

# A syndecan-1 szerepe a máj fibrogenézisében

Doktori értekezés

**Timkóné Dr. Regős Eszter**

Semmelweis Egyetem  
Patológiai Tudományok Doktori Iskola



Témavezetők: Dr. Kovalszky Ilona DSc, professor emerita  
Dr. Baghy Kornélia PhD, tudományos munkatárs

Hivatalos bírálók: Dr. Tőke Judit PhD, egyetemi adjunktus  
Rubovszkyné Dr. Gallai Mónika PhD, biológus

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Kóbori László PhD, egyetemi tanár  
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Pápay Zsuzsanna PhD, osztályvezető  
főorvos  
Dr. Werling Klára PhD, egyetemi docens

Budapest  
2019

**TARTALOMJEGYZÉK**

<b>I. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE</b> .....	<b>4</b>
<b>II. BEVEZETÉS, IRODALMI ÁTTEKINTÉS</b> .....	<b>7</b>
<b>II.1. Az ép máj szerkezete</b> .....	<b>7</b>
<b>II.2. A máj fibrogenézise</b> .....	<b>8</b>
<b>II.3. Jelátviteli pályák</b> .....	<b>10</b>
II.3.1. TGF $\beta$ .....	10
II.3.2. TNF $\alpha$ .....	12
II.3.3. EGF.....	13
II.3.4. GSK3 (glikogén szintetáz kináz).....	13
II.3.5. AKT, FAK (fokális adhézios kináz).....	14
<b>II.4. Mátrix metalloproteinázok</b> .....	<b>15</b>
<b>II.5. Proteoglikánok a máj extracelluláris mátrixában</b> .....	<b>16</b>
<b>II.6. A syndecan-1</b> .....	<b>16</b>
<b>II.6.1. A syndecan-1 szerepe a májbetegségekben</b> .....	<b>18</b>
<b>II.7. A májcirrhosis és fibrosis klinikai vonatkozásai</b> .....	<b>19</b>
<b>III. CÉLKITŰZÉSEK</b> .....	<b>21</b>
<b>IV. ANYAG ÉS MÓDSZERTAN</b> .....	<b>22</b>
<b>IV.1. Vegyszerek, oldatok, pufferek</b> .....	<b>22</b>
<b>IV.2. A homozigóta humán syndecan-1 transzgén egerek létrehozása</b> .....	<b>22</b>
<b>IV.3. Állatkísérletek</b> .....	<b>26</b>
<b>IV.5. A máj minták feldolgozása</b> .....	<b>27</b>
<b>IV.6. Sejtes kísérlet</b> .....	<b>27</b>
<b>IV.7. Morfometriai analízis</b> .....	<b>29</b>
<b>IV.8. Fluoreszcens immunhisztokémia</b> .....	<b>30</b>
<b>IV.9. Paraffinos immunhisztokémia</b> .....	<b>30</b>
<b>IV.10. Humán syndecan-1 és egér TGF<math>\beta</math>1 ELISA</b> .....	<b>31</b>
<b>IV. 11. Syndecan-1 TGF<math>\beta</math>1 kötésének vizsgálata</b> .....	<b>31</b>

<b>IV. 12. Kvantitatív RT-PCR módszer (qRT-PCR)</b> .....	<b>32</b>
IV.12.1. Teljes RNS izolálása .....	32
IV.12.2. Reverz transzkripció .....	33
IV.12.3. Valós idejű (real-time) PCR.....	34
<b>IV.13. Fehérje izolálás</b> .....	<b>35</b>
<b>IV.14. Zselatináz és kazeináz reakció</b> .....	<b>35</b>
<b>IV.15. Dot-blot</b> .....	<b>36</b>
<b>IV.16. Western-blot</b> .....	<b>36</b>
<b>IV.17. Proteoglikán izolálás</b> .....	<b>37</b>
<b>IV.18. Glükózaminoglikán (GAG) izoláció</b> .....	<b>37</b>
<b>IV. 19. Fotódokumentáció</b> .....	<b>38</b>
<b>IV.20. Szöveti multiblokk (TMA) összeállítása</b> .....	<b>39</b>
<b>IV.21. Statisztikai analízis</b> .....	<b>39</b>
<b>V. EREDMÉNYEK</b> .....	<b>42</b>
<b>V.1. A humán syndecan-1 jelenléte késleltette a májfibrosis kialakulását</b> .....	<b>42</b>
<b>V.2. Kollagén-1 termelése és felhalmozódása</b> .....	<b>44</b>
<b>V.3. Myofibroblastok aktivitása</b> .....	<b>46</b>
<b>V.4. TGFβ1 jelátviteli útvonal változása</b> .....	<b>47</b>
<b>V.5. A humán syndecan-1 módosító hatása a jelátviteli utak aktivitása során</b> ....	<b>49</b>
<b>V.6. A syndecan-1 túltermelés hatása LX2 immortalizált myofibroblastokon</b> ....	<b>51</b>
<b>V.7. A syndecan-1 és TGFβ1 interakciójának vizsgálata</b> .....	<b>53</b>
<b>V.8. A humán syndecan-1 és TGFβ1 szérumszintjének változása</b> .....	<b>54</b>
<b>V.9. A humán syndecan-1, a glükózaminoglikán és heparán-szulfát mennyiségének változása</b> .....	<b>56</b>
<b>V.10. Az MMP-2 és MMP-9 zselatinázok aktivitásának vizsgálata, TIMP-1 expressziójának változása</b> .....	<b>59</b>
<b>V.11. MMP-14 (MT-MMP-1) aktivitásának vizsgálata</b> .....	<b>61</b>

<b>V.12. Cirrhotikus humán májminták vizsgálata.....</b>	<b>64</b>
<b>VI. MEGBESZÉLÉS .....</b>	<b>65</b>
<b>VII. KÖVETKEZTETÉSEK.....</b>	<b>71</b>
<b>VIII. ÖSSZEFOGLALÁS.....</b>	<b>72</b>
<b>IX. SUMMARY.....</b>	<b>73</b>
<b>X. IRODALOMJEGYZÉK.....</b>	<b>74</b>
<b>XI. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE .....</b>	<b>84</b>
<b>XI.1. Értekezés témájában megjelent közlemények .....</b>	<b>84</b>
<b>XI.2. Egyéb témában megjelent közlemények.....</b>	<b>84</b>
<b>XII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....</b>	<b>85</b>

**I. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE**

AKT, PKB	<i>protein kinase B</i> , protein kináz B
ALD	<i>alcoholic liver disease</i> , alkoholos májbetegség
ALP	<i>alkaline phosphatase</i> , alkalikus foszfatáz
BCLC stádium	<i>Barcelona clinic liver staging</i>
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i> , bázikus fibroblaszt növekedési faktor
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , borjú szérum albumin
CD138	<i>cluster of differentiation of CD138</i> , syndecan-1 szinonímája
CPC	<i>cetyl-pyridinium chloride</i> , cetil-piridinium-klorid
CS	<i>chondroitin sulfate</i> , chondroitin szulfát
DAPI	<i>4'-6'-diamidino-2-phenylindole</i> , 4'-6'-diamino-2-fenilindol
DEPC	<i>diethyl pyrocarbonate</i> , dietil pirokarbonát
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> , Dulbecco által módosított Eagle féle médium
DS	<i>dermatan sulfate</i> , dermatán szulfát
ECM	<i>extracellular matrix</i> , extracelluláris mátrix
EGF	<i>epidermal growth factor</i> , epidermális növekedési faktor
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i> , epidermális növekedési faktor receptor
ERK	<i>extracellular regulated kinase</i> , extracellulárisan szabályozott kináz
FAK	<i>focal adhesion kinase</i> , fokális adhéziós kináz
FBS	<i>fetal bovine serum</i> , újszülött borjú szérum
GAG	<i>glucosaminoglycan</i> , glükózaminoglikán
GOT	<i>glutamate-oxalacetate transaminase</i> , glutamát-oxalálacetát transzamináz
GPT	<i>glutamate-pyruvate transaminase</i> , glutamát-piruvát transzamináz
GSK3	<i>glycogen synthase kinase 3</i> , glikogén szintáz kináz 3
HCC	<i>hepatocellular carcinoma</i> , hepatocelluláris carcinoma
HE	hematoxilin-eozin
Hep3B SDC1	syndecan-1 transzfektált Hep3B sejtvonal
Hep3B SDC1/LX2	syndecan-1 transzfektált Hep3B és LX2 ko-kultúras modell
Hep3B/LX2	Hep3B és LX2 ko-kultúras modell

HRP	<i>horse-radish peroxidase</i> , tormaperoxidáz
HS	<i>heparan sulfate</i> , heparán-szulfát
HSC sejtek	<i>hepatostellate cells</i> , hepatostellate sejtek, máj csillagsejtek
hSDC1+/+	humán syndecan-1 transzgén egér törzs
IGF	<i>insulin-like growth factor</i> , inzulin-szerű növekedési faktor
IKB	<i>nuclear factor kappa-light-chain enhancer of B cells inhibitor</i>
IL-6	<i>interleukin-6</i> , interleukin-6
INF $\gamma$	<i>interferon-<math>\gamma</math></i> , interferon- $\gamma$
INR	<i>international ratio</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i> , c-Jun N-terminal kináz
KS	<i>keratan sulfate</i> , keratán szulfát
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i> , mitogén aktivált protein kináz
MELD	<i>model for end-stage liver disease</i>
MMP	<i>matrix metalloproteinase</i> , mátrix metalloproteináz
MT-MMP	<i>membrane-type matrix metalloproteinase</i> , membrán típusú mátrix metalloproteinase
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
NEM	<i>N-ethylmaleimide</i> , N-etilmaleimid
NFKB	<i>nuclear factor kappa B, nuclear factor kappa-light-chain enhancer of B cells</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> , foszfát-pufferelt sóoldat
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i> , vérlemezke-eredetű növekedési faktor
PDGFR	<i>platelet-derived growth factor receptor</i> , vérlemezke-eredetű növekedési faktor receptor
PG	<i>proteoglycan</i> , proteoglikán
PI3K	<i>phosphatidylinositol-3 kinase</i> , foszfatidilinozitol-3 kináz
PKC	<i>protein kinase C</i> , protein kináz C
PMSF	<i>phenylmethanesulfonyl fluoride</i> , fenil-metánszulfonil-fluorid
PS	pikroszíriuszvörös
PVDF	<i>polyvinylidene fluoride</i> , polivinilidén- fluorid
SDC1	syndecan-1
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , nátrium-dodecil-szulfát

TA	<i>thioacetamide</i> , thioacetamid
TAE	<i>Tris-acetate-EDTA</i> , Tris-acetát-EDTA
TBS	<i>Tris-buffered saline</i> , Tris-pufferelt sóoldat
TE	Tris-EDTA
TGF $\beta$	<i>transforming growth factor <math>\beta</math></i> , transzformáló növekedési faktor $\beta$
TGF $\beta$ R	<i>transforming growth factor <math>\beta</math> receptor</i> , transzformáló növekedési faktor $\beta$ receptor
THBS-1	<i>thrombospondin-1</i> , thrombospondin-1
TIEG	<i>TGF<math>\beta</math> inducible early growth response</i> , TGF $\beta$ indukálta korai növekedési válasz
TIMP	<i>tissue inhibitor of matrix metalloproteinase</i> , mátrix metalloproteináz szöveti inhibitora
TNF $\alpha$	<i>tumor necrosis factor <math>\alpha</math></i> , tumor nekrozis faktor $\alpha$
VLDL	<i>very low density lipoprotein</i> , nagyon alacsony sűrűségű lipoprotein
WNT	<i>Wingless-related integration site</i>
WT	<i>wild type</i> , vad típusú egér
$\alpha$ SMA	<i>alfa-smooth muscle actin</i> , alfa-simaizom aktin

## **II. BEVEZETÉS, IRODALMI ÁTTEKINTÉS**

A májszerkezet kóros átépülésével és a kötőszöveti elemek felhalmozódásával jellemezhető májcirrhosis súlyos, gyakran életveszélyes szövődményekkel járó betegség, amely a mai napig komoly egészségügyi gondot jelent világszerte. Ilyen kóros kötőszöveti felhalmozódást, májfibrózist okozhatnak vírus fertőzések (hepatitis B és C vírusok), kóros alkohol fogyasztás, egyes anyagcsere betegségek (Wilson-kór, haemochromatosis), autoimmun betegségek (autoimmun hepatitis, primer biliaris cirrhosis), illetve fejletlenebb országokban az alfatoxinnal szennyezett élelmiszerek fogyasztása (1). A betegség gyakoriságát és súlyosságát mutatja, hogy Magyarországon évente több mint 3000 ember hal meg májbetegségekben a Központi Statisztikai Hivatal adatai alapján. A riasztó adatok ellenére a kialakult májcirrhosis visszafordítására hatékony, konzervatív terápia továbbra sem áll rendelkezésre, tartós gyógyulást még mindig csak a máj transzplantáció ígér. További nehézséget okoz a betegség prognózisának, illetve a beteg kezelésének elbírálása szempontjából, hogy a felhalmozódott kötőszövet mennyiségének meghatározására a jelenlegi "gold standard" az invazív máj biopszia, illetve a FibroScan® (transziens elastographia), amely költséges és nehezen hozzáférhető eljárás. Ezért a májcirrhosis kialakulásának molekuláris mechanizmusait jobban megismerve újabb terápiás célpontok és diagnosztikus eszközök kifejlesztését teszi lehetővé.

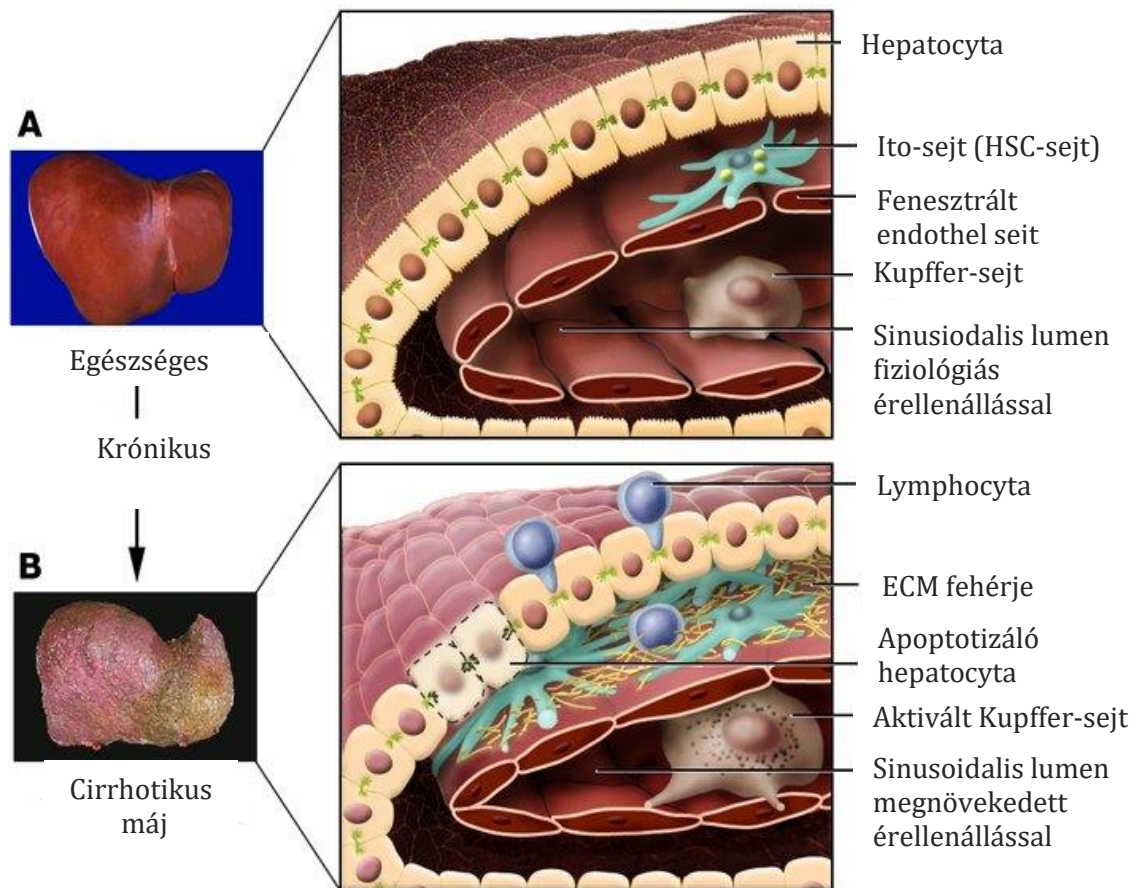
### **II.1. Az ép máj szerkezete**

A máj szöveti felépítésére jellemző az úgynevezett lebenykés szerkezet. A lebenyke közepén található a véna centralis, csúcsain pedig az ún. portális triász tagjai helyezkednek el. A triászt az artéria-, a véna- és a ductus interlobularis-ok alkotják. Az artéria és véna interlobularisokból apró, fenesztrált falú endothellel bíró sinusoidok vezetnek a véna centralis felé. Az endothel sejtek és a hepatocyták közötti tér a perisinusoidalis tér (Disse-tér). Itt találhatóak az Ito-sejtek (csillagsejtek, „hepatostellate cells”, HSC-sejtek), illetve az endothelhez kapcsolódva a máj makrofágjai, a Kupffer-sejtek (2). A májsejtek közötti epeutak falát a cholangiocyták alkotják.



## II.2. A máj fibrogenezise

A máj fibrosisa során fokozott kötőszöveti felhalmozódásáról beszélünk, ami a kötőszövet szintézis és lebontás egyensúlyának felbomlása miatt alakul ki, míg a máj cirrhosisa során a fibrotikus szeptumok porto-centralis vagy porto-portalis progressziója miatt kialakul az ún. állebenyes szerkezet. Ebben a stádiumban a máj makroszkópos vizsgálata során göbös átalakulás figyelhető meg (3). A máj fibrosisa és a sebgyógyulás sok tekintetben hasonlítanak egymásra (4). Amennyiben a májat károsító tényező hosszú ideig fennáll, a sebgyógyulás maladaptív válik (5). Mai tudásunk szerint minél előrehaladottabb a kötőszövetes átépülés a májban, annál kevésbé várható a heges területek felszívódása (4, 6, 3, 5).

