 domains regulate mesenchymal tumor cell adhesion, motility and migration. *PLoS One*, 6, e14816.
118. Nunez AL, Siegal GP, Reddy VV, Wei S. (2012) CD138 (syndecan-1) expression in bone-forming tumors. *American journal of clinical pathology*, 137, 423-428.
119. Peterfia B, Hollosi P, Szilak L, Timar F, Paku S, Jeney A, Kovalszky I. (2006) [Role of syndecan-1 proteoglycan in the invasiveness of HT-1080 fibrosarcoma]. *Magy Onkol*, 50, 115-120.

120. Park H, Han I, Kwon HJ, Oh ES. (2005) Focal adhesion kinase regulates syndecan-2-mediated tumorigenic activity of HT1080 fibrosarcoma cells. *Cancer Res*, 65, 9899-9905.
121. Lovell R, Dunn JA, Begum G, Barth NJ, Plant T, Moss PA, Drayson MT, Pratt G. (2005) Soluble syndecan-1 level at diagnosis is an independent prognostic factor in multiple myeloma and the extent of fall from diagnosis to plateau predicts for overall survival. *Br J Haematol*, 130, 542-548.
122. Aref S, Goda T, El-Sherbiny M. (2003) Syndecan-1 in multiple myeloma: relationship to conventional prognostic factors. *Hematology*, 8, 221-228.
123. Lutz RJ, Whiteman KR. (2009) Antibody-maytansinoid conjugates for the treatment of myeloma. *MAbs*, 1, 548-551.
124. Fletcher CDM UK, Mertens F. (2002) In Fletcher Cdm Uk, Mertens F. (ed.), 1. World Health Organization. *Classification of Tumours*. IARC Press, Lyon, pp. 12-224.
125. Rasheed S, Nelson-Rees WA, Toth EM, Arnstein P, Gardner MB. (1974) Characterization of a newly derived human sarcoma cell line (HT-1080). *Cancer*, 33, 1027-1033.
126. Uphoff CC, Drexler HG. (2002) Detection of mycoplasma in leukemia-lymphoma cell lines using polymerase chain reaction. *Leukemia*, 16, 289-293.
127. Feldman JP, Goldwasser R, Mark S, Schwartz J, Orion I. (2009), *J Appl Quant Methods*. Association for Development through Science and Education, Vol. 4, pp. 455-462.
128. Bradford MM. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-254.
129. Leivonen M, Lundin J, Nordling S, von Boguslawski K, Haglund C. (2004) Prognostic value of syndecan-1 expression in breast cancer. *Oncology*, 67, 11-18.
130. Juuti A, Nordling S, Lundin J, Louhimo J, Haglund C. (2005) Syndecan-1 expression--a novel prognostic marker in pancreatic cancer. *Oncology*, 68, 97-106.

131. Wiksten JP, Lundin J, Nordling S, Lundin M, Kokkola A, von Boguslawski K, Haglund C. (2001) Epithelial and stromal syndecan-1 expression as predictor of outcome in patients with gastric cancer. *Int J Cancer*, 95, 1-6.
132. Davies EJ, Blackhall FH, Shanks JH, David G, McGown AT, Swindell R, Slade RJ, Martin-Hirsch P, Gallagher JT, Jayson GC. (2004) Distribution and clinical significance of heparan sulfate proteoglycans in ovarian cancer. *Clin Cancer Res*, 10, 5178-5186.
133. Mathe M, Suba Z, Nemeth Z, Tatrai P, Fule T, Borgulya G, Barabas J, Kovalszky I. (2006) Stromal syndecan-1 expression is an adverse prognostic factor in oral carcinomas. *Oral Oncol*, 42, 493-500.
134. Hanyu A, Kojima K, Hatake K, Nomura K, Murayama H, Ishikawa Y, Miyata S, Ushijima M, Matsuura M, Ogata E, Miyazawa K, Imamura T. (2009) Functional in vivo optical imaging of tumor angiogenesis, growth, and metastasis prevented by administration of anti-human VEGF antibody in xenograft model of human fibrosarcoma HT1080 cells. *Cancer Sci*, 100, 2085-2092.
135. Nikolova V, Koo CY, Ibrahim SA, Wang Z, Spillmann D, Dreier R, Kelsch R, Fischgrabe J, Smollich M, Rossi LH, Sibrowski W, Wulfing P, Kiesel L, Yip GW, Gotte M. (2009) Differential roles for membrane-bound and soluble syndecan-1 (CD138) in breast cancer progression. *Carcinogenesis*, 30, 397-407.
136. Langford JK, Yang Y, Kieber-Emmons T, Sanderson RD. (2005) Identification of an invasion regulatory domain within the core protein of syndecan-1. *J Biol Chem*, 280, 3467-3473.
137. McQuade KJ, Beauvais DM, Burbach BJ, Rapraeger AC. (2006) Syndecan-1 regulates alphavbeta5 integrin activity in B82L fibroblasts. *Journal of cell science*, 119, 2445-2456.
138. Liu W, Litwack ED, Stanley MJ, Langford JK, Lander AD, Sanderson RD. (1998) Heparan sulfate proteoglycans as adhesive and anti-invasive molecules. Syndecans and glypican have distinct functions. *J Biol Chem*, 273, 22825-22832.