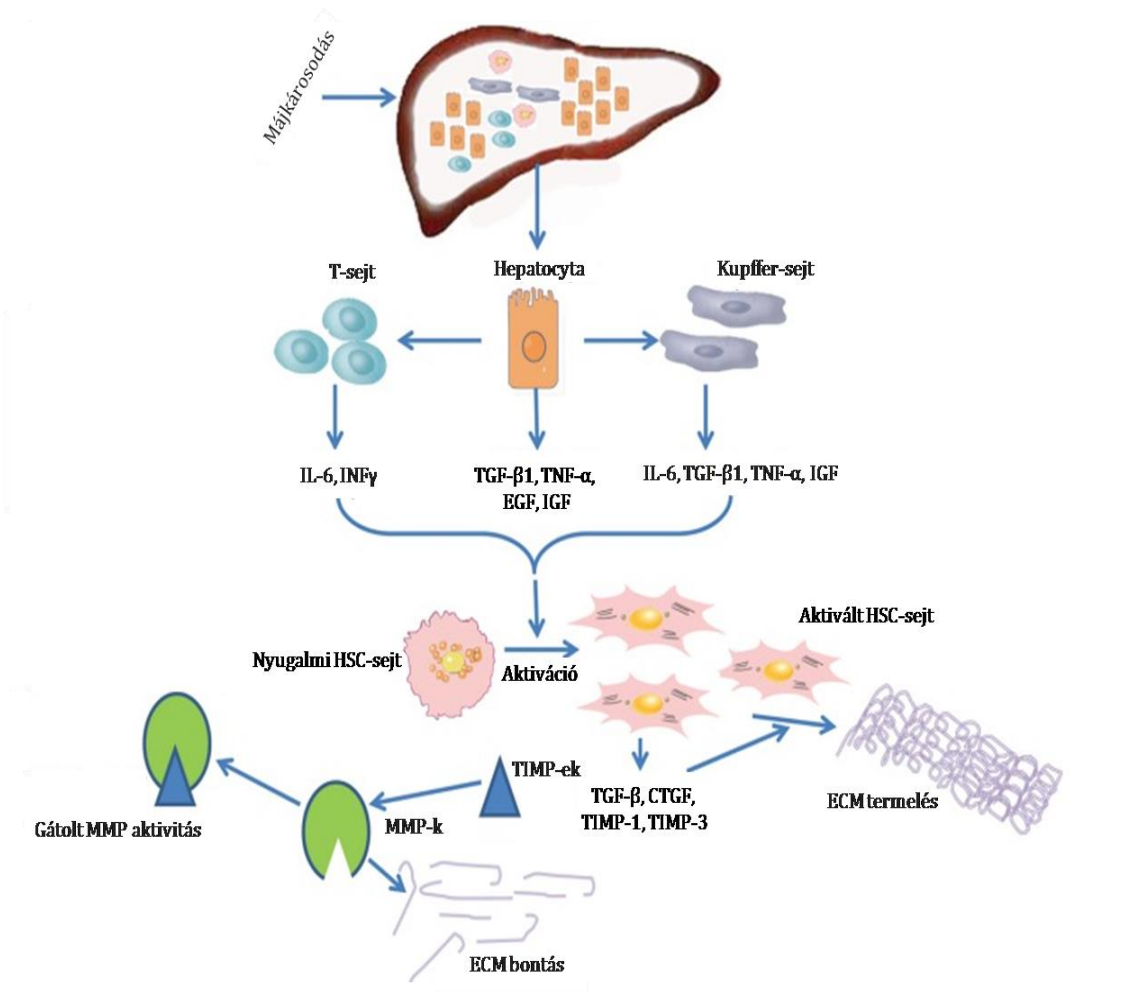


**1. ábra.** A máj fibrosisa során bekövetkező makro- és mikroszkópos elváltozások.  
(Liver fibrosis: R Bateller et al. J Clin Invest, 2005; 115 (2):209-218,  
doi:10.1172/JCI24282 nyomán)

A májfibrosisa és cirrhosisa okozta elváltozások fény- és elektronmikroszkópos szinten követhetők. Az eltérő károsító ágensek hatására lymphocyta infiltráció, és a Kupffer sejtek aktivációja figyelhető meg (7). A hepatocyták károsodása, illetve a gyulladásos folyamat a nyugalomban lévő Ito-sejteket aktiválja és azok myofibroblasttá alakulnak, fontos szerepet játszva a kötőszövet felhalmozódásában. A felhalmozódott kötőszövet mennyiségét annak szintézise és lebomlása közötti egyensúly eredője határozza meg (8). Ezen folyamatok elsősorban a portális triász mentén figyelhetők meg, azonban a perisinusoidalis térben is felhalmozódik a kötőszövet (9).

A sinusoidok fenesztrációja megszűnik, ezt a jelenséget a sinusoidok kapillarizációjának nevezzük. (**1. ábra**), aminek eredményeképpen az érellenállás megnő, ennek következménye a portális hypertonia (10).

A fibrosis során létrejövő molekuláris változások időbeni és térbeni hatása az egyes sejtekre a májban eltérő lehet. A máj károsodás következtében a T-lymphocyták, a Kupffer sejtek és a hepatocyták által termelt bázikus fibroblaszt növekedési faktor („basic Fibroblast growth factor”, bFGF), transzformáló növekedési faktor  $\beta 1$  („Transforming growth factor  $\beta 1$ ”, TGF $\beta 1$ ), tumor nekrosis faktor  $\alpha$  („Tumor necrosis factor  $\alpha$ ”, TNF $\alpha$ ), interleukin-6 (IL-6), epidermalis növekedési faktor („Epidermal growth factor”, EGF), inzulin szerű növekedési faktor („insulin-like growth factor”, IGF) és interferon  $\gamma$  (INF $\gamma$ ) parakrin módon hatnak a nyugalomban lévő HSC sejtekre, amelyek aktiválódnak (10) (**2. ábra**). A HSC sejtek az aktiválódás során  $\alpha$ -simaizom aktint („ $\alpha$ -smooth muscle actin”,  $\alpha$ SMA-t) termelő myofibroblastokká alakulnak át, és eközben elveszítik az A-vitamint tartalmazó zsírcseppjeiket (11, 12). Aktív myofibroblastok újabb adatok szerint nemcsak a nyugalomban lévő HSC sejtekből eredhetnek, hanem csontvelő eredetű fibrocytákból, sőt epitheliális-mesenchymális tranzíció révén, hepatocytákból és cholangiocytákból is kialakulhatnak (13, 14). A myofibroblastok extracelluláris mátrix komponenseket, mátrix metalloproteázokat, azok inhibitorait illetve autokrin módon ható TGF $\beta$ -t termelnek (15, 10).



**2. ábra.** Molekuláris változások a máj fibrosisa során. (Molecular Serum Markers of Liver Fibrosis: T Liu et al Biomark Insights 2012; 7:105-117 2012 Jul 23. doi. 10.4137/BMI.S10009 nyomán)

### II.3. Jelátviteli pályák

A májfibrosist számos citokin, többek között a TGF $\beta$ , PDGF, bFGF, TNF $\alpha$  és az EGF segíti elő (11). A citokinek és receptorainak jelátviteli útvonalait ebben a fejezetben foglalom össze.

#### II.3.1. TGF $\beta$

A TGF $\beta$  citokin családnak három izoformáját különítjük el: a TGF $\beta$ -1-et, -2-t és -3-at (16). Ezen citokinek hosszabb prekursorokként termelődnek, melyek

poszttranszlációs módosítások során aktív TGF $\beta$ -vá válnak. A citokin aktivációban számos enzim vesz részt, többek között az MMP-2, -9, valamint a thrombospondin-1 (THBS-1) (17, 18, 16). A konzervált régiójuknak köszönhetően egyes izoformák aminosav szekvenciája között 70-80% azonosság van (17, 16).

A TGF $\beta$  receptorai a szerin/threonin kináz receptorok közé tartoznak, melyeknek három altípusát különítjük el (19):

- TGF $\beta$ R-1: 53kDa molekula tömegű receptor
- TGF $\beta$ R-2: 75kDa molekula tömegű receptor
- TGF $\beta$ R-3: 250-350kDa molekula tömegű receptor

A receptorok dimér, illetve tetramer formában citokint kötve, aktiválják a jelátviteli utakat. A TGF $\beta$ R-3 önmagában nem tud jelátviteli utat aktiválni, csupán co-receptorként elősegíti a receptor-ligand kötődést (17, 16).

A TGF $\beta$ R kanonikus jelátviteli útvonalát a Smad család tagjai alkotják. A Smad fehérjéket az útvonalban betöltött szerepük szerint tovább csoportosíthatjuk:

- R-Smad-ok (receptor Smad-ok): A receptor aktivációját követően foszforilációs kaszkád hatására bekerülnek a sejtmagba. Tagjai a Smad - 1, -2, -3, -5, -8 (18, 16).
- Co-Smad-ok (common mediator Smad-ok): Elősegíti az R-Smad-ok bejutását a sejtmagba, egyedüli tagja a Smad-4 (18, 16).
- I-Smad-ok (inhibitorikus Smad-ok): Gátolják a fent említett fehérjék aktivációját. Ezen alcsoportnak jelenleg két izoformáját ismerjük: a Smad-6-ot és Smad-7-et (16).

A kanonikus jelátviteli útvonal mellett a receptor aktiváció hatására egyéb jelátviteli fehérjék is foszforilálódhatnak. Ezen útvonalakat non-kanonikus vagy Smad független útvonalaknak ismerjük. Ilyen pályák a mitogén-aktivált protein kináz kaszkád („Mitogen-activated protein kinase”, MAPK- kaszkád), a c-Jun N-terminális kináz- („c-Jun N-terminal kinase”, JNK), a p38 MAPK-, a foszfatidilinositol 3-kináz- („phosphatidylinositol 3-kinase”, PI3K) , a protein kináz B („protein kinase B”, AKT), az NF $\kappa$ B- („Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells”), a WNT- („Wingless-related integration site”) és az mTOR („mammalian target of rapamycin”) útvonalak (20, 18, 16).

A különböző transzkripciós faktorok hatására átíródó géneket korai válasz géneknek („early response genes”) nevezzük. Ezen korai válasz gének termelődése szükséges a faktorok által kiváltott hatások létrejöttéhez. A TGF $\beta$ 1 hatására expresszálódó egyik legfontosabb korai válasz gén a TIEG („TGF $\beta$  inducible early growth response”) (21, 22).

A TGF $\beta$ 1 a kötőszövet szintézis során a fibroblastokat (így a májban a HSC sejteket) aktiválja, így azok myofibroblastokká alakulnak. A fibrosissal járó betegségek során a TGF $\beta$ 1 azonban más sejtekre is hat, így a hámsejtek apoptosist is elősegíti tüdő fibrosis kialakulása során (23).

A TGF $\beta$ 1 képes több fehérjéhez kötődni, valamint ismert, hogy kötődik a heparinhoz és a heparán-szulfátokhoz is, melyek számos fiziológiás és patofiziológiás folyamatban szerepet játszik (24).

### **II.3.2. TNF $\alpha$**

A TNF $\alpha$  szupercsaládnak 18 tagja ismert, amelyek kb. 15-20%-os szerkezeti homológiát mutatnak, legismertebb azonban névadó tagja, a TNF $\alpha$ 1. A TNF $\alpha$  receptoroknak 1-es és 2-es altípusát különítjük el. A receptorok extracelluláris domainje 30%-os homológiát mutat, míg intracelluláris részük teljesen eltérő. A TNF $\alpha$  család tagjaiban közös, hogy mindegyik képes aktiválni az NF $\kappa$ B-t (25).

Az NF $\kappa$ B/Rel fehérje család tagjaira általánosan csak, mint NF $\kappa$ B hivatkoznak. Ezen fehérjék nyugalmi időszakban dimér formában a citoplazmában találhatóak. A komplexhez kötődik az I $\kappa$ B („Nuclear Factor kappa-light-chain enhancer of activated B cells inhibitor”), mely megakadályozza a dimér sejtmagba jutását. Citokin aktiváció hatására az I $\kappa$ B fehérje lehasad a komplexről, így az NF $\kappa$ B a magba kerülve transzkripciós faktorként működik, és a megfelelő promotor régióhoz kötődve elősegíti különböző gének átírását (26, 27).

Az NF $\kappa$ B a gyulladást illetve a sejttúlélést szabályozó transzkripciós faktor. A májszövetben a károsító ágensek hatására létrejött gyulladás, illetve apoptosist meghatározza a fibrosis súlyosságát. Az NF $\kappa$ B hatása ezen folyamatokban sejt- és mennyiség-függő (26). A májsejtek közül a legtöbb NF $\kappa$ B-t az aktivált myofibroblastok tartalmazzák, kisebb mennyiség található a hepatocytákban, illetve a Kupffer sejtekben is (26). Az NF $\kappa$ B csökkenti a HSC sejtekben a col1A1 gén expresszióját, azonban a p50

izotípus hiánya esetén pro-fibrotikus hatást fejt ki. (26) A TGF $\beta$  és a TNF $\alpha$  hatására termelődő NFKB HSC sejtekre kifejtett anti-apoptotikus hatása miatt a májfibrosisa súlyosabbá válik (26, 28).

### **II.3.3. EGF**

AZ EGF egy 53 aminosav láncból álló, három intramolekuláris diszulfid híd kötést tartalmazó növekedési faktor, amely receptoraihoz kötődve, azok dimerizációja révén fejt ki a hatását (29). Az EGF receptorok (EGFR) a tirozin-kináz receptorok közé tartoznak. A receptor családon belül négy altípust különítünk el: az EGFR-1-et, az EGFR-2-t (Her-2), az EGFR-3-at valamint az EGFR-4-et. A receptorok foszforilációja következtében komplex jelátviteli hálózat aktiválódik, melynek legismertebb tagja a MAPK- kaszkád (30). A MAPK- kaszkád aktivációja során az ERK1/2 („extracellular-signal-regulated kinase”) fehérjék foszforilációja is bekövetkezik (31). A másodlagos jelátviteli utak komplexitását mutatja, hogy az ERK1/2 nemcsak az EGFR-en keresztül, hanem más növekedési faktorok pl. a vérlemezke-eredetű növekedési faktor („platelet-derived growth factor”, PDGF) és a TGF $\beta$  receptorain keresztül is tud foszforilálódni (32, 33). Az ERK1/2 foszforilációja megnő májfibrosisa során (32, 34). A pERK1/2 és JNK intracelluláris protein kináz aktivitás következtében hepatocytá prolifерáció, valamint HSC aktiváció tapasztalható (34).

### **II.3.4. GSK3 (glikogén szintetáz kináz)**

A GSK3 a szerin-threonin enzimek közé tartozó kináz. Elsőként a glikogén szintézis szabályozójaként írták le. A GSK3-nak két izoformája: az  $\alpha$  és  $\beta$  izoforma ismert. A GSK3 eltérően a legtöbb kináz aktivitású enzimtől konstitutívan aktív, foszforilált formája pedig inaktív (35). A GSK3 a WNT/ $\beta$ -catenin útvonalban fontos szabályozó szerepet tölt be, mely jelátviteli útvonal szerepet játszik a hepatocelluláris carcinoma kialakulásában (35, 36). Keloid képződésben, amely a patológias sebgyógyulás egyik formája, a WNT/ $\beta$ -catenin útvonal aktiválódik, elősegítve ezzel a bőr fibroblastok proliferációját. Shinichi és munkatársai keloidos fibroblastokban kimutatták a pGSK3 mennyiségének növekedését, mely meggátolva a  $\beta$ -catenin lebomlását elősegítette a fibroblast sejtek proliferációját (37). A dietil-nitrózamin (diethyl

nitrosamine, DEN) indukálta májfibrosisban a GSK3 mennyisége megnövekszik (38). A WNT útvonal aktiválódása során HSC sejtek kollagén termelése megnő, apoptosikus gátlódik (39).

### ***II.3.5. AKT, FAK (fokális adhéziós kináz)***

A FAK/PI3K/AKT jelátviteli útvonal az integrin és PDGF hatására számos sejttípuson aktiválódik, amelynek hatására anti-apoptotikus folyamatok indukálódnak (40).

A FAK a növekedési faktorok és az integrin jelátviteli útvonal aktiválása során szinergista szerepet töltenek be. A FAK egy 125 kDa tömegű citoplazmatikus tirozin-kináz, melynek foszforilációjában a PDGF, valamint az  $\alpha$  és  $\beta$  heterodimerekből felépülő integrinek vesznek részt (41, 40). A PDGF és az integrineken keresztültörténő FAK aktiválódás során az AKT jelátviteli út mellett a RAS, JNK és p38 MAPK útvonalak is működésbe lépnek (42).

Az AKT kináznak három izoformája ismert, melyek a legtöbb szövetben expresszálódnak, és szerkezetüket tekintve nagy homológiát mutatnak. Az AKT szerkezetében két foszforilációs lokalizáció is lehetséges. Az egyik a 308-as threoninon (T308) lévő foszforiláció során a jelátviteli út részlegesen aktiválódik, azonban a teljes szerin/threonin aktiváció eléréséhez szükséges a 473-es szerin foszforilációja (S473) is (43).

In vitro kísérletek szerint a FAK/PI3K/AKT jelátviteli útvonal aktivációja elősegíti a HSC sejtek proliferációját, a kollagén-1 termelést, valamint a lipopoliszacharid kezelt HSC sejtekben megnő a foszforilált AKT mennyisége (40, 44). A PDGF citokin mitogén hatással bír a HSC sejtekre, amit részben a JNK, részben az ERK jelátvitelen keresztül fejt ki, ezzel ellentétben a p38 MAPK gátolja a HSC sejtek osztódását (42). Az integrin jelátviteli gátlásával a FAK foszforilációjának csökkentése révén az aktin rostok formálódása és az  $\alpha$ SMA termelése csökkent (45, 41).

## II.4. Mátrix metalloproteinázok

Egy szervben a felhalmozódott kötőszövet mennyiségét nemcsak a termelésének üteme, hanem a lebontásának sebessége is meghatározza. A sebgyógyulás során, illetve májfibrosisban a lebontást végző egyik legfontosabb enzim család a mátrix metalloproteázoké (MMP) (7). Az MMP-k szabályozása transzkripció, poszttranszláció valamint endogén inhibitorok révén történik. Ilyen endogén inhibitorok a TIMP-ek („tissue inhibitor of metalloprotease”, metalloproteázok szöveti inhibitora), melyek az MMP-k TIMP-ekkel történő gátlása 1:1 arányban történik (46).

Az MMP-k a cink- proteázok családjába tartoznak, melynek jelenleg 23 tagját különítjük el enzimatis funkciójuk szerint.

- *Kollagenázok* A kollagenázok közé tartozik az MMP-1, -8 és -13. Nevüket onnan kapták, hogy bontják a kollagéneket, azonban újabb adatok szerint más extracelluláris komponensek bontásában is részt vesznek (46).
- *Zselatinázok* A zselatináz csoportba két enzim a 72 kDa tömegű MMP-2 és a 92 kDa tömegű MMP-9 tartozik. Régebbi elképzelés szerint a zselatinázok a denaturált kollagént (a zselatint) és a IV-es típusú kollagént bontják (47, 46). A zselatinázok képesek lehasítani a syndecan-1 extracelluláris domain-jét is (részleteiben lásd később) (48).
- *Stromelysin* A stromelysin -1 és -2, avagy az MMP-3 és -10 elsősorban a pro- MMP-k aktiválásában vesz részt.
- *Mátrilizin* A mátrilizin családba tartozik az MMP-7 és -26. Az MMP-7 hasonlóan az MMP-2-höz és -9-hez levágja syndecan-1 extracelluláris részét (48, 46).
- *MT-MMP* („membrane-type matrix metalloproteinase”, *membrán típusú mátrix metalloproteináz*) Ebbe a csoportba tartozik az MMP-14, -15, -16, -24. Az enzimek elősegítik a pro-MMP-2 aktiválódását, illetve az MMP-14 (más néven az MT-MMP1) szintén képes lehasítani a syndecan-1 extracelluláris szakaszát (49, 46).
- *Egyéb MMP-k* A fenti csoportokba nem besorolható MMP-k például az MMP-12 (metalloelasztáz) és MMP-20 (enamelysin) (46).



## II.5. Proteoglikánok a máj extracelluláris mátrixában

A klasszikus elképzelés szerint az extracelluláris mátrix (ECM) pusztán a szövetek tartószerkezeteként szolgál, azonban az utóbbi évtizedek során bebizonyosodott, hogy az ECM fehérjék részt vesznek a sejtek növekedésének, migrációjának és differenciációjának szabályozásában is, továbbá az integrin receptorokon, a FAK útvonalon keresztül jelátviteli útvonalak aktivációját is elősegíthetik (50).

A proteoglikánok (PG) fehérjevázához O-glikozidos kötéssel szulfatált poliszacharid láncok (glükózaminoglikánok, GAG) kapcsolódnak. A GAG oldalláncok lehetnek heparán-szulfátok (HS), chondroitin-szulfátok (CS), dermatán-szulfátok (DS) és keratán-szulfátok (KS) (51). A proteoglikánok a GAG oldalláncukon keresztül képesek különböző citokineket és növekedési faktorokat kötni. Munkacsoportunk korábbi kutatásai alapján igazolódott, hogy a decorin, amely egy kondroitin- és dermatán-szulfát oldalláncokat tartalmazó proteoglikán, köti a PDGF-et, mely fontos szerepet játszik a hepatocarcinogenesisben, valamint a decorin csökkenti a TGF $\beta$ 1 hatását, ezáltal gátolja a májfibrosis kialakulását (52, 53, 32).

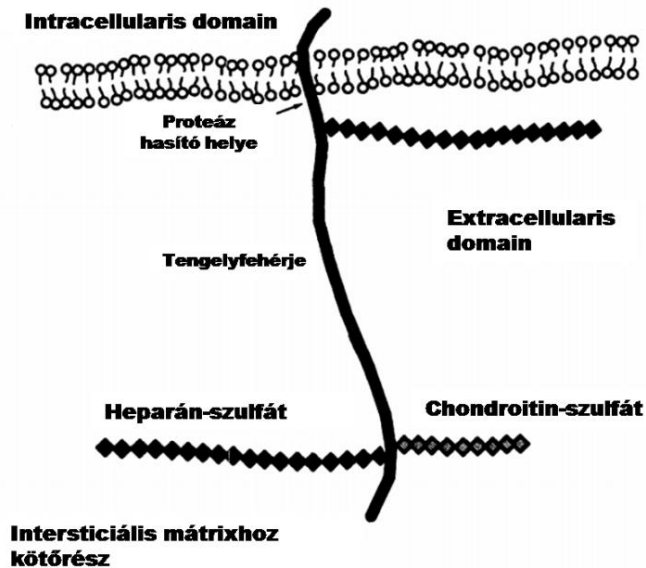
A máj fiziológiás körülmények között kevés proteoglikánt tartalmaz. Syndecan-1 főleg a hepatocyták basolaterális felszínén, illetve az epeutak felszínén található. Habár syndecan-2 mRNS szinten nagy mennyiségben van jelen a májban, fehérje szinten jelenlétét nem sikerült bizonyítani. Az erek és epeutak körül perlecan és agrin látható, míg a periportális kötőszövetben illetve a centrális vénák környékén kevés decorin van. A májfibrosisa során a proteoglikánok, valamint a glükózaminoglikánok mennyisége egyaránt megnő (54, 55).

## II.6. A syndecan-1

A syndecan-1 a transzmembrán proteoglikánok közé tartozó négytagú syndecan család tagja. Elnevezése a görög syndein (összekötni) szóból származik. Tengelyfehérjéjéhez heparán-szulfát és chondroitin-szulfát láncok kötődnek (**3. ábra**) (56, 51). Míg a molekula citoplazmatikus domain-je konzervált, az egyes fajok között azonos, addig az extracelluláris része eltérő, fajra specifikus szekvenciát mutat (57). A syndecan-1 a rutin patológiai diagnosztikában használt másik neve a CD138 (cluster of

differentiation 138), azonban a proteoglikán kutatásának irodalmában a syndecan-1 elnevezés használatos, így a disszertációban ezt az elnevezést követem.

A syndecan család tagjaira jellemző az ún. "vedlés" (shedding) mechanizmusa. A shedding során a tengelyfehérje membránhoz közel eső régiójában enzimatis hasítás történik. Az így képződő fragment parakrin és autokrin szabályozó faktorként viselkedik, és a vérplazmában megjelenik (48). A lehasító enzimeket shedázoknak is nevezzük. Legismertebbek az MMP-2, -9, -7, az MT1-MMP (MMP-14) és az MT3-MMP (58, 48). A shedding folyamatát különböző növekedési faktorok (pl.: EGF, TGF $\alpha$ , FGF2), gyulladáscsökkentő citokinek és a protein-kináz C-t („protein kinase C”, PKC) aktiváló phorbol-észter származékok fokozzák (58).



**3. ábra.** Syndecan-1 szerkezete (Syndecan, a Developmentally Regulated Cell Surface Proteoglycan that Binds Extracellular Matrix and Growth Factors, Philosophical Transaction of The Royal Society Biological Sciences 1990 Mar 12,327 (1239) 171-86 alapján)

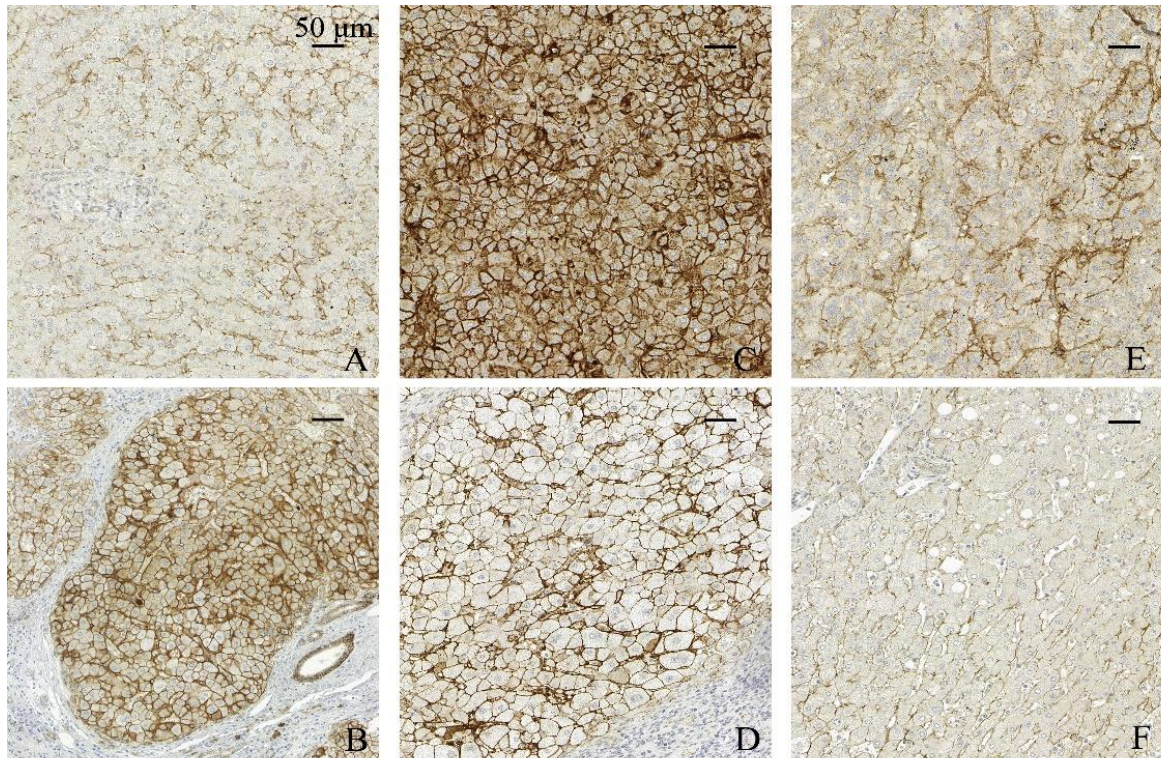
Az érett, felnőtt szövetben syndecan-1 döntően az epithelialis szöveteken, valamint a plazmasejtek és pre-B sejtek felszínén található (59). Nagy affinitással kötődik az intersticiális kollagén-I-hez, -III-hoz illetve -V-höz, valamint a fibronectinhez, thrombospondinhoz, aktin citoskeletonhoz, illetve a heparán- szulfát- kötő növekedési faktorokhoz (pl.: TGF $\beta$  és bFGF) (56, 24). A syndecan-1 tirozin-kináz receptorok ko-

receptoraként is viselkedhet, valamint a kalcium jelátviteli útvonalát is szabályozza (60, 57).

A syndecan-1 szerepet játszik a gyulladás, a sebgyógyulás, a fibrosis és a daganatok patomechanizmusában is. Syndecan-1 túltermelő egerekben a sebgyógyulás lassabb, a sebzáródás, a hámosodás, a granulációs szövet képződés és a remodelling folyamatai szintén elhúzódóak (61). Akut myocardialis infarktusból és dilatatív cardiomyopathiában a syndecan-1 fokozott jelenléte védő hatású (62). Syndecan-1 knock-out egér modellek szíve normál állapotban nem mutatott eltérést a vad típushoz képest, azonban myocardialis infarktusból után a hegszövet képződése elmaradt a kontroll csoporthoz képest, és a szívruptura gyakorisága is nagyobb volt a knock-out egerekben. Az angiotensin-II hatására, a syndecan-1 fokozott expressziója a szív myofibroblastokon pro-fibrotikus hatású volt, és ebben szerepet játszott a TGF $\beta$ -Smad jelátviteli útvonal is (63).

### **II.6.1. A syndecan-1 szerepe a májbetegségekben**

Egészséges májban syndecan-1 főleg a hepatocyták basolaterális felszínén található, a többi sejten expressziójuk lényegesen kevesebb (**4. A ábra**) (64). A májfibrosisa során a syndecan-1 mennyisége megnő, elsősorban a hepatocyták ill. cholangiocyták felszínén, stromális reakció nem tapasztalható. (**4. B ábra**). Fibrotikus, illetve fibrosis nélküli hepatocellularis carcinomákat (HCC), illetve nem tumoros környezetüket vizsgálva azt láthatjuk, hogy a syndecan-1 mennyisége a cirrhosisal járó esetekben jobban meg emelkedik (**4. C-F ábra**) (65).



**4. ábra.** Syndecan-1 immunhisztokémia. A: Normál máj B: Cirrhotikus máj C: Cirrhosis talaján kialakult hepatocellularis carcinoma D: Cirrhosis talaján kialakult hepatocellularis carcinoma környező, nem tumoros szövete E: Nem cirrhotikus májban kialakult hepatocellularis carcinoma F: Nem cirrhotikus májban kialakult hepatocellularis carcinoma környező, nem tumoros szövete. Lépték: 50 µm

A lehasadt syndecan-1 mennyisége a plazmában megnő májfibrosis és cirrhosis hatására (66). Hepatocelluláris carcinomás betegek szérumában a syndecan-1 mennyisége magasabb, mint a csak májcirrhosisban szenvedők esetében. A syndecan-1 mennyisége korrelált a BCLC („Barcelona liver cancer”) stádium súlyosságával is (67).

## II.7. A májcirrhosis és fibrosis klinikai vonatkozásai

A májcirrhosisának kezdeti fázisában csak májenzim értékek -például a glutarát-oxálacetát transzamináz (GOT), a glutamát-piruvát transzamináz (GPT) és az alkalikus-foszfataz (ALP)- emelkedett értéke tapasztalható. A későbbi fázisban a májfunkciók kimerülésével válnak láthatóvá a fizikális vizsgálattal is tapasztalható jelek, mint például a sárgaság, az ascites, a palmaris erythema és a pók naevusok kialakulása. A diagnózis felállításában nemcsak a laborérték eltérések és a klinikai tünetek megjelenése segít,

hanem a képkalkáló vizsgálatok is, mint a hasi ultrahang és a tranziens elastográfia (Fibroscan®) (68).

A máj parenchymás károsodása kapcsán egyedüli érdemi terápia továbbra is csak a májtranszplantáció. Tekintettel az elérhető donor májak alacsony számára a megfelelő recipiens kiválasztása a transzplantációval foglalkozó szakemberek egyik legnehezebb feladata. A recipiens kiválasztása során az objektív döntések meghozatalához különböző score rendszerek nyújtanak segítséget. Az egyik score rendszer a Child-Pugh score, amelyben a szérumbilirubint és albumint, az INR-t („International ratio”), a klinikailag megjelenő ascitest és encephalopathiat vesznek figyelembe. A másik leginkább elterjedt a MELD score („Model For End-Stage Liver Disease”), melyben kizárólag objektív labor értékeket vesznek alapul, mint a szérumbilirubin és kreatinin valamint az INR. A Child-Pugh score és a MELD score pontrendszerek hasznossága mellett figyelembe kell venni a korlátaikat is. A Child-Pugh score rendszerben az ascites és az encephalopathia jelenléte olykor szubjektív tényező, másrészt a tünetek a megfelelő terápia mellett el is tűnhetnek. Mindkét pontrendszer hasznosságát nehezíti az a tény, hogy a májbetegségek során megjelenő véralvadási zavart egyedül az INR változásával monitorozza, holott a thrombocytá diszfunkció is hozzájárulhat a vérzések megjelenéséhez (69, 70).

A MELD score a rövid távú, három hónapon belüli mortalitás jó prognosztikai markerének bizonyult (71, 72). A MELD score pre- és posttranszplantációs értéke, valamint a kettő közötti változás dinamikája szintén jó predikciós markernek bizonyult a transzplantáció utáni mortalitásnak (73). A fentiek miatt a májtranszplantáció kapcsán leginkább a MELD-score használatos.

### III. CÉLKITŰZÉSEK

1. Humán syndecan-1-et stabilan termelő egér törzs létrehozása.
2. Kísérletes májfibrosis létrehozása. A májfibrosis progresszió nyomon követése négy hónapon át.
3. *In vitro* sejtes modell létrehozása, mely során a myofibroblastok és hepatocyták interakciója megfigyelhető.
4. Kötőszöveti fehérjék termelődésének vizsgálata fehérje és mRNS szinten.
5. A májfibrosis során fontos szerepet játszó jelátviteli útvonalak vizsgálata.
6. A kötőszöveti fehérjék lebontását végző proteázok vizsgálata.
7. A syndecan-1 expresszió és a klinikopatológiai adatok összefüggésének vizsgálata májcirrhosisban szenvedő betegek esetén.

## IV. ANYAG ÉS MÓDSZERTAN

### IV.1. Vegyszerek, oldatok, pufferek

A különböző laboratóriumi vegyszereket (például Tris, NaCl) a Sigma-Aldrich Magyarország Kft-től (Budapest) szereztük be. Minden, a vizsgálatok során használt reagens molekuláris biológiai tisztaságú volt. A vizsgálatok során alkalmazott oldatok, pufferek elkészítéséhez és azok hígításaihoz háromszor desztillált (Millipore Co., Burlington, Massachusetts, Egyesült Államok), autoklávozott vizet használtunk fel.

A szövegben részletesen nem specifikált oldatok és pufferek összetétele az alábbi volt:

**PBS:** 10X-es törzsoldat (pH=7,4): 100g/l NaCl, 2,5g/l KCl, 2,5g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 10,57g/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; pH beállítása HCl-el

**PBST:** 1X-re kihígított PBS-hez 0,05 v/v% Tween-20-t adtunk

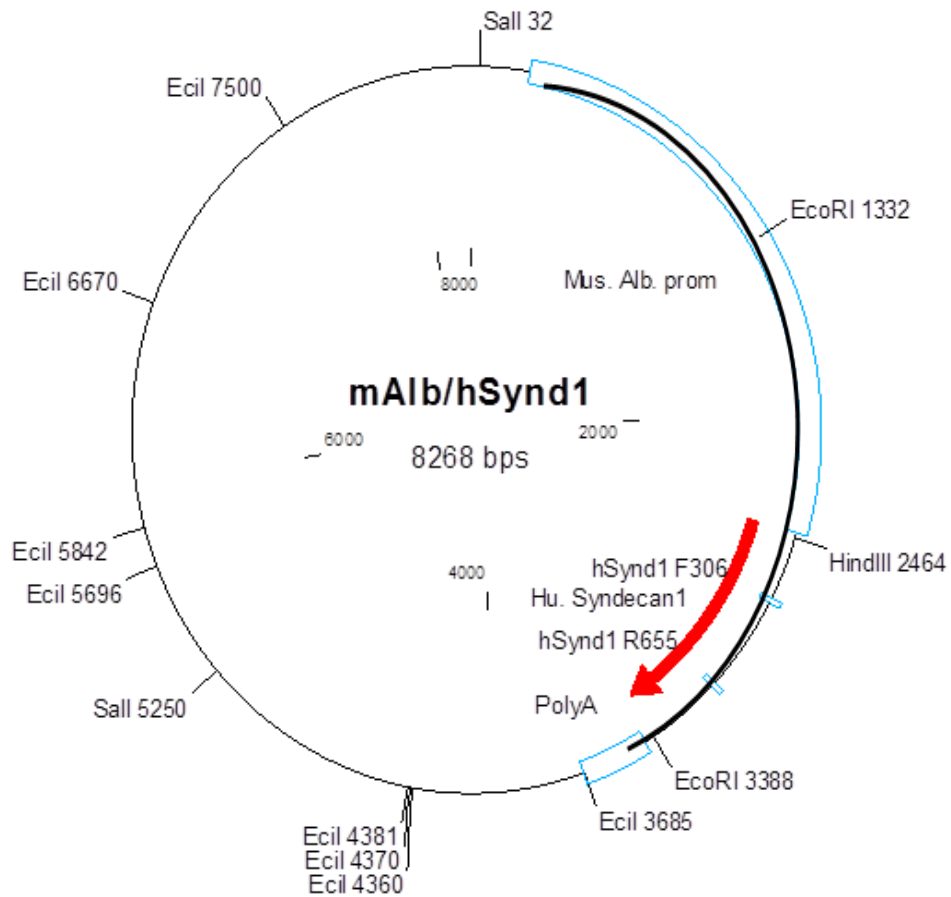
**TBS:** 10X-es törzsoldat (pH=7,4): 87,6g/l NaCl, 24,22g/l Tris; HCl-el pH beállítása

**TAE:** 10X-es törzsoldat (pH=8,0): 48,5g/l Tris, 8,4g/l EDTA, ecetsavval pH beállítása

**TE:** 10X-es törzsoldat (pH=7,4): 12,1g/l Tris, 3,72g/l EDTA, HCl-el pH beállítása

### IV.2. A homozigóta humán syndecan-1 transzgén egerek létrehozása

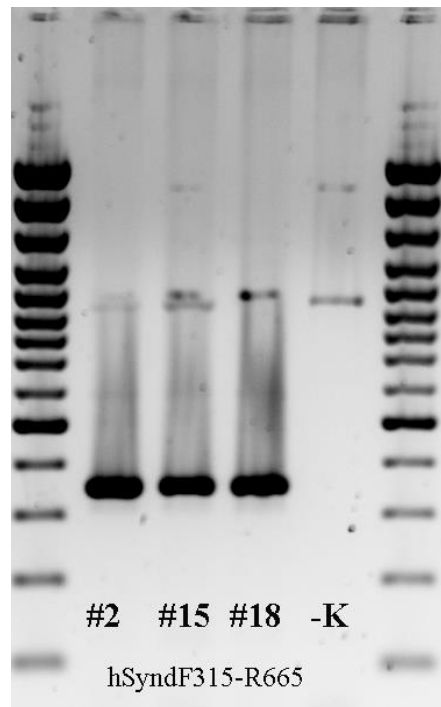
A transzgén egereket megrendelésünkre Dr. Szabó Gábor vezetésével a Központi Orvosi Kutatóintézetben készítették el. A transzgenikus konstrukcióban, melyet Dr. Szilák László készített, albumin promoter után klónozták a humán syndecan-1 cDNS szekvenciáját (mAlb/hSynd1). Az albumin promoter hatására a humán syndecan-1 konstitutív módon csak a hepatocyták felszínén termelődik. (5. ábra)



**5. ábra.** A konstrukciós térképen a vastagon kihúzott ívvel jelölt fragmentum került injektálásra.

A fragmentumokat FVB/N nőstény egerekből megtermékenyített petesejtbe injektálták, amit CD1® recipiens nőstényekbe ültettek be. Hat injektálás és beültetés történt, melyből 24 utód született. Az utódok közül Southern hibridizációval 3 egyedben sikerült a transzgén jelenlétét kimutatni. (**6. ábra**)

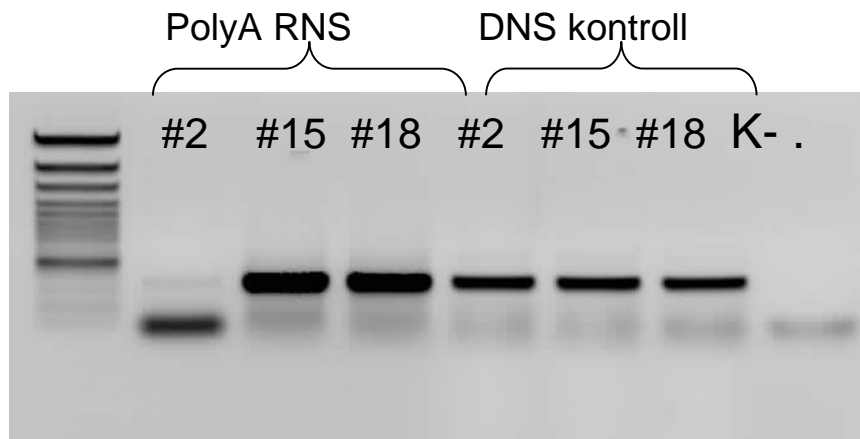




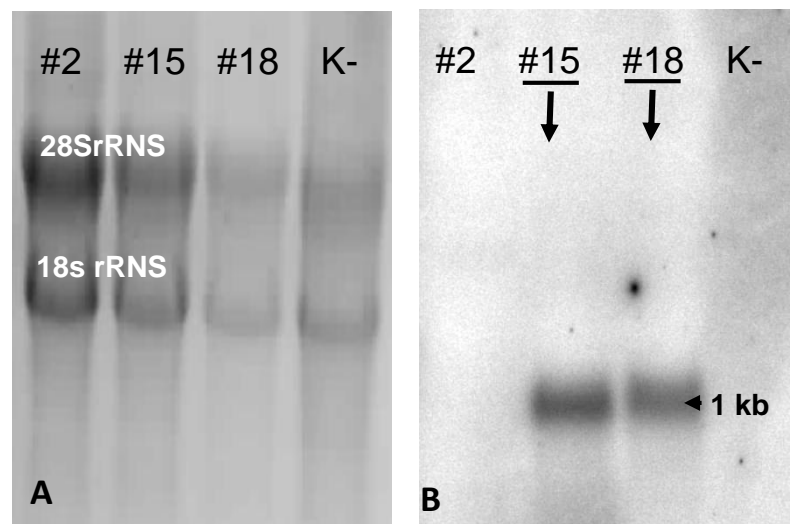
**6. ábra.** PCR amplifikálással kimutatott humán syndecan-1 transzgén. A #2-es hím, a #15-es és #18-as számú állatok nőstények.