139. Su G, Blaine SA, Qiao D, Friedl A. (2008) Membrane type 1 matrix metalloproteinase-mediated stromal syndecan-1 shedding stimulates breast carcinoma cell proliferation. *Cancer Res*, 68, 9558-9565.
140. Keyomarsi K, Herliczek TW. (1997) The role of cyclin E in cell proliferation, development and cancer. *Prog Cell Cycle Res*, 3, 171-191.
141. Lents NH, Gorges LL, Baldassare JJ. (2006) Reverse mutational analysis reveals threonine-373 as a potentially sufficient phosphorylation site for inactivation of the retinoblastoma tumor suppressor protein (pRB). *Cell Cycle*, 5, 1699-1707.
142. Hoshino R, Tanimura S, Watanabe K, Kataoka T, Kohno M. (2001) Blockade of the extracellular signal-regulated kinase pathway induces marked G1 cell cycle arrest and apoptosis in tumor cells in which the pathway is constitutively activated: up-regulation of p27(Kip1). *J Biol Chem*, 276, 2686-2692.
143. Kusano Y, Yoshitomi Y, Munesue S, Okayama M, Oguri K. (2004) Cooperation of syndecan-2 and syndecan-4 among cell surface heparan sulfate proteoglycans in the actin cytoskeletal organization of Lewis lung carcinoma cells. *J Biochem*, 135, 129-137.
144. Averbeck M, Gebhardt C, Anderegg U, Termeer C, Sleeman JP, Simon JC. (2007) Switch in syndecan-1 and syndecan-4 expression controls maturation associated dendritic cell motility. *Exp Dermatol*, 16, 580-589.
145. Bai F, Guo X, Yang L, Wang J, Shi Y, Zhang F, Zhai H, Lu Y, Xie H, Wu K, Fan D. (2007) Establishment and characterization of a high metastatic potential in the peritoneum for human gastric cancer by orthotopic tumor cell implantation. *Dig Dis Sci*, 52, 1571-1578.
146. Sebestyen A, Gallai M, Knittel T, Ambrust T, Ramadori G, Kovalszky I. (2000) Cytokine regulation of syndecan expression in cells of liver origin. *Cytokine*, 12, 1557-1560.
147. Beauvais DM, Rapraeger AC. (2010) Syndecan-1 couples the insulin-like growth factor-1 receptor to inside-out integrin activation. *Journal of cell science*, 123, 3796-3807.
148. Hahne JC, Okuducu AF, Sahin A, Fafeur V, Kiriakidis S, Wernert N. (2008) The transcription factor ETS-1: its role in tumour development and strategies for its inhibition. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 8, 1095-1105.