Az ivarérettség elérésekor mindegyik egyed egy vad genotípusú FVB/N egyeddel pároztatták. Az utódok ellenőrzése polimeráz láncreakcióval (PCR) történt. A vonalalapítás mind a 3 állattal megtörtént. A következő utódnemzedékekben az egymással való pároztatásban a transzgén öröklődése a mendeli szabályok szerint történt.

Mindhárom egérvonal példányainak májából elvégeztük a humán syndecan-1 kimutatását reverz transzkripció (RT)-PCR-rel illetve Northern hibridizációval. (**8. ábra**)



**7. ábra.** A humán syndecan-1 transzgén és a róla képződő mRNS kimutatása PCR és RT-PCR technikával



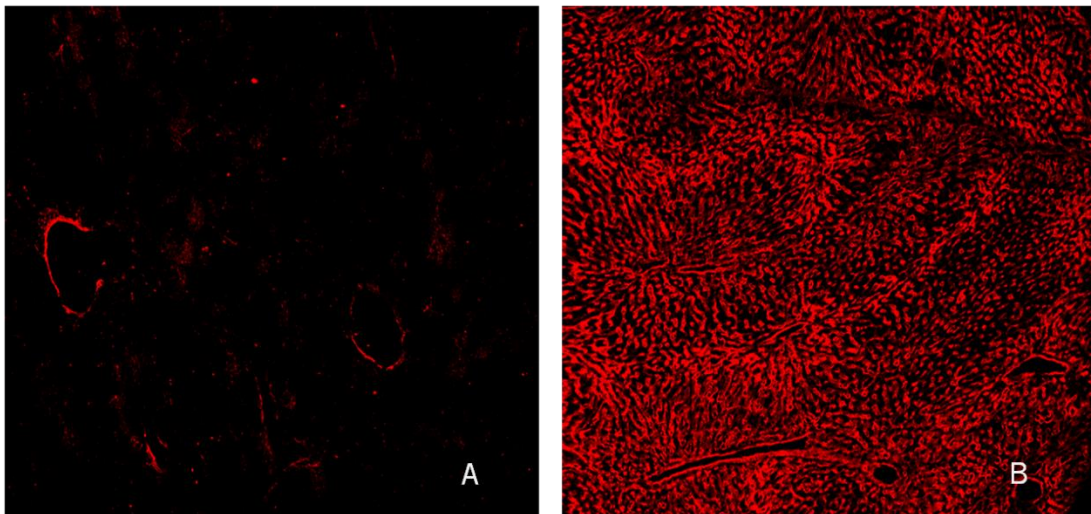
**8. ábra.** Humán syndecan-1 mRNS kimutatása a transzgénikus vonalakban. A: RNS gél etidium bromiddal festett képe. B: Northern hibridizáció  $P^{32}$ -vel jelölt humán syndecan-1 próbával.

A #2-es vonalban a DNS szinten kimutatható a humán syndecan-1, RNS szinten azonban nem termelődik. A #15-ös és #18-as vonalban mind DNS, mind RNS szinten stabilan kimutatható a humán syndecan-1. (7. ábra)

Ezek alapján a #15-ös /#18-a vonalat tenyésztettük tovább, és használtuk mi fel kísérleteinkhez. Az állatokat homozigóciára test-cross keresztezéssel vizsgáltuk

konvencionális PCR technika segítségével. A test-cross kezelés során egy ismert, az adott allélra nézve homozigóta recesszív egyed (esetünkben vad példányt) ketesztettünk egy ismeretlen genetikai háttérű példánnyal, mely vagy homozigóta domináns vagy heterozigóta genotípussal bír a humán syndecan-1 allélra nézve. Az utódok genotípusának arányait vizsgálva következtethetünk az ismeretlen genetikai háttérrel bíró egyed tulajdonságára. Amennyiben a vizsgált példány homozigóta domináns genetikával rendelkezik a humán syndecan-1-re nézve, akkor minden utódában megjelenik a domináns gén heterozigóta formában, így minden utód heterozigóta lesz a génre nézve. Ha a kérdéses egyed heterozigóta a humán syndecan-1-re nézve, akkor utódainak körülbelül a felében homozigóta recesszív tulajdonsággal bírnak, így ezen utódok nem fogják hordozni a humán syndecan-1-et.

Az egér májából syndecan-1 immunhisztokémiával ellenőriztük, hogy transzgén egerekben fehérje szinten is meg van-e a proteoglikán. (9. ábra)



**9. ábra.** Syndecan-1 immunhisztokémia. A képek 10x nagyítással készültek. A: Vad típusú állatok mája B: Humán syndecan-1 (hSDC1 +/+)

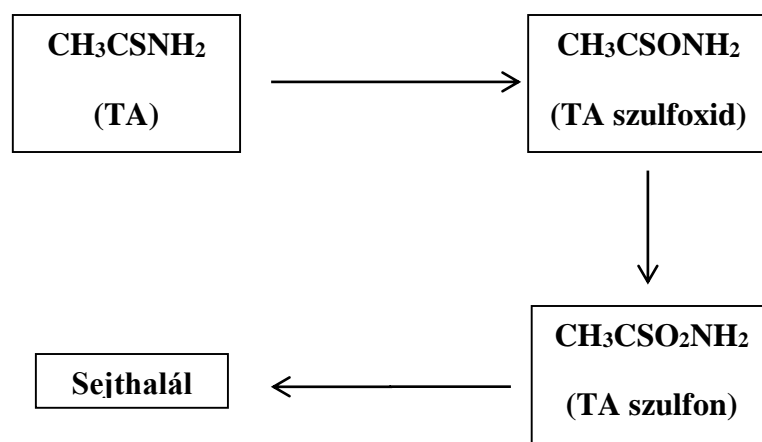
### IV.3. Állatkísérletek

A vad és humán syndecan-1 transzgén (hSDC1 +/+) állatokban thioacetamiddal (TA) májfibrosist indukáltunk. A TA-ot az állatok ivóvizében 300 mg/l koncentrációban hígítottuk, az állatok a kezelést 4 hetes koruktól kapták állandó jelleggel. A kezelést 4

hónapon át végeztük. Minden hónapban, valamint kezelés nélkül kontroll csoportként 6-6 állatot öltünk le, melyekből 3 hím és 3 nőstény volt. A TA hepatotoxikus vegyület, amely hepatotoxicitását fehérje kötőképessége révén fejt ki: a fehérjékhez kötődve acetilimidazolin képződik. (10. ábra) A fehérjék károsodása révén a sejtek elhalnak, aminek a következtében fibrosis alakul ki (74, 75).

Az állatok leölésekor nemcsak a májukat használtuk fel, hanem a vérüket is levettük. A vérből centrifugálás után leválasztottuk a plazmát, melyet  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk.

Az állatkísérletek az etikai normáknak megfelelően történtek (engedély szám: XVI/03047-3/2008)



10. ábra. A thioacetamid hatásmechanizmusa

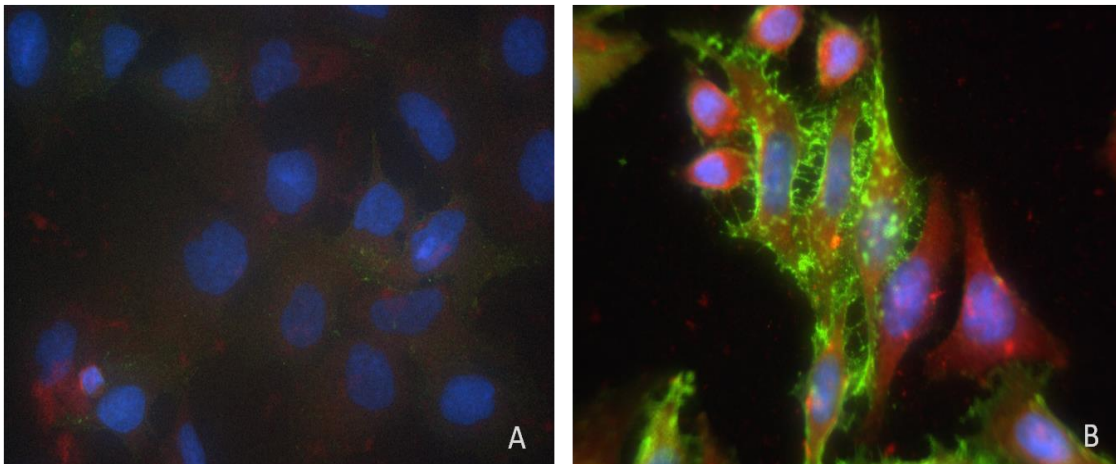
#### IV.5. A máj minták feldolgozása

Minden máj felét 10 %-os formalin oldatban fixáltuk, a másik felét  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. A formalinban fixált mintákat paraffinba ágyaztuk a patológián használt standard módszer szerint. A paraffinos mintákból készített standard  $5\text{ }\mu\text{m}$  vastag metszeteken a rutin szövettani módszereknek megfelelően hematoxin-eosin (HE) és picrosirius-vörös (PS) festést végeztünk.

#### IV.6. Sejtes kísérlet

Dr. Scott Friedman (Mount Sinai School of Medicine, NY) kutatócsoportja által létrehozott humán LX-2 immortalizált HSC sejtvonalat, valamint az A hitelesített sejtkultúrák európai gyűjteményéből (European Collection of Authenticated Cell Cultures, ECACC) származó Hep3B hepatocelluláris carcinoma sejteket használtuk *in vitro* fibrogenesis kísérleteinkhez. A sejtek tenyésztése 10% FBS-t („Fetal bovine serum”, újszülött borjú szérum), 100 U/ml penicillint és 100 µg/ml streptomycint tartalmazó, alacsony glukóz tartalmú Dulbecco-által módosított Eagle- féle („Dulbecco’s Modified Eagle’s, DMEM-1000, Sigma Aldrich, Kat.: D6046) médiumban történt 37°C-on 5% CO<sub>2</sub> tartalom mellett. A sejteket 90%-os konfluenciánál tripszin-EDTA segítségével passzáltuk.

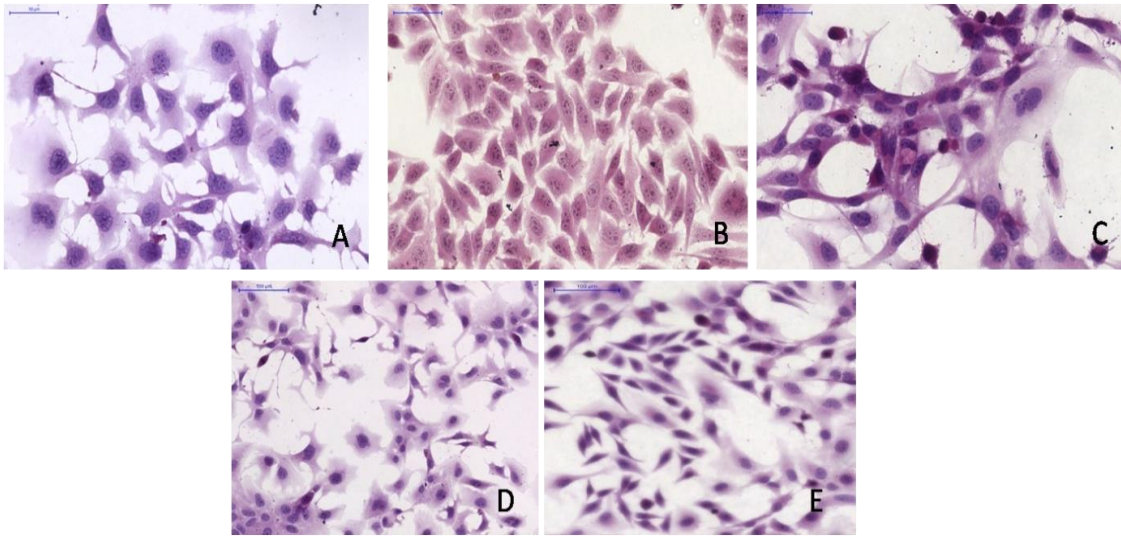
A Hep3B sejtvonalat syndecan-1-EGFP konstrukcióval Effectene reagens alkalmazásával (Qiagen, Valencia, CA, USA) stabilan transzfektáltuk. A sejteket 60%-os konfluenciánál 0,2 µg/ml EGFP-syndecan expressziós vectorral kezeltük, mely tartalmazza a syndecan-1 teljes cDNS szekvenciáját. (76) Immunhisztokémiai reakcióval ellenőriztük a proteoglikán termelését, és a heparán-szulfát oldallánc jelenlétét. (11. ábra)



**11. ábra.** A: Hep3B B: syndecan-1 transzfektált Hep3B (Hep3B SDC1) sejtek kettős immunfluoreszcens jelölése. *Kék:* DAPI *Piros:* syndecan-1 intracitoplazmatikus domainje ellentervezett ellenanyag *Zöld:* Heparán-szulfát

Az *in vitro* modellekben LX2 ill. Hep3B vagy syndecan-1 transzfektált Hep3B direkt ko-kultúrát hoztunk létre (12. ábra), melyeken TGFβ1 adásával indukáltuk az LX2 sejtek myofibroblasttá alakulását. A kísérlet során  $1 \times 10^5$  LX2 és  $5 \times 10^4$  Hep3B vagy  $5 \times 10^4$  SDC1 transzfektált Hep3B sejteket 6 lyukú plate-ben tenyésztettük és kezeltük

összesen négy napon keresztül. 24 órával a sejtek kirakása után a médiumot 0,5%-os FBS tartalmú DMEM-re cseréltük, így a sejtek egy éjszakán át éheztek. A szérum megvonása után 2% FBS tartalmú médiumhoz 2 ng/ml-es koncentrációban humán rekombináns TGF $\beta$ 1-et adtunk (Katalógus szám: T7039-2UG, Sigma Aldrich). 48 óra elteltével a sejtekből fehérjét és RNS-t izoláltunk, míg a sejt médiumokat lecentrifugáltuk, utóbbi sejtörémelékmentes médiumokat pedig további felhasználásig -80°C-on tároltuk.



**12. ábra.** Sejt és ko-kultúras modellek haematoxilin-eosin festéssel látható morfológiája. A: Hep3B B: Syndecan-1 túltermelő Hep3B (Hep3B SDC1) C:LX2 D: Hep3B/LX2 ko-kultúras modell (Hep3B/LX2) E: Syndecan-1 túltermelő Hep3B/LX2 ko-kultúras modell (Hep3B SDC1/LX2)

A lehasadt syndecan-1 hatását az LX2 sejtvonalon indirekt ko-kultúras modellen vizsgáltuk. Az indirekt ko-kultúras model esetén a Hep3B és a syndecan-1 túltermelő Hep3B kondicionáló médiumait 1:1 arányban DMEM-1000 médiummal hígítottuk, majd megismételtük a ko-kultúras modellenél leírt TGF $\beta$ 1 kezelést.

#### IV.7. Morfometriai analízis

Az analízishez picosirius-vörössel festett metszeteket használtunk, melyeket Olympus mikroszkóppal és Cue-2 szoftver (Olympus, Tokió, Japán) segítségével elemeztük. A metszetekről egyenként öt random képet fotóztunk, amelyeket a szoftver fekete-fehér képpé konvertált, ahol a fekete a kötőszövetet a fehér a háttérrel jelenti. A

program ez alapján kiszámítja a fekete pixelek százalékos arányát az egész képhez képest, amellyel megkapjuk a kötőszövet százalékos arányát a szövetben.

#### **IV.8. Fluoreszcens immunhisztokémia**

Az immunhisztokémiai reakciókhoz 7  $\mu\text{m}$ -es metszeteket készítettünk fagyasztott májából kriosztáttal, majd  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os metanollal 10 percig fixáltuk azokat. A PBS-sel történő mosási lépések után a nem specifikus kötőhelyeket PBS-ben oldott 5 %-os BSA-val („bovin serum albumin”, marha szérum albumin, Sigma Aldrich) szobahőmérsékleten 1 órán át blokkoltuk. Az elsődleges ellenanyagokat 1 %-os BSA-ban hígítottuk, majd a metszeteket  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on egy éjszakán át inkubáltuk. Másnap a megfelelő mosási lépések után fluoreszcensen jelzett másodlagos ellenanyagot egy órán át sötétben alkalmaztuk. A másodlagos ellenanyagok mellé DAPI-t adtunk (4'-6'-diamidino-fenilindol), amivel a sejtmagokat jelöltük. A mosási lépések után speciális fluoreszcens fedőanyaggal (Fluoromount™ Aqueous Mounting Medium, F4680-25 ml, Sigma Aldrich) fedtük le a metszeteket. A digitális immunhisztokémiai képeket Nikon Eclipse E600 mikroszkóppal (Nikon, Tokyo, Japan), illetve Lucia Cytogenetics programmal (Laboratory Imaging, Prága, Csehország) készítettük. A reakcióban használt ellenanyagok listáját és alkalmazott koncentrációját részletesen az **5. táblázat** tartalmazza.

#### **IV.9. Paraffinos immunhisztokémia**

A formalinban fixált, paraffinba ágyazott mintákból 3  $\mu\text{m}$ -es vastagságú metszeteket készítettük, melyeket xilolban, leszálló alkohol sorban és  $\text{dH}_2\text{O}$ -ban hidráltuk. Az antigének feltárását kuktában végeztük TRIS-EDTA pufferben (10 mM TRIS, 1mM EDTA, 0,05% Tween-20, pH:9) 30 percen át. Az endogén peroxidázok inaktiválást metanolban oldott 10 v/v%  $\text{H}_2\text{O}_2$ -vel végeztük 20 percig. PBST-ben történő mosás után a metszeteket 5 w/v% PBS-ben oldott BSA-val és 10 v/v% a másodlagos ellenanyag forrásának megfelelő állatfajból származó normál szérummal szobahőmérsékleten egy órán át inkubáltuk a metszeteket, így semlegesítve a nem

specifikus kötőhelyeket. Az elsődleges antitesteket 1 w/v% BSA-ban oldottuk, majd 4°C-on éjszakán át inkubáltuk a metszeteket. A következő napon a mintákat háromszor PBST-ben mostuk, majd PBS-ben oldott torma peroxidázzal konjugált másodlagos ellenanyaggal inkubáltuk a metszeteket szobahőmérsékleten egy órán át. Ismételt mosási lépéseket követően DAB (diaminobenzidin) chromogén használatával láthatóvá tettük a fehérjékhez kötött antitesteket, hematoxilin festést használva pedig a magokat festettük meg. A reakcióban használt ellenanyagok listáját és az alkalmazott koncentrációját részletesen az **5. táblázat** tartalmazza.

Heparán-szulfát immunreakció esetén a M.O.M. ImmPress Polymer Kit-et használtuk (Vector Laboratories, Burlingame, CA), így kiküszöbölve az egér mintán alkalmazott egérben termeltetett ellenanyag használatából fakadó aspecifikus reakciót.

A metszeteket a Panoramic 250 szkennelrel (3DHistech Kft., Budapest) digitalizáltuk. Az immunreakciók erősségét a Panoramic Viewer programhoz tartozó QuantCenter kiértékelő szoftver DensitoQuant moduljával végeztük, amely a színreakciókhoz kapcsolódó RGB értékek alapján a jelerősséget a felhasználó beállítása alapján négy csoportba osztja; így negatív, gyenge, közepesen erős és erős reakciókra.

#### **IV.10. Humán syndecan-1 és egér TGFβ1 ELISA**

A humán syndecan-1 és TGFβ1 mennyiségét az egerek plazmájában ELISA módszerrel mértük. A humán syndecan-1 ELISA reakció elvégzéséhez a Diaclone (Besançon, Franciaország) cég CD138 ELISA Kit-ét alkalmaztuk (Katalógusszám: 850.640.096), míg az egér TGFβ1 ELISA reakcióhoz az R&D System mouse TGFβ1 ELISA Kit-ét használtunk (R&D System Minneapolis MN, USA). A színreakciót 450 nm hullámhosszon Multiskan MS ELISA reader (A.A. Lab Systems, Ramat-Gan, Israel) segítségével mértük le.

#### **IV. 11. Syndecan-1 TGFβ1 kötésének vizsgálata**



Rekombináns TGF $\beta$ 1-ből (Katalógus szám: T7039-2UG, Sigma Aldrich) hígítási sort készítettünk, így a dot-bloton a kezdő mennyiség 50 ng/betöltés volt. Pozitív és negatív kontrollként a syndecan-1 túltermelő Hep3B sejtek médiumát használtuk fel. A mintákat vákum pumpa segítségével PVDF membránra (polivilidén-fluorid membrán, Merck Millipore) blottoltuk. Mind a rekombináns TGF $\beta$ 1-et, mind a médiumokat egy éjszakán át 4°C-on inkubáltuk a syndecan-1-ben gazdag médiummal. A következő napon a megfelelő mosási lépések után a Dot-blotnál leírt protokollt követtük, és syndecan-1 ellenanyagot használva ki tudtuk mutatni a TGF $\beta$ 1-hez kötött proteoglikánt.

#### **IV. 12. Kvantitatív RT-PCR módszer (qRT-PCR)**

A fehérjék génexpressziójának mennyiségi vizsgálatához RNS-t izoláltunk. A mRNA expressziót reverz transzkripciót követő real-time PCR módszerrel (qRT-PCR) mértük (ABI Prism 7000, Applied Biosystems illetve StepOnePlus, Thermo-Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, Egyesült Államok). Belső kontrollként 18S mRNA-t használtunk *in vivo* és GAPDH-t *in vitro* model rendszereinkben.

##### ***IV.12.1. Teljes RNS izolálása***

A fagyasztott májából a mintákat folyékony N<sub>2</sub>-nel homogenizáltuk, a sejtekről a médiumot eltávolítottuk. Ezt követően a mintákhoz 1 ml Trizol reagents adtunk (Invitrogen), majd pipettával történő szuszpendálás után 5 percen át inkubáltuk szobahőmérsékleten, majd 12500 g-n 10 percig 4°C-on centrifugáltuk. A felülúszót tiszta csőbe tettük. Ezután a mintákhoz 200  $\mu$ l kloroformot adtunk, majd 5 percig szobahőmérsékleten való inkubáció után 13000 g fordulatszámmal 15 percig 4 °C-on centrifugáltuk. A felső vizes fázist tiszta csőbe pipettáztuk, ezt követően 500  $\mu$ l izopropanolt adtunk. Ismételt centrifugálás után a pelletet először 0,5 ml abszolút etanollal, majd 75%-os etanollal mostuk. Centrifugálás után a csapadékot szobahőmérsékleten kiszárítottuk, majd DEPC- (dietil pirokarbonát) vízben visszaoldottuk. Az RNS koncentrációt Nanodrop, ND-1000 spektrofotométerrel határoztuk meg.

**IV.12.2. Reverz transzkripció**

A géneexpressziós vizsgálatokban a cDNS előállításához *in vivo* modell esetén az Invitrogen M-MLV RT rendszerét (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornia, Egyesült Államok) használtuk, míg a sejtes kísérletek során a High Capacity cDNS Reverz Transzkripció Kit-et (ThermoFischer Scientific) alkalmaztuk. A reakció összemérésének adatait az **1-es és 2-es táblázat** tartalmazza.

**1. táblázat.** A reverz transzkripció metodikája M-MLV RT rendszerrel

Felhasznált anyagok	Törzsoldat koncentrációja	Térfogat (µl)	Végkoncentrációk illetve mennyiségek
Random hexamer	3 µg/ml	1	300 ng
össz RNS	-	10	1 µg
dNTP	10 mM/each	1	2 mM
5× First- Strand Puffer	250mM Tris-HCl (pH 8.3), 75 mM KCl, 15 mM MgCl <sub>2</sub>	4	250mM Tris-HCl (pH 8.3), 75 mM KCl, 15 mM MgCl <sub>2</sub>
DTT (dithiotreitol)	0,1 M	2	10 mM
RnaseOUT™	40 U/ µl	1	40 U
M-MLV RT	200 U/ µl	1	200 U
<i>25 °C -on 10 percig, 37 °C -on 50 percig</i>			
<i>70 °C -on 15 percig inkubálom</i>			

**2. táblázat.** A reverz transzkripció metodikája a High Capacity cDNS Reverz Transzkripció Kit- tel. Azon reagensek esetében, ahol a cég nem adta meg a pontos koncentrációt, én sem tüntettem fel

Felhasznált anyagok	Törzsoldat koncentrációja	Térfogat (µl)	Végkoncentrációk illetve mennyiségek
10X RT Buffer	-	2	-
25X dNTP mix	100 mM	0,8	8 mM
10X Random Primer	-	2	-
Multiscribe RT	50 U/µl	1	50 U
Rnase Inhibitor	200 U/µl	1	200 U
össz RNS	-	10	1µg
<i>25 °C-on 10 percig, 37°C-on 120 percig</i>			
<i>85°C-on 5 percig inkubálom</i>			

### IV.12.3. Valós idejű (real-time) PCR

Az egér gének expressziójának vizsgálatához TaqMan® Gene Expression Assay-t, illetve hozzájuk tartozó belső kontrollokat használtuk (Applied Biosystems by Life Technologies), mely gyárilag tartalmazza az adott génre specifikus primereket és próbát. A sejtes modell esetében a PrimeTime qPCR Assay-et alkalmaztuk (Integrated DNA Technologies, San Jose, CA, USA). A géneket és az „assay”-k azonosítóit a **3. táblázat** foglalja össze.

**3. táblázat.** RT-PCR reakciók során használt primerek listája

<b>Egér</b>	<b>Assay ID</b>
Col1A1	Mm00801666_g1
TIEG	Mm00449812_m1
TGFβ1	Mm01178820_m1
TIMP-1	Mm01341361_m1
β-actin	Mm00607939_s1
<b>Humán</b>	<b>Assay ID</b>
αSMA	Hs.PT.56a.21389192
TIEG	Hs.PT.58.424187.gs
GAPDH	Hs.PT.39a.22214836

Minden génre az **4. táblázatban** látható PCR protokollt alkalmaztuk. A reakció az ABI Prism 7000 Sequence Detection System, illetve a Step One Plus készülékeken történt. A futást a Sequence Detection Software version 1.2.3.-al valamint a StepOne™ szoftware 2.2.2. verziójával elemeztük.

**4. táblázat.** RT-PCR reakció összemérésnek adatai, és a reakciók paraméterei

<b>Felhasznált anyagok</b>	<b>Törzsoldat koncentrációja</b>	<b>Térfogat (μl)</b>	<b>Végkoncentrációk illetve mennyiségek</b>
TaqMan universal PCR Mastermix	2×	10	1×
Vizsgálatnak megfelelő assay	20×	1	1×
cDNS		2	20 ng
H <sub>2</sub> O		7	
<b>Real-time PCR reakció paraméterei</b>			
<b>Folyamat</b>	<b>Hőmérséklet (°C)</b>	<b>Időtartam</b>	<b>Ciklusszám</b>
Denaturáció	95	10 perc	1

	95	15 mp	40
Anelláció/ Elongáció	60	1 perc	

#### IV.13. Fehérje izolálás

A fagyasztott májmintákat folyékony N<sub>2</sub>-nel homogenizáltuk. Zselatináz reakció esetén a porlasztott mintákhoz 1 ml lízis puffert adtunk az alábbi összetételben: 50 mM Tris pH=7,6, 500 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>. Western-blotra használt fehérjék esetében az alábbi összetételű pufferben vettük fel a májakat: 20mM Tris (pH=7,5), 150 mM NaCl, 2mM EDTA, 0,5 v/v% TritonX-100, 0,5% proteáz inhibitor koktél (Sigma, St. Louis, MO), 10mM NaF, 2mM Na-ortovanadát. A pSmad2 Western-blot esetében a mintákat RIPA-pufferben oldottuk fel (25mM Tris pH=7,6, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 1v/v% TritonX-100, 1g/v% nátrium-deoxycholát, 0,1v/v% SDS, 5% proteáz inhibitor koktél (Sigma Aldrich), 10mM NaF, 2mM Na-ortovanadát).

A lízis pufferben szuszpendált máj homogenizátumot ultrahangos szonikátorral tovább aprítottuk. Ezt követően a mintákat 30 percig jégen inkubáltuk, majd 5 percig 13000 rpm-mel 4 °C-on centrifugáltuk. A felülúszókat tiszta csőbe mértük, majd a mintákat -80 °C-on felhasználásig tároltuk. A fehérje koncentrációkat Bradford módszer szerint mértük, BSA standard koncentrációsor használatával 595 nm-en (77).

#### IV.14. Zselatináz és kazeináz reakció

Az egér máj mintákból 15 µg fehérjét, míg a sejtes kísérletek során 20 µl sejtmédiumot használtunk fel reakciónként, míg pozitív kontrollnak 5% FBS-t vittünk fel a gélekre. A gélek kétrétegűek: a felső részre 4 %-os koncentráció gél, az alsó 10 %-os futtató gél öntöttünk. Zselatináz reakcióban a gélek 300 µg/ml-es koncentrációban tartalmaztak zselatint, míg kazeináz reakcióhoz 3 µg/ml kazeint (α-Casein from Bovine Milk, C6780, Sigma Aldrich), 5µl/ml fibronectint ( Cat. No. F1141, Sigma Aldrich) és 10 µl/ml Matrigelt (Cat. No. E1270, ECM Gel from Engelbreth-Holm-Swarm murine sarcoma, Sigma Aldrich) használtunk. Elektroforézissel 200 V feszültség mellett 35 percig futtattuk a mintákat a Bio-Rad Mini Protean vertikális elektroforézis rendszeren (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). A futtatás után 2,5 %-os Triton X-100 oldatban a géleket

30 percig mostuk, mellyel a gélben lévő SDS-t („sodium dodecil sulfate”, nátrium-dodecil-szulfát) távolítottuk el az enzimek renaturálásához. A mosás után a gélt 20 órán át inkubáltuk 50 mM Tris (pH 7,5), 10 mM CaCl<sub>2</sub> oldatban 37 °C-on. Az inkubáció után fixáló oldattal (30 v/v%-os metanol, 10 v/v%-os ecetsav) 30 percig mostuk a gélt, ezzel leállítva az enzimek működését, majd 30 percig Coomassie Brilliant Blue-val kékre festettük a zselatint és a kazient. A festés után további fixálást végeztünk. A Coomassie Brilliant Blue által a kékre festett zselatin és kazein háttérből, az enzim aktivitás hatására a kiemésztett zselatin és kazein helyén átlátszó terület látszik. Az átlátszó részek denzitometriával mért területeinek aránya alapján megadható az enzimek aktivitása (78).

#### **IV.15. Dot-blot**

A sejtek médiumából 200 µl-t vákum-pumpa segítségével (Millipore) metanollal aktivált PVDF membránra (Millipore) blottoltuk. Az esetlegesen jelenlévő endogén peroxidázok blokkolására 2 v/v% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-al 5 percig inkubáltuk a membránt. A TBS-es mosás után TBS-ben oldott 5 w/v%-os tejjel blokkoltuk a membránt egy órán át szobahőmérsékleten, így lekötve az ellenanyag számára aspecifikus kötőhelyeket. Az elsődleges ellenanyaggal 4°C-on egy éjszakán át inkubáltunk, majd ismételt mosási lépések után HRP-vel konjugált másodlagos ellenanyagokat használtunk egy órán át szobahőmérsékleten. A jel előhívásához a SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate Kit-et (Pierce/Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) használtuk. (Az alkalmazott ellenanyagok listáját az **5. táblázatban** foglaltam össze.)

#### **IV.16. Western-blot**

A fehérje mintákból 15µg fehérjét elkevertük β-merkaptóetanolt tartalmazó Laemmli minta pufferben (250 mM Tris-HCl pH=8, 50 v/v% glicerin, 5 w/v% SDS, 0,05 w/v% brómfenolkék). A fehérjéket 95°C-on 5 percig denaturáltunk, majd 10%-os poliakrilamid gélen 200 V-on 35 percig futtattunk a már említett Bio-Rad Mini Protean rendszeren. A minták blottolása PVDF membránra (Millipore) egy éjszakán át történt

konstans 75 mA áramerősség alkalmazásával. Ponceau festéssel ellenőriztünk a fehérjék sikeres blottolását. Mosás után a nem specifikus kötőhelyeket 5 w/v% tejjel (Bio-Rad) vagy foszforilált fehérjék vizsgálata esetén 5 w/v% BSA-val blokkoltam egy órán át szobahőmérsékleten. Az elsődleges és másodlagos ellenanyagok használata valamint a jel előhívása a Dot-blotnál leírtaknak megfelelően történt. (Az alkalmazott ellenanyagok listáját az **5. táblázatban** foglaltam össze.)

#### **IV.17. Proteoglikán izolálás**

0,1 g N<sub>2</sub>-ben porlasztott máj mintához 1 ml extrakciós puffert adtunk az alábbi összetételben: 4 M guanidium-HCl, 50 mM nátrium-acetát, 0,063 g/v% NEM (N-etilmaleimid), 0,009 g/v% PMSF („Phenylmethanesulfonyl fluorid”, fenilmetánszulfonil-fluorid), 0,001 v/v% szója-tripszin inhibitor, 5 v/v% Gordox (aprotinin infúzió, Richter Gedeon, Budapest), pH=5,5. Az extrakciós pufferben szuszpendált mintákat egy éjszakán át 4°C-on inkubáltuk, majd 7 M urea, 50 mM Tris (pH=7,5), 0,063 w/v% NEM, 0,009 w/v% PMSF, 0,001 v/v% szója-tripszin inhibitor, 5 v/v% Gordox tartalmú dializáló oldat ellenében dializáltunk 4°C-on 48 órán át a guanidium-HCl eltávolítása érdekében. A dializált mintákat a DEAE (DE52, Whatman Int. Ltd., Maidstone, England) oszlopra kötöttük. Az oszlopokat 7 M ureát és 0,1 M illetve 0,2M NaCl-ot tartalmazó oldattal mostuk. Az oszlopról a proteoglikánokat 0,8 M NaCl tartalmú 7 M ureával eluáltuk. Az eluátumot 75%-os etanollal egy éjszakán át inkubáltuk -75°C-on, így precipitáltuk a proteoglikánt. A kicsapott mintát Speedvac-al (Savant, Thermo-Fischer Scientific) kiszárítottuk, majd a Western-blotnál leírt minta pufferben feloldottuk végül a Western-blotnál leírtak alapján feldolgoztuk.

#### **IV.18. Glükózaminoglikán (GAG) izoláció**

Egyenlő térfogatú fagyasztott máj mintát lizáltuk 10 ml 0,1 M-os Tris-HCl (pH 7,9)-ben, ami tömény acetonnal négyszeres térfogatára kihígítottuk, majd egy éjszakán át szobahőmérsékleten inkubáltuk. Másnap 3000 RPM-en 30 percen át 4°C-on

centrifugáltuk, és a leülepedett pelletet háromszor átmostuk tömény acetonnal. A pelletet ezután szobahőmérsékleten kiszárítottuk, majd reszuszpendáltuk 5 ml 0,1 M-os Tris-HCl (pH 7,9)-ben. A fehérjék emésztése céljából nem specifikus proteázt (Cat. No. P8811, Sigma Aldrich) adtunk a mintához, majd 50°C-on három napon át zajlott az emésztés. A proteázt több alkalommal adtunk a mintákhoz, hogy az elegyben a felesleget biztosítsuk. A  $\beta$ -elimináció céljából NaOH-t adtunk a rendszerhez 0,5 M-os végkoncentrációban, majd szobahőmérsékleten 4 órán át inkubáltuk, végül az inkubáció után minden egyes minta pH-át 7,5-re állítottuk be HCl hozzáadásával. A mintában még esetlegesen jelenlévő makromolekulák eltávolítása érdekében triklór ecetsavat használtuk 10 v/v% végkoncentrációban, amely reakció egy órán át jégen 4°C-on zajlott. Ezt követően 30 percen keresztül 3000 rpm-en centrifugáltuk szobahőmérsékleten, majd a felülúszót cellulóz dializáló membrán csövekbe töltöttük (Cat. No. D9527, Sigma Aldrich) és dH<sub>2</sub>O ellenében 4°C-on három napon keresztül dializáltuk. A dialízis után a mintákat 0,5 v/v% cetilpiridium-klorid (CPC, Cat. No. C9002, Sigma Aldrich) és 0,02 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-el precipitáltuk, majd egy órán át 5000 rpm-el 4°C-on centrifugáltuk, és a pellethez 1 ml 100:15 arányban hígított 2 M NaCl-t és 96% etanolt adtunk. Ezt követően a mintát 5 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk, így disszociáltuk a CPC-GAG komplexet. A mintákat ezután 4°C-on 24 órán át precipitáltuk 96%-os etanol, 1 w/v% Na-acetáttal és 1 v/v% ecetsavval négyszeres térfogatra hígítva. A precipitátumokat ezután acetonnal mostuk, levegőn kiszárítottuk, majd dH<sub>2</sub>O-ban szuszpendáltuk. A GAG mennyiségét dimetil-metilénkék módszerrel határoztuk meg (79), a reakció abszorbanciáját 525 nm-en mértük meg.