149. Ishikawa T, Kramer RH. (2010) Sdc1 negatively modulates carcinoma cell motility and invasion. *Exp Cell Res*, 316, 951-965.
150. Stepp MA, Daley WP, Bernstein AM, Pal-Ghosh S, Tadvalkar G, Shashurin A, Palsen S, Jurjus RA, Larsen M. (2010) Syndecan-1 regulates cell migration and fibronectin fibril assembly. *Exp Cell Res*, 316, 2322-2339.
151. Charni F, Friand V, Haddad O, Hlawaty H, Martin L, Vassy R, Oudar O, Gattegno L, Charnaux N, Sutton A. (2009) Syndecan-1 and syndecan-4 are involved in RANTES/CCL5-induced migration and invasion of human hepatoma cells. *Biochim Biophys Acta*, 1790, 1314-1326.
152. Contreras HR, Fabre M, Granes F, Casaroli-Marano R, Rocamora N, Herreros AG, Reina M, Vilaro S. (2001) Syndecan-2 expression in colorectal cancer-derived HT-29 M6 epithelial cells induces a migratory phenotype. *Biochemical and biophysical research communications*, 286, 742-751.
153. Peretti T, Waisberg J, Mader AM, de Matos LL, da Costa RB, Conceicao GM, Lopes AC, Nader HB, Pinhal MA. (2008) Heparanase-2, syndecan-1, and extracellular matrix remodeling in colorectal carcinoma. *European journal of gastroenterology & hepatology*, 20, 756-765.
154. Hashimoto Y, Skacel M, Adams JC. (2008) Association of loss of epithelial syndecan-1 with stage and local metastasis of colorectal adenocarcinomas: an immunohistochemical study of clinically annotated tumors. *BMC cancer*, 8, 185.
155. Choi S, Kim JY, Park JH, Lee ST, Han IO, Oh ES. (2012) The matrix metalloproteinase-7 regulates the extracellular shedding of syndecan-2 from colon cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 417, 1260-1264.
156. Choi S, Kim Y, Park H, Han IO, Chung E, Lee SY, Kim YB, Lee JW, Oh ES, Yi JY. (2009) Syndecan-2 overexpression regulates adhesion and migration through cooperation with integrin alpha2. *Biochemical and biophysical research communications*, 384, 231-235.
157. Patterson AM, Delday MI, van Kuppevelt TH, Loh G, Blaut M, Haller D, Grant G, Kelly D. (2011) Expression of heparan sulfate proteoglycans in murine models of experimental colitis. *Inflammatory bowel diseases*.

## 11 Saját publikációk jegyzéke

A dolgozat témájába vágó közlemények:

**Péterfia B**, Hollósi P, Szilák L, Timár F, Paku S, Jeney A, Kovalszky I. *A syndecan-1 proteoglikán hatása a HT-1080 fibroszarkóma invazivitására.*

Magy Onkol. 2006;50(2):115-20.

**Péterfia B**, Füle T, Baghy K, Szabadkai K, Fullár A, Dobos K, Zong F, Dobra K, Hollósi P, Jeney A, Paku S, Kovalszky I. *Syndecan-1 Enhances Proliferation, Migration and Metastasis of HT-1080 Cells in Cooperation with Syndecan-2.*

PLoS One. 2012;7(6):e39474.

IF (2010): 4,411

Zong F, Fthenou E, Castro J, **Péterfia B**, Kovalszky I, Szilák L, Tzanakakis G, Dobra K. *Effect of syndecan-1 overexpression on mesenchymal tumour cell proliferation with focus on different functional domains.* Cell Prolif. 2010 Feb;43(1):29-40.

IF (2010): 2,742

Egyéb publikációk

Baghy K, Dezső K, László V, Fullár A, **Péterfia B**, Paku S, Nagy P, Schaff Z, Iozzo RV, Kovalszky I. *Ablation of the decorin gene enhances experimental hepatic fibrosis and impairs hepatic healing in mice.* Lab Invest. 2011 Mar;91(3):439-51.

IF (2009): 4,602

Németh A, Conesa A, Santoyo-Lopez J, Medina I, Montaner D, **Péterfia B**, Solovei I, Cremer T, Dopazo J, Längst G. *Initial genomics of the human nucleolus.*

PLoS Genet. 2010 Mar 26;6(3):e1000889.

IF (2010): 9,543

Kovalszky I, Hollósi P, Baghy K, **Péterfia B**, Füle T. *A hepatocelluláris carcinomák célzott terápiája*. Orvostudományok 2009; LXXXIV. (3):153-254.

Füle T, Baghy K, Tátrai P, **Péterfia B**, Kovalszky I. *A stroma szerepe a daganatok biológiai viselkedésében*. Orvostudományok, 2006;3:193-197.