#### **IV. 19. Fotódokumentáció**

A zselatináz, kazeináz reakciókhoz, a Western valamint a Dot-blothoz használt gélek és membránok fotózását a Kodak IS4000MM Digital Imaging System rendszerrel, és a hozzá kapcsolódó szoftver programmal végeztük. A gélekről készült képeken a denzitometriai vizsgálatok az enzimreakciók és a fehérje mennyiségek szemi-kvantitatív meghatározását teszi lehetővé.

## IV.20. Szöveti multiblokk (TMA) összeállítása

Az eltérő etiológiájú formalinban fixált, paraffinba ágyazott cirrhotikus májblokkból két-két reprezentatív core-t kiszűrve szöveti multiblokkot („tissue microarray”-t, TMA-t) készítettünk. Az I.sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet archívumából származó máj minták közül 13 eset alkoholos májkárosodásból, 4 eset hepatitis B, míg 13 eset hepatitis C vírus fertőzés talaján kialakult májcirrhotikus esetből származott. A vizsgálat az etikai normáknak megfelelően történt (etikai engedély: TUKEB 95/1999 és 2/2012).

A TMA-ból készített metszeteken az immunreakciókat a már korábban leírtak szerint végeztük.

## IV.21. Statisztikai analízis

A statisztikai analízist a GraphPad Prism. 6.01 programmal végeztük (GraphPad Software Inc.). A kapott adatok alapján átlagot, szórást számoltunk. A normál eloszlás vizsgálatát a D'Agostino és Pearson omnibus normalitás teszttel végeztük. Az eredmények eloszlása alapján non-parametrikus (Mann-Whitney) vagy Student féle t-próbát alkalmaztunk. Különböző szignifikancia szinteket határoztunk meg:

- \*:  $p < 0,05$
- \*\*:  $p < 0,01$
- \*\*\*:  $p < 0,001$

### 5. táblázat. Használt ellenanyagok listája

Ellenanyag neve	Cat. No.	Gyártó	Reakció	Hígítás
Alfa- simaizomaktin (clone E184)	1184-1	Epitomics	Western	1:1000
Alfa- simaizomaktin (clone E184)	1184-1	Epitomics	IHC	1:100
phospho-Akt (Thr308) (clone C31E5E)	2965	CellSignaling	Western	1:1000
phospho-Akt (Ser473) (clone 193H12)	4058	CellSignaling	Western	1:1000
Anti-Collagen 1, poliklonális	ab34710	AbCam	Dot-blot	1:1000



Anti-Collagen type I, poliklonális	234167	Calbiochem	IHC	1:100
FAK, poliklonális	3285	CellSignaling	Western	1:1000
phospho-GSK-3 $\alpha/\beta$ (Ser21/9), poliklonális	9331	CellSignaling	Western	1:1000
NFKB (clone D14E12)	8242	CellSignaling	Western	1:1000
phospho-p44/42 MAPK, pErk1/2 (clone D13.14.4E)	4370	CellSignaling	Western	1:1000
phospho-Smad2 (Ser465/467) (clone 1385D)	12747	CellSignaling	Western	1:1000
phospho-Smad3 (Ser423/425) (clone C25A9)	12747	CellSignaling	Western	1:500
Anti-Syndecan-1 (clone EPR6454)	MABT-516	Merck	Dot-blot	1:1000
Anti-Syndecan-1 (clone EPR6454)	MABT-516	Merck	IHC	1:500
Anti-Syndecan-1 (clone MI15)	M7228	Dako	p-IHC	1:100
Heparán- szulfát (clone 10E4)	370255-S	Seikagaku, Amsbio	Western	1:500
Heparán- szulfát (clone 10E4)	370255-S	Seikagaku, Amsbio	IHC-p	1:75
Thrombospondin-1, poliklonális	sc-12312	Santa Cruz	Western	1:500
MMP-14 (clone EP1264Y)	ab51074	AbCam	IHC-P	1:400
GSK-3 $\beta$ (clone 27C10)	9315	CellSignaling	Western	1:1000
Akt (clone C67E7)	4691s	CellSignaling	Western	1:1000
Erk1/2 (clone 137F5)	4695s	CellSignaling	Western	1:1000
Humán Syndecan-1 ECM, poliklonális	AF2780	R&D	IHC-p	10 $\mu$ g/ml
Mouse Syndecan-1 ECM, poliklonális	AF3190	R&D	Western	1:1000
Syndecan-1, poliklonális	3643R-100	BioVision	Western	1.500

**Másodlagos****ellenanyagok listája**

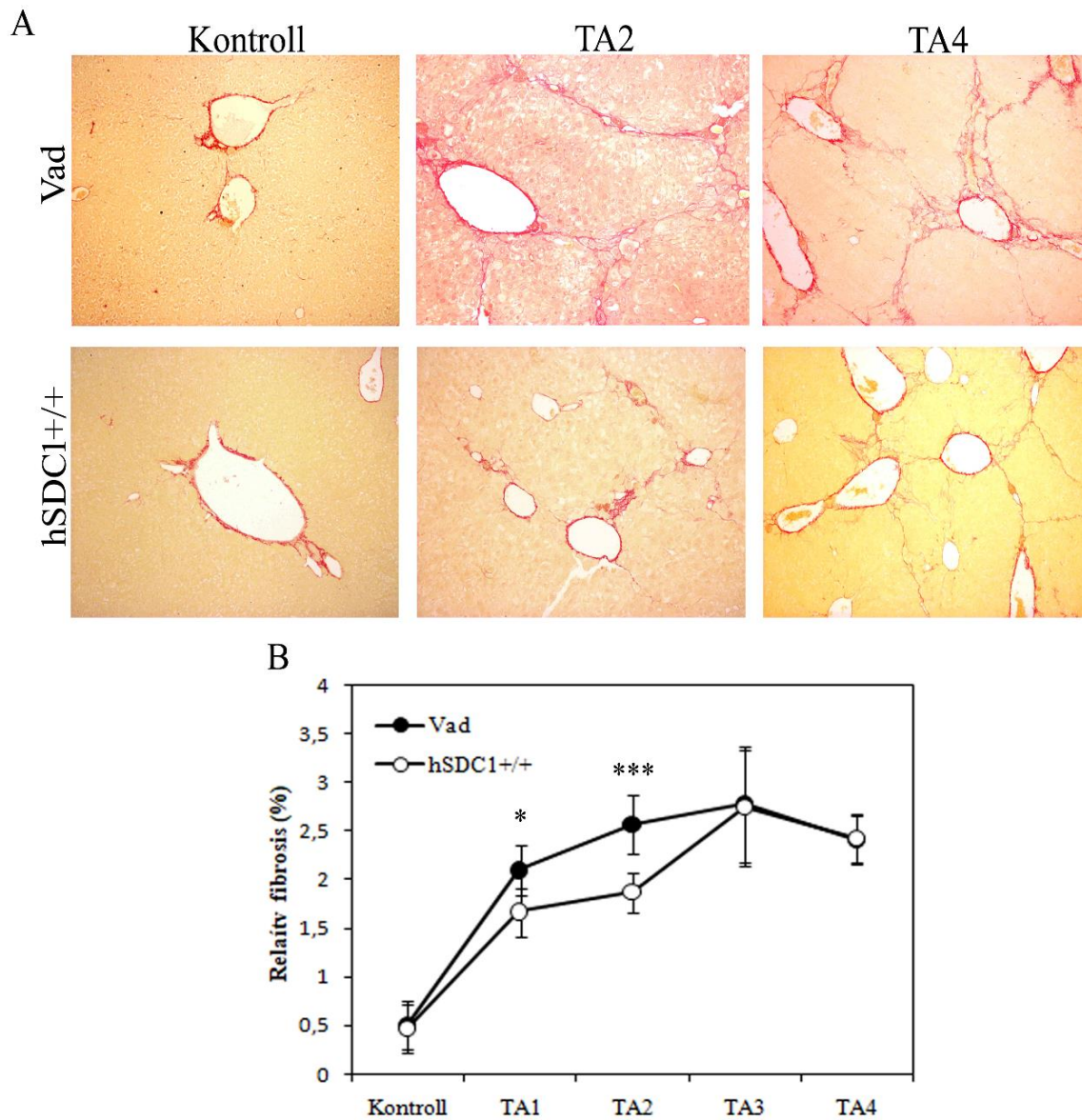
Donkey anti-Rabbit IgG (H+L), Alexa Fluor 555	A-31572	MolecularProbes, Invitrogen	IHC, ICC	1:200
Donkey anti-Goat IgG (H+L), Alexa Fluor 488	A-11055	MolecularProbes	IHC, ICC	1:200
Goat anti-Rabbit Immunoglobulins/HRP	P0448	Dako	Western, Dot-blot	1:2000
Rabbit anti-Goat Immunoglobulins/HRP	P0449	Dako	IHC-p	1:200

Rabbit anti-Goat Immunoglobulins/HRP	P0449	Dako	Western	1:2000
---	-------	------	---------	--------

## V. EREDMÉNYEK

### V.1. A humán syndecan-1 jelenléte késleltette a májfibrosis kialakulását

A humán syndecan-1 transzgén (hSDC1+/+), illetve vad típusú egerek májszövetét a thioacetamid (TA) kezelést követően az első (TA1), második (TA2), harmadik (TA3) és negyedik (TA4) hónapban vizsgáltuk. Kezelés nélkül kötőszövet csak az erek körül figyelhető meg mind a humán syndecan-1-et termelő, mind a vad állatok májában. A thioacetamid kezelés második hónapjában, a transzgén egerekben szignifikánsan kevesebb volt a felhalmozódott kötőszövet mennyisége a vad példányokhoz képest. A negyedik hónap végére a felhalmozódott kötőszövet mennyisége kiegyenlített a két csoport között. **(13. ábra)**



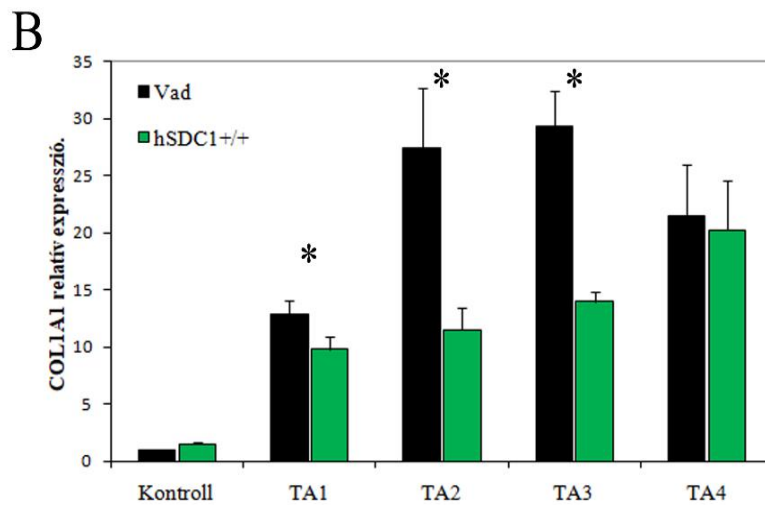
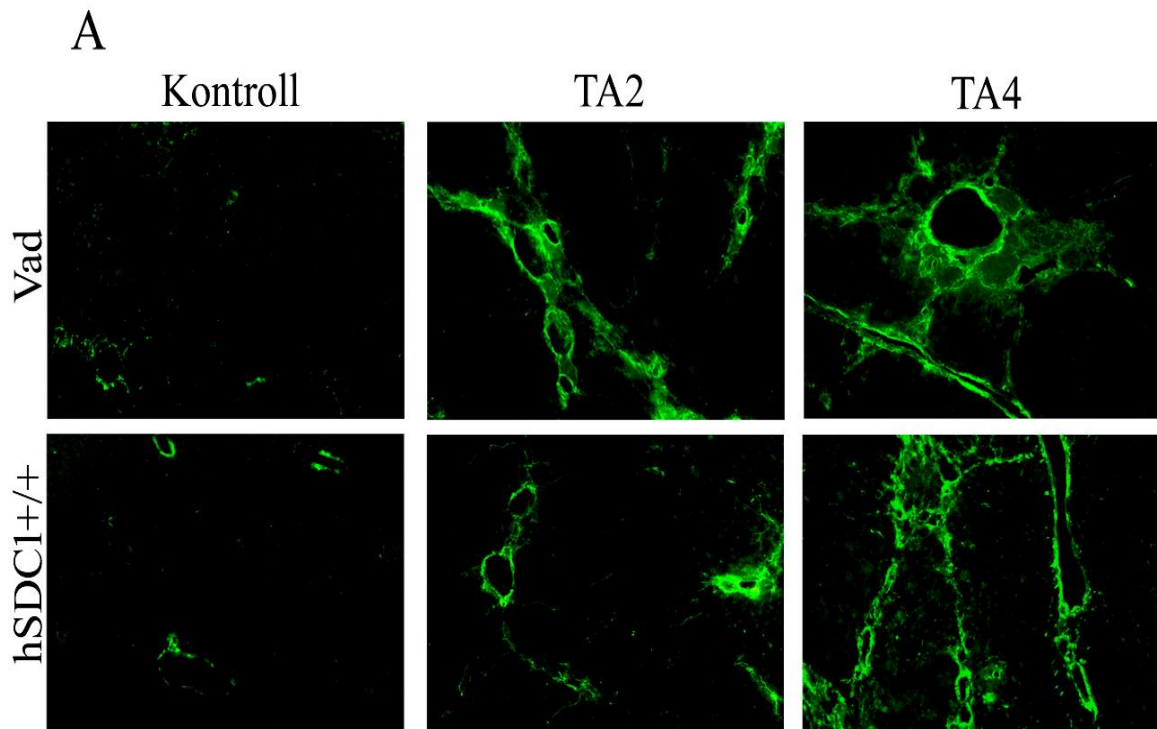
**13. ábra.** A: Picosirius vörös metszetek vad és syndecan-1 transzgen egér mintákból. A Picosirius vörös metszetek vad és syndecan-1 transzgen egér mintákból. A képek 10x-es nagyítással készültek. B: Morfometriai analízis eredménye. \*:  $p < 0,05$  \*\*\*:  $p < 0,001$ . Jelmagyarázat: hSDC1+/+: humán syndecan-1 transzgen egér törzs; TA1: egy hónapos thioacetamid kezelés TA2: két hónapos thioacetamid kezelés TA3: három hónapos thioacetamidis kezelés TA4: négy hónapos thioacetamid kezelés

## V.2. Kollagén-1 termelése és felhalmozódása

A thioacetamid kezelést követően felhalmozódott kötőszövet mennyiségének egyik legfontosabb komponense a kollagén-1, mely mennyiségét fehérje és mRNA szinten vizsgáltuk.

A fagyasztott májából készült metszeteken kezelés nélkül mindkét csoportban megfigyelhető a kollagén-1 jelenléte az erek falában. A picrosirius vörössel festett metszetekhez hasonlóan a kollagén-1 immunreakciók esetén is megfigyelhető a fehérje felhalmozódása a sinusoidokban az acino-perifériás régióban. A negyedik hónapban a hSDC1<sup>+/+</sup> mintákban a kollagén-1 mennyisége az immunreakciók alapján kevesebbnek bizonyult a vad csoporthoz képest. **(14. A ábra)**

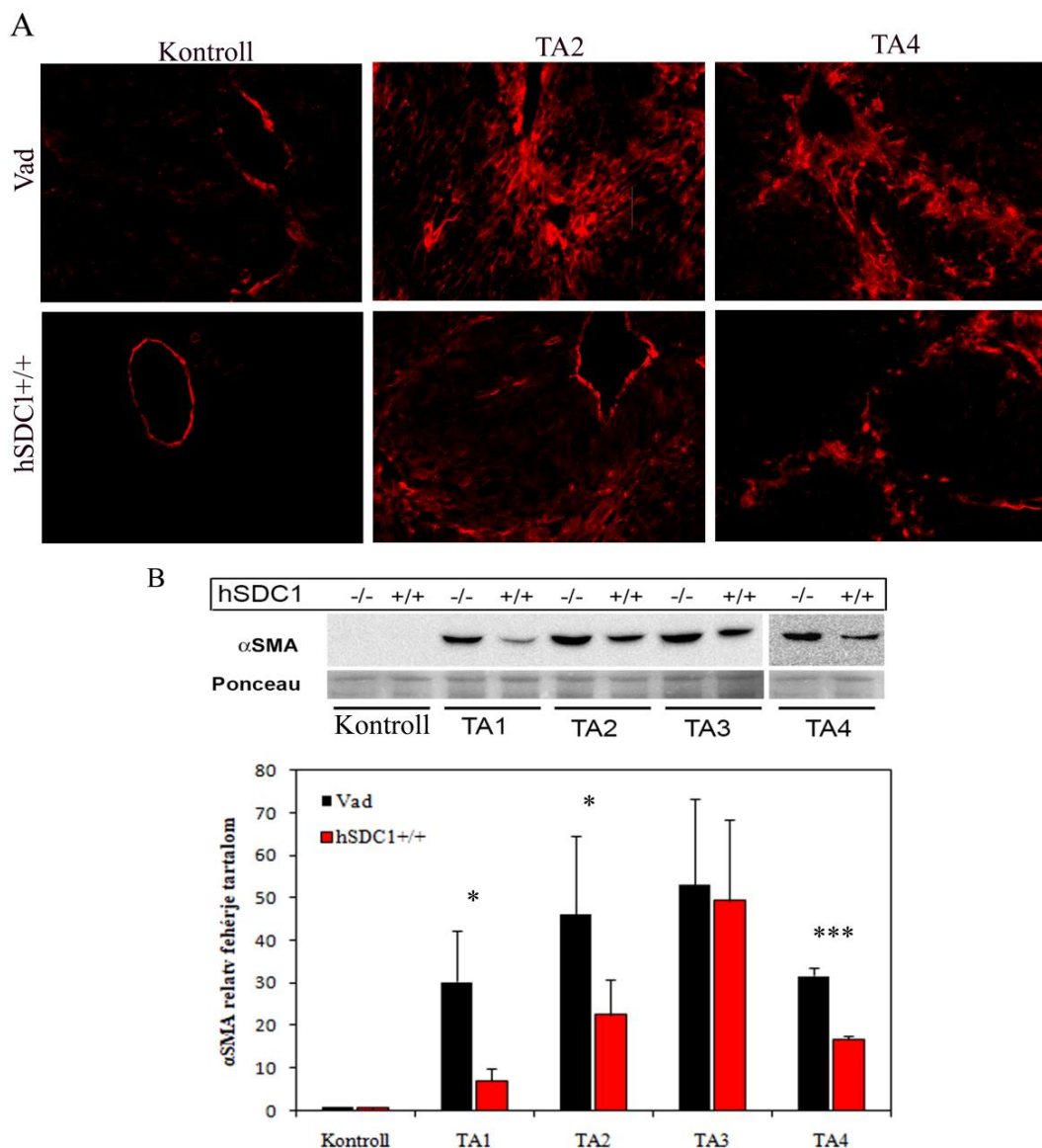
A I-es típusú kollagén mRNA szintű változása hasonló mintázatot mutatott a korábbiakkal: a thioacetamid kezelés első három hónapjában, a vad példányokban a kollagén-1 mRNA szintje szignifikánsan magasabb volt a transzgén egerekhez képest. **(14. B ábra)**



**14. ábra.** A: Kollagén-1 fehérje immunhisztokémiai kimutatása syndecan-1 transzgén (hSDC1+/+), illetve vad típusú egerek májszövetében. A képek 10x nagyítással készültek. B: A kollagén-1 (COL1A1) mRNS expresszió változása a fibrogenesis során. Szignifikancia szint: \* $p < 0,05$

### V.3. Myofibroblastok aktivitása

A myofibroblastok aktiválódását az  $\alpha$ SMA mennyiségének változásával követtük nyomon. A kezeletlen állatok májában SMA pozitivitást az erek körül tudunk megfigyelni, míg a thioacetamid kezelés során tapasztalt SMA reakció jól korrelált a kollagén-1 vizsgálatánál tapasztaltakkal. A máj lizátumokból mért SMA mennyisége a vizsgált hónapokban a transzgen egerek esetében sohasem haladta meg a vad típusoknál tapasztalt értékeket. (15. ábra)



**15. ábra.** A: Simaizom aktin immunhisztokémiai reakció hSDC1+/+, illetve vad típusú egerek májszövetében. A képek 10x nagyítással készültek. B: Simaizom aktin Western-blot és denzitometria eredménye. Szignifikancia szint: \* $p < 0,05$   
\*\*\* $< 0,001$

#### V.4. TGF $\beta$ 1 jelátviteli útvonal változása

A TGF $\beta$ 1 a májfibrosisának kialakulása során aktiválja a fibroblastok myofibroblasttá alakulását, ezzel elősegítve a fibrotikus kötőszövet felépülését, így expressziójának vizsgálata és a jelátviteli útvonalának aktiválása fontos szempont a fibrosis vizsgálata során.