Péterfia Bálint előadásainak és posztereinek jegyzéke:

Eötvös Loránd Tudományegyetem TDK konferencia,  
Kísérletes onkológia szekció  
2004. november 26-27, Budapest  
Előadás (1. díj)

Semmelweis Egyetem, TDK konferencia,  
2005. február 5-6, Budapest  
Előadás (2. díj)

XXVII. Országos Biológus TDK konferencia  
2005. március 21-24, Pécs  
Előadás

Semmelweis Egyetem PhD Tudományos Napok  
2006. április 13-14, Budapest  
Poszter

65. Magyar Patológus Kongresszus  
2006 október 5-7, Hajdúszoboszló  
Előadás

Gordon Research Conference of Proteoglycans  
2008. július 6-11, Andover, NH, USA  
Poszter

Soft Tissue and Bone Pathology  
Technology Transfer in Diagnostic Pathology 4th Central European Regional Meeting  
2009. április 19-21, Eger, Magyarország.  
Poszter

FEBS- Matrix Pathobiology, Signaling & Molecular Targets  
2009. július 11-16, Patras, Görögország  
Poszter (különdíj)

Magyar-Osztrák Patológus Kongresszus  
2009 október 1-3, Sopron  
Poszter

FEBS- Matrix Pathobiology, Signaling & Molecular Targets  
2011. szeptember 2-7, Spetses, Görögország  
Poszter

70. Magyar Patológus Kongresszus  
2011 szeptember 29- október 1, Siófok  
Előadás

## 12 Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet fejezem ki mindazoknak, akik munkámhoz útmutatásaikkal és segítségükkel hozzájárultak.

Szeretném külön megköszönni témavezetőmnek, **Dr Kovalszky Ilonának** tanácsait, segítségét. Köszönöm **Dr. Füle Tibornak**, hogy annak idején a PCR technikákat megtanította. Köszönet jár **Dr. Baghy Kornéliának, Dr. Hollósi Péternek, Dr. Tátrai Péternek** és **Dr. Ötvös Lászlónak**, akik különösen az elsőszerzős közleményem írásában, lektorálásában segítettek sokat.

Köszönet jár a Molekuláris Diagnosztika laboratórium minden volt és jelenlegi munkatársának, közvetlen munkatársaimnak, név szerint: **Bedi Katalinnak, Felletár Györgynének, Fullár Alexandrának, Dr. Kiss Katalinnak, László Viktóriának, Dr. Németh Attilának, Dr. Oláh Lászlóné Júliának, Egedi Krisztinának, Dr. Szarvas Tibornak, Tátrai Enikőnek**, akik maximális segítőkészségét élvezhettem, és akik egy vidám, baráti légkör megteremtésével is nagyban segítették a munkámat.

Köszönöm **Dr. Szilák Lászlónak**, hogy elkészítette a syndecan expressziós plazmidokat és **Dr. Váradi Györgynek** a sejtszorterezést.

Szeretném megköszönni intézetünk jelenlegi vezetőjének, **Dr. Matolcsy András** egyetemi tanárnak, és **Dr. Kopper László** egyetemi tanárnak, az intézet volt vezetőjének, hogy az intézetben rendelkezésre álló sokféle műszert használhattam.

Külön köszönöm **Dr Jeney Andrásnak** az egerekbe oltásoknál nyújtott segítségét és **Dr. Paku Sándornak**, hogy a konfokális felvételeket elkészítette és megtanította a migráció vizsgálatok technikáját. Köszönet jár **Csorba Gézánnak** és **Dr. Tímár Ferencnek**, akiktől a szövettanyésztés csínyát-bínyát sajátíthattam el, **Dr. Barna Gábornak** aki nélkül áramlási citometriás vizsgálatok nem lennének a dolgozatban, **Dr. Zalatnay Attilának, Baán Bernadettnek** és **Polgár Zoltánnének** az egértüdők szövettani feldolgozásáért. Köszönöm az I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet minden tagjának, hogy munkámat derűs légkörben, segítségüket élvezve végezhettem.

Köszönöm **Dr. Molnár Bélának**, a II. sz. Belgyógyászati Klinika Sejtanalitika laboratórium vezetőjének, aki a doktorandusz évek után, első munkaadómként támogatta doktori disszertációm elkészítését.