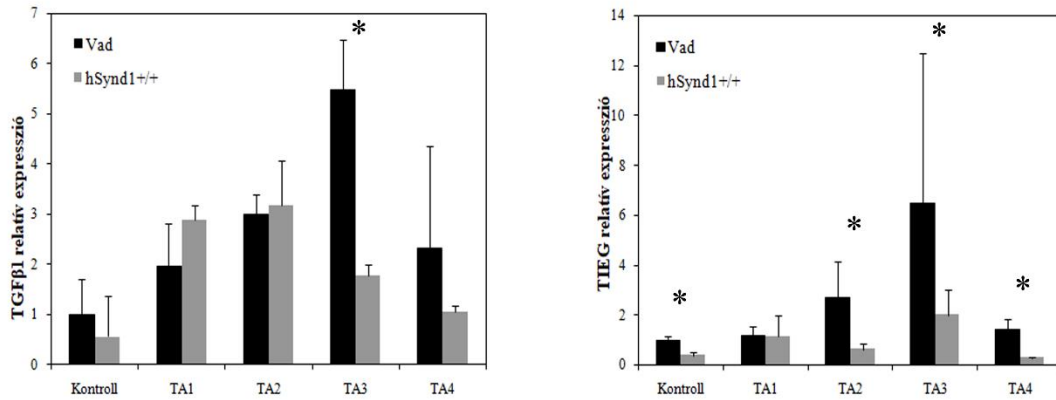
A TGF $\beta$ 1 termelése májkárosító hatása nélkül is kevesebbnek bizonyult a transzgén egerekben a vad állatokban tapasztaltakhoz képest. A thioacetamid expozíció megemeli a TGF $\beta$ 1 mRNS mennyiségét mind a két csoportban. Habár a kezelés első két hónapjában a TGF $\beta$ 1 transzkripció valamelyest aktívabb a hSDC1  $+/+$  példányokban a vad példányokhoz képest, a harmadik hónapban éri el a tetőpontot a TGF $\beta$ 1 átírása a vad állatok esetében, azonban a transzgén egerekben ekkor már csökkenő tendenciájú transzkripció figyelhető meg, mely eltérés szignifikánsnak bizonyult. **(16. A. ábra)**

A TGF $\beta$ 1 korai válasz génjének, a TIEG expresszió változásának mintázata a vad példányok esetében követte a TGF $\beta$ 1 expressziójánál leírtakat. Ezzel ellentétben a transzgén példányok esetében a kezelés hatására érdemi TIEG expresszió emelkedést nem tapasztaltunk. A két csoport közötti különbség a kontroll, valamint a kezelés második és negyedik hónapjában bizonyult szignifikánsnak. **(16. A. ábra)**

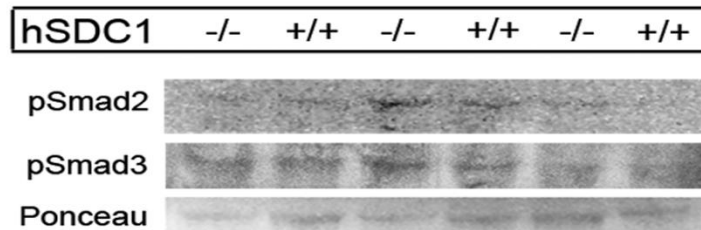
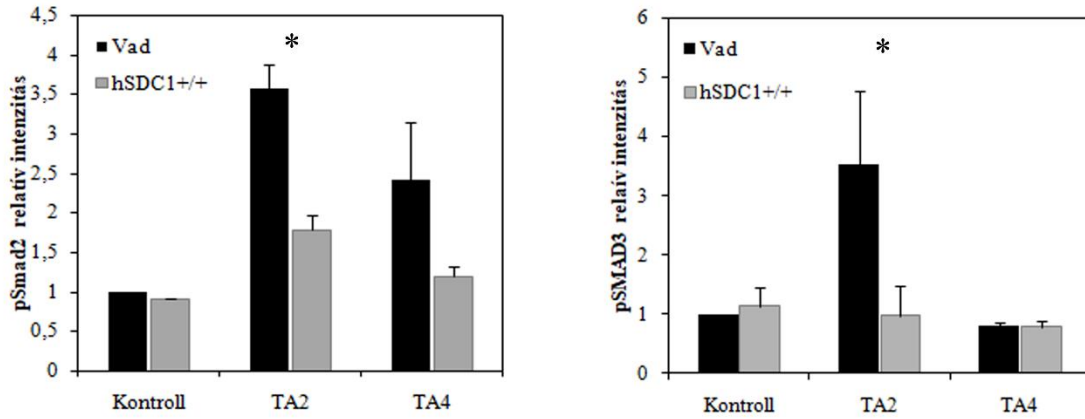
A pSmad2 és a pSmad3 a TGF $\beta$  jelátviteli útvonalának kanonizált vonala, ezen fehérjék foszforilált formájukban a Smad pálya aktivációját mutatják. Kezelés nélkül mind a pSmad2, mind a pSmad3 mennyisége egyenlőnek bizonyult a két csoportban. A kezelés második hónapjában a pSmad-ok mennyisége szignifikánsan nagyobb volt a vad állatokban a transzgén egerekhez képest. Ez a különbség a negyedik hónap végére kiegyenlített a két csoport között. **(16. B. ábra)**



A



B

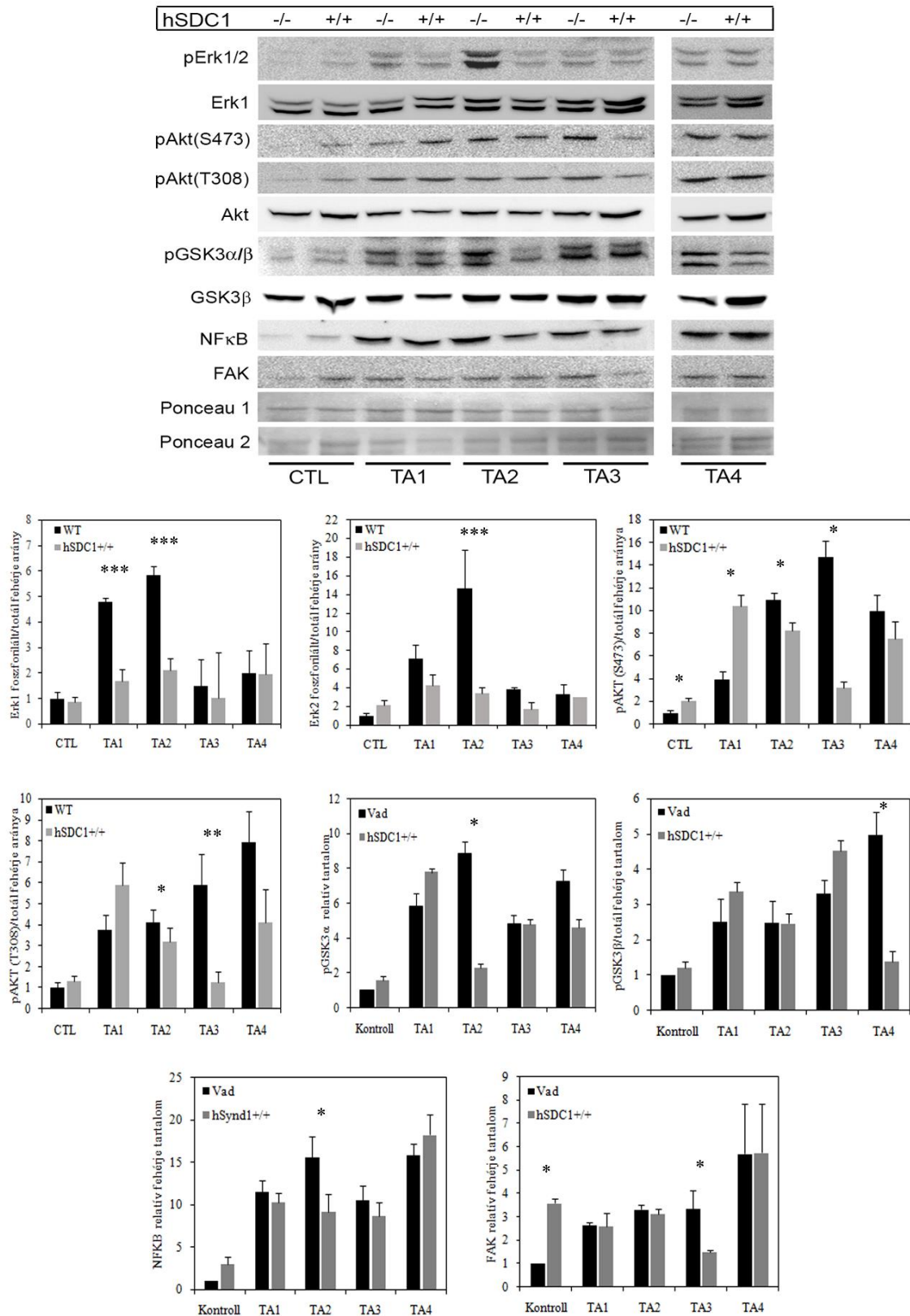


**16. ábra.** A: TGFβ1 és TIEG mRNS szintű változása a fibrogenesis során. Szignifikancia szint \*p<0,05. B: pSmad2 és pSmad3 Western-blot és denzitometria. Szignifikancia szint \*p<0,05

## **V.5. A humán syndecan-1 módosító hatása a jelátviteli utak aktivitása során**

A májfibrosisa során a TGF $\beta$ 1 Smad jelátviteli útvonala mellett más utak is aktiválódnak, mely pályák fehérjéinek mennyiségének változását Western-blottal vizsgáltuk.

A kontroll humán syndecan-1 egerek esetében minden, vizsgált jelátviteli útvonal aktívabbnak bizonyult a vad példányokhoz képest, szignifikáns különbséget azonban csak a FAK és pAKT-ok esetében tapasztaltunk. A pERK1/2 és a pAKT S473 mennyisége a thioacetamid kezelés első, az NF $\kappa$ B, a pAKT T308 és a pGSK3 a második, míg a FAK a harmadik hónapban bizonyult szignifikánsan aktívabbnak a vad csoportban a kontroll csoporthoz képest, ami a syndecan-1 gátló funkcióját mutatja ezen jelátviteli útvonalak aktiválása során. A két csoportnál tapasztalt különbségek a pGSK3 $\beta$  kivételével a thioacetamid kezelés negyedik hónapjában eltűntek a két csoport között. (17. ábra)



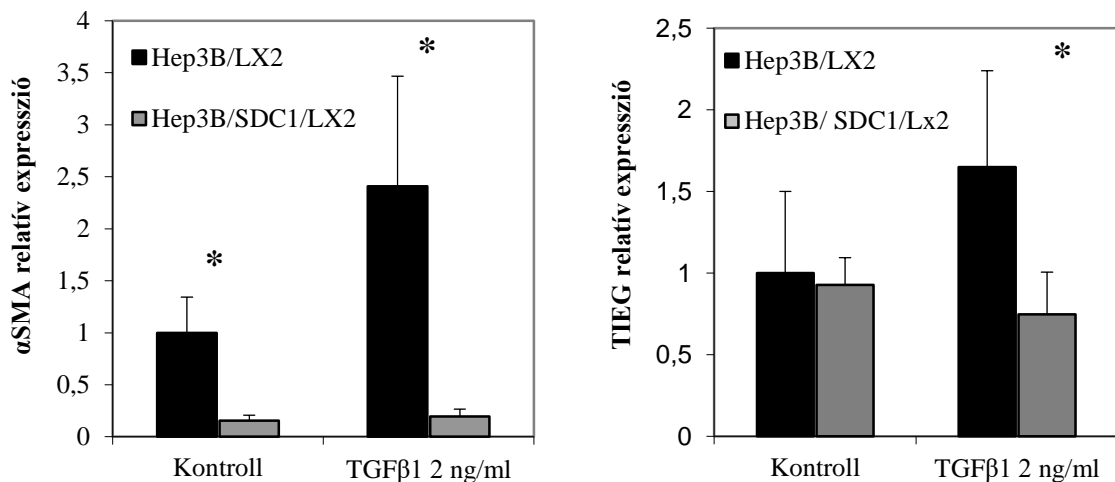
17. ábra. Jelátviteli utak aktivitásának vizsgálata Western-blottal. Szignifikancia szint:

\* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$

## V.6. A syndecan-1 túltermelés hatása LX2 immortalizált myofibroblastokon

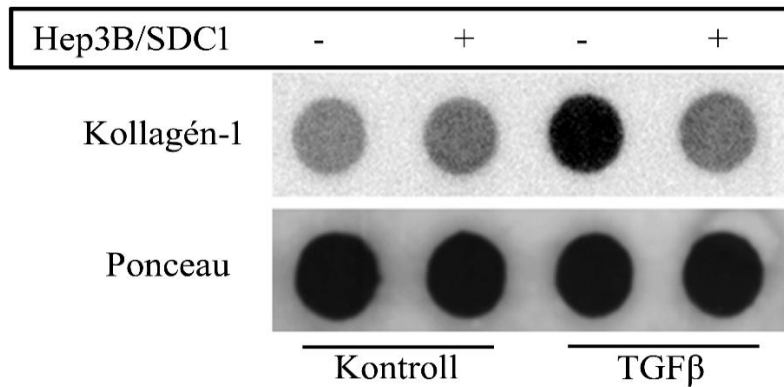
*In vitro* kísérletekben vizsgáltuk meg, hogy a syndecan-1 gátolja-e a TGF $\beta$ 1 hatását a myofibroblastokon. Ezért Hep3B és syndecan-1 túltermelő Hep3B sejtekkel direkt és felülúszó médiumukat alkalmazva indirekt ko-kultúras modelleket hoztunk létre, majd 2 ng/ml TGF $\beta$ 1 kezelést alkalmaztunk.

Azon ko-kultúras modellekben, ahol a médiumban jelentős mennyiségű humán syndecan-1 jelen van, TGF $\beta$ 1 hatás nem tudott érvényesülni. Az SMA és a TIEG expressziós szintje szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult a nem transzfektált hepatomákkal létrehozott tenyészetekéhez képest. (18. ábra)



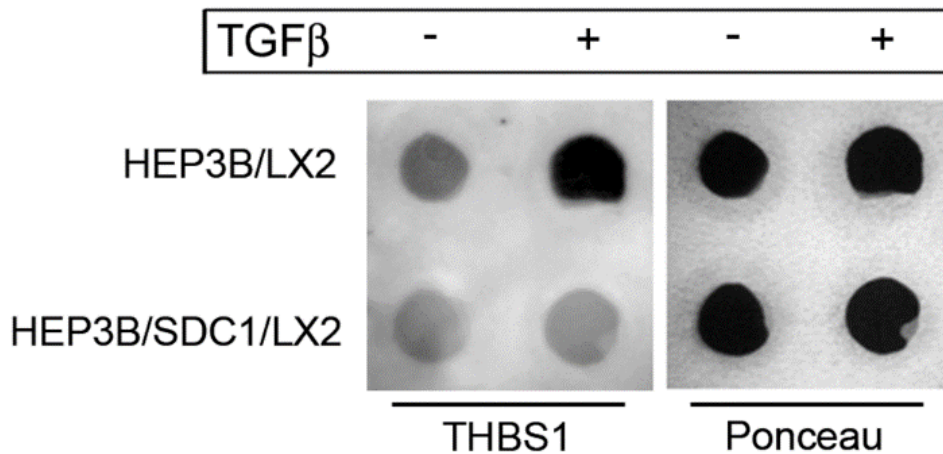
**18. ábra.** Az  $\alpha$ SMA és TIEG mRNS szintű vizsgálata RT-PCR módszerrel.  
Szignifikancia szint \*p<0,05

A kollagén-1 mennyiségének vizsgálata során is hasonló eltéréseket tapasztaltunk: TGF $\beta$ 1 kezelés hatására megnőtt a kollagén-1 mennyisége a médiumokban, azonban syndecan-1 túltermelő hepatoma sejtek jelenléte esetén szignifikánsan kevesebb volt a fehérje mennyisége a kontroll csoporthoz képest. (19. ábra)

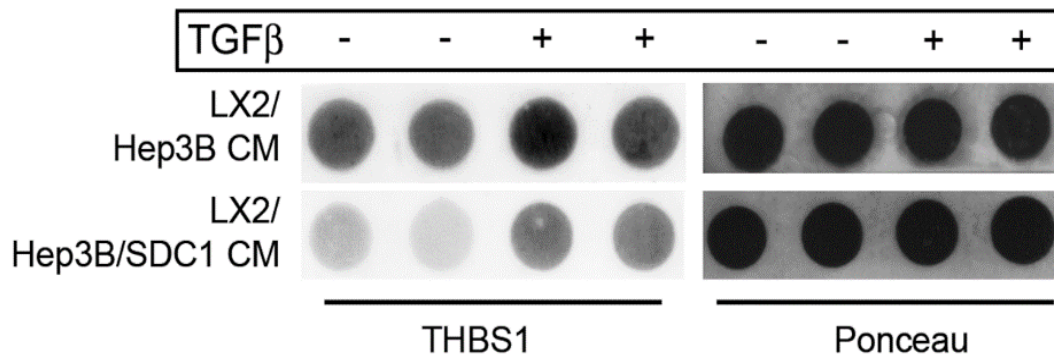


**19. ábra.** Kollagén-1 dot-blot a ko-kultúrási sejtmodellek médiumából.

Az inaktív TGFβ1 egyik legfontosabb aktivátora a thrombospondin-1 (THBS1). A THBS1 mennyisége megnő TGFβ1 kezelés hatására a Hep3B/LX2 ko-kultúrási sejtmodell médiumában, míg érdemi növekedést nem tapasztaltunk a Hep3B/SDC1/LX2 sejtek esetében. (**20. A ábra**) A hepatómák felszínén lévő thrombospondin-1 kötés kialakulásának elkerülése érdekében, megismételtük a fenti kísérletet a két hepatoma sejtvonal kondicionáló médiumával. Ebben az esetben a humán syndecan-1 excesszív mennyisége gátolta a THBS1 termelődését. (**20. B ábra**)



**20 A. ábra.** A direkt ko-kultúrási sejtmodellek médiumából készült thrombospondin-1 (THBS-1) dot-blot.

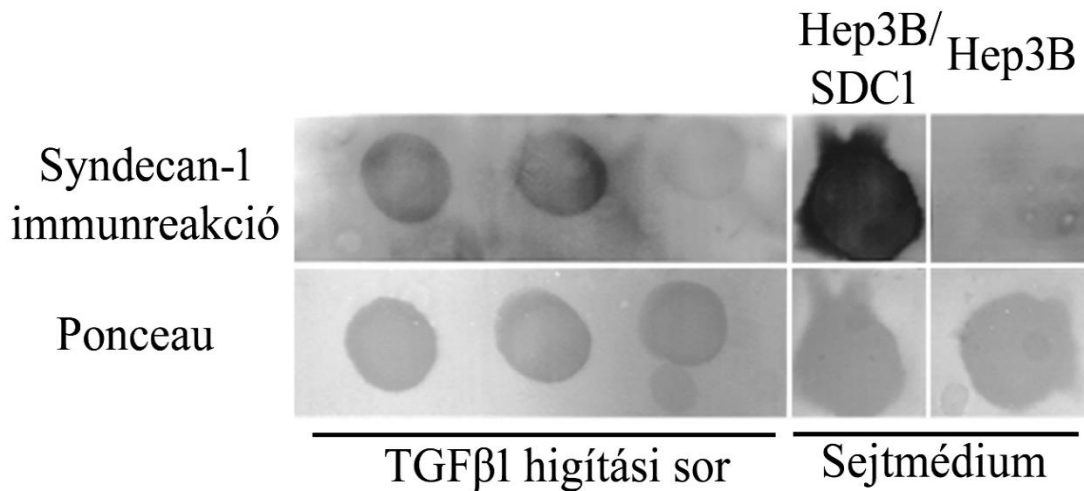


**20 B. ábra.** A: Az indirekt ko-kultúrási modellek sejtmediumából készített THBS-1 dot-blot.

## V.7. A syndecan-1 és TGFβ1 interakciójának vizsgálata

A fenti eredmények alapján igazolható, hogy a syndecan-1 gátolja többek között a TGFβ1 aktivált jelátviteli utakat, így megvizsgáltuk, hogy a syndecan-1 milyen kapcsolatban áll a TGFβ1 citokinnel.

Rekombináns TGFβ1-et immobilizáltunk PVDF membránra, melyet humán syndecan-1 túltermelő hepatoma sejtek mediumával inkubáltuk. Megfelelő mosási lépések után extracelluláris syndecan-1-el reagáló ellenanyaggal immunreakciót végeztünk. Az immobilizált TGFβ1-nek megfelelő területeken specifikus reakciót látunk, így bebizonyítottuk a syndecan-1 kötődését a TGFβ1-et. (**21. ábra**)



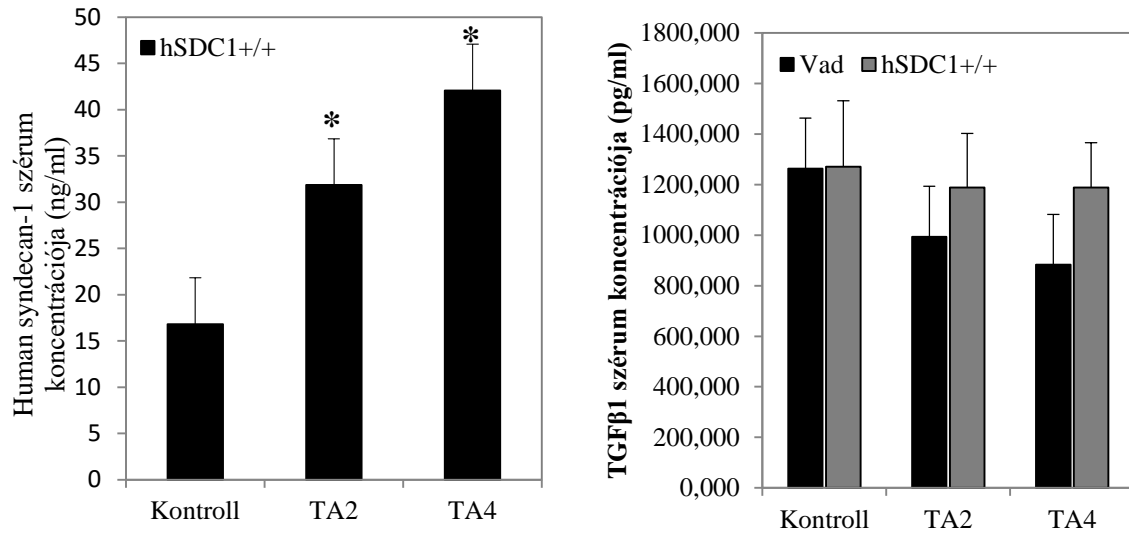
**21. ábra.** Syndecan-1 TGFβ1 kötődésének vizsgálata.

### V.8. A humán syndecan-1 és TGFβ1 szérumszintjének változása

A vad genotípusú állatokban sem a kontroll, sem a thioacetmiddel kezelt egerek plazmájában nem tudtunk kimutatni humán syndecan-1-et. A hSDC1<sup>+/+</sup> kezeletlen csoportban humán syndecan-1 plazma koncentrációja 16 ng/ml volt, mivel a sejtek természetes "turn overe" miatt a plazmában kerül a felszíni proteoglikán. A humán syndecan-1 szérumszintje a thioacetamid kezelés második hónapjában az állatokban 31 ng/ml-ra, míg a negyedik hónapban 42 ng/ml-re emelkedett. (**22. ábra**)

Az egér TGFβ1 szérumszintje a thioacetamid kezelés hatására a vad példányokban csökkenő tendenciát mutatott, míg a hSDC1<sup>+/+</sup> példányokban egy stabil

szintet tapasztaltunk, habár a két csoport közötti különbség nem bizonyult szignifikánsnak. (22. ábra)

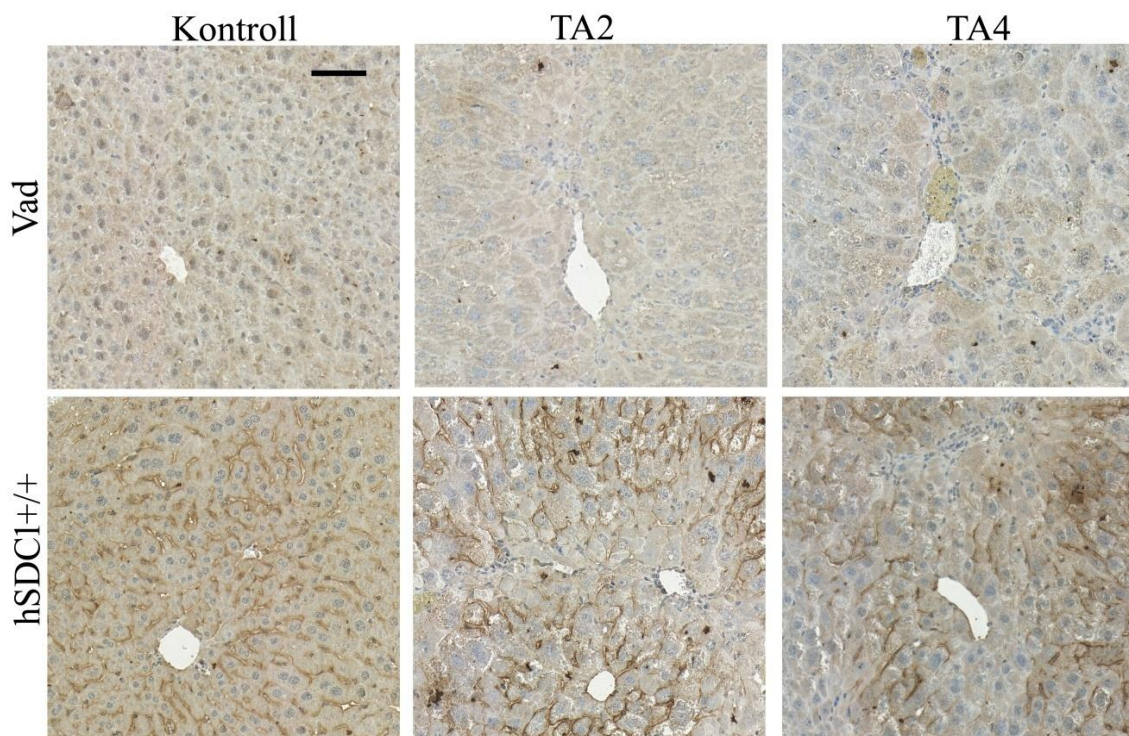


**22. ábra.** Humán syndecan-1 és egér TGFβ1 szérum vizsgálata ELISA módszerrel.  
Szignifikancia szint \* $p < 0,05$



### V.9.A humán syndecan-1, a glükózaminoglikán és heparán-szulfát mennyiségének változása

A humán syndecan-1 extracelluláris domain-jére specifikus ellenanyaggal végzett immunreakciók nem mutattak keresztreakciót a vad példányok májával. Kezelés nélkül a humán syndecan-1 a hepatocyták felszínén jelenik meg. A thioacetamid kezelés hatására a humán syndecan-1 mennyisége folyamatos csökkenést mutat. (23. ábra)

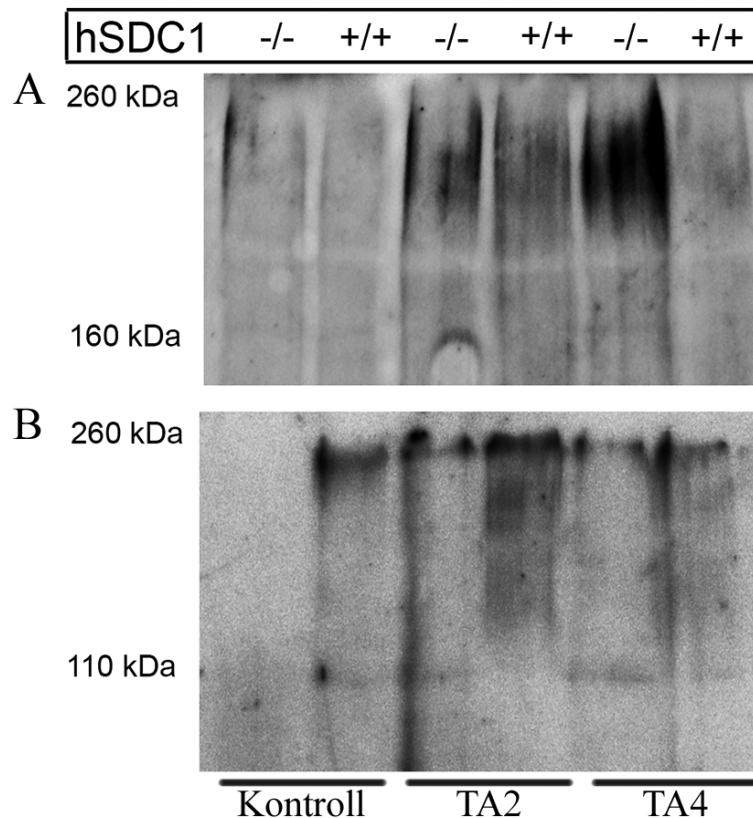


**23. ábra.** Humán syndecan-1 immunhisztokémiai egér májakban.

Lépték: 50  $\mu$ m.

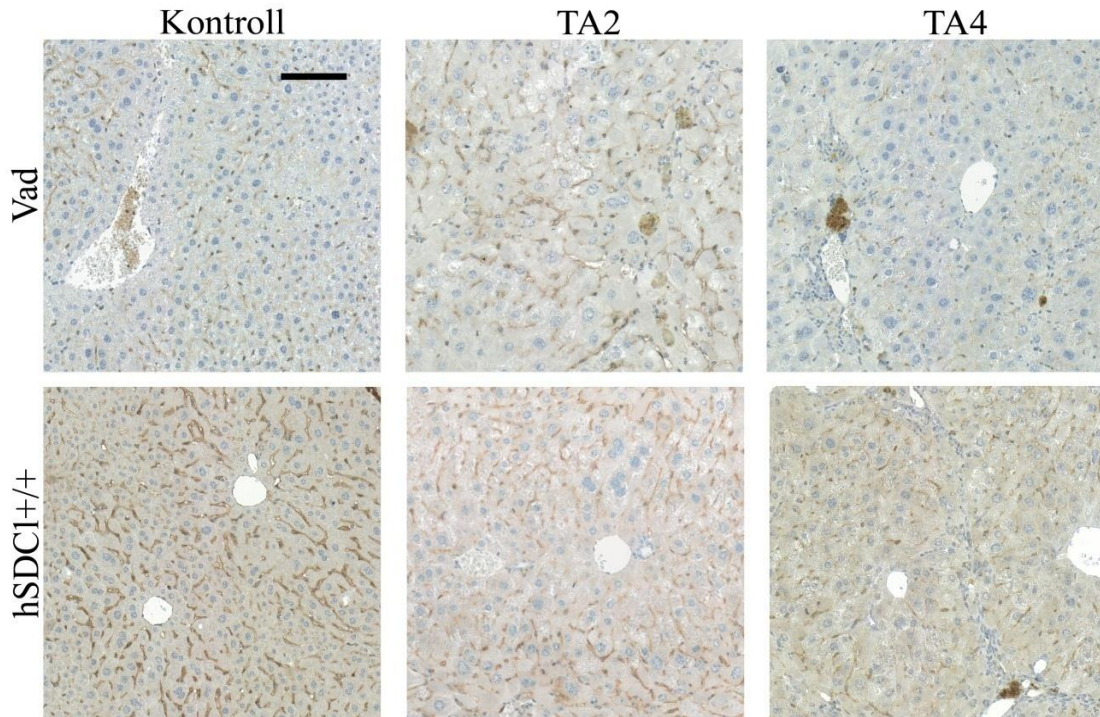
Az egér syndecan-1 mennyiségének a meghatározása érdekében teljes proteoglikán izolátumból végzett egér syndecan-1 Western-blotot végeztünk. A thioacetamid kezelés hatására mindkét csoportban progresszívan megnőtt az egér syndecan-1 mennyisége. A humán syndecan-1 transzgén egerekben az endogén egér syndecan-1 enyhébb emelkedést mutat, amely jelenség háttérében kompenzatorikus folyamatok állhatnak. **(24. A ábra)**

A syndecan-1 intracelluláris domain-e ellentervezett ellenanyaggal készült Western-bloton vizsgáltuk a májizolátumokban lévő össz syndecan-1 mennyiséget, mely magába foglalja shedding mechanizmusa után a májban maradó syndecan-1 csonkot is. Mind a két csoportban megnő az össz syndecan-1 mennyisége, azonban a transzgén egér törzsekben a syndecan-1 túltermelés miatt minden vizsgált hónapban nagyobb volt a syndecan-1 mennyisége. **(24. B ábra)** A gélen teljes proteoglikán izolátum futtatása történt, mely a cukor láncok változó mérete miatt „smear”-t képez a membránon, így a Western-blottal az immunreakció is „smear”-essé válik.



**24 ábra.** A: Vad és transzgén egerek májából izolált proteoglikán Western blotja egér syndecan-1 ellenanyaggal. B: Az egerek májából izolált proteoglikán Western blotja syndecan-1 intracelluláris domain ellenes ellenanyaggal.

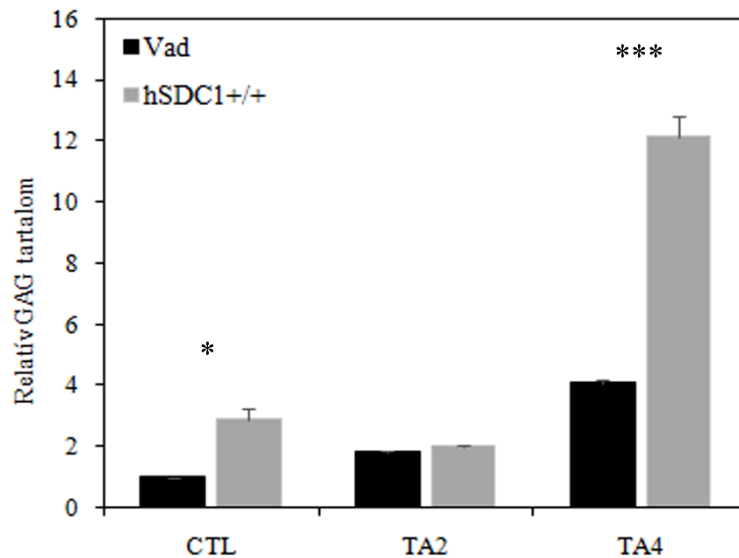
A proteoglikánok oldalláncokhoz kapcsolódó heparán-szulfát mennyisége a transzgén egerek esetén részben követte a humán syndecan-1 immunreakciónál tapasztaltakat. A kezelés második hónapja után a heparán-szulfát mennyisége progresszív csökkenést mutat a kísérlet befejezésig. A vad példányok májában a heparán-szulfát mennyisége a második hónapban emelkedik meg, míg a kezelés végére visszacsökken a kiindulási szintre. (25. ábra)



**25 ábra.** Heparán-szulfát immunhisztokémiai kimutatása az egér májokban. Lépték: 50  $\mu$ m

A homogenizált máj mintából megmértük az össz glukoaminoglikán mennyiséget is, mely nemcsak a heparán-szulfát, hanem a chondroitin-szulfát, dermatán-szulfát és keratán-szulfát mennyiségét is megadja. A kezeletlen, syndecan-1 transzgén egerek májában szignifikánsan több GAG-ot tudunk mérni, melynek forrása a nagy mennyiségben lévő humán syndecan-1-hez kapcsolódó heparán-szulfát és a kisebb mennyiségben jelenlévő chondroitin-szulfát oldalláncokkal magyarázható. A kezelés második hónapjában a két csoport között a GAG mennyiség kiegyenlítődik, míg a kezelés végére mindkét csoportban megnő az össz GAG mennyiség, és a transzgén egerek javára szignifikánsnak bizonyult a különbség a két csoport között. A kísérlet végén mért GAG

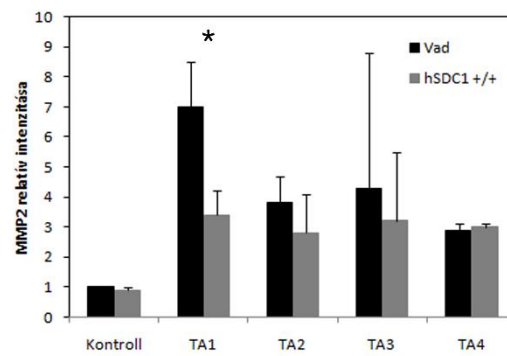
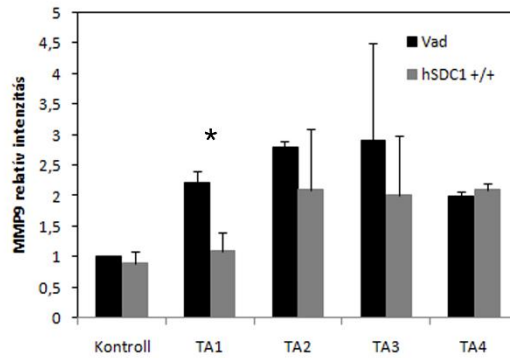
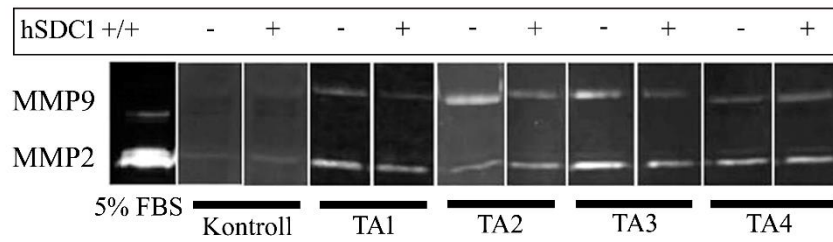
legnagyobb része mögött, tekintettel az **25. ábrán** bemutatott heparán-szulfát immunhisztokémiára, feltehetőleg más GAG-oknak, például a dermatán- és chondroitin-szulfátok mennyiségének növekedése áll.



**26. ábra.** Glukozaminoglikán relatív mennyisége dimetil-metilén kék (DMMB) módszerrel mérve. Szignifikancia szint  $*p < 0,05$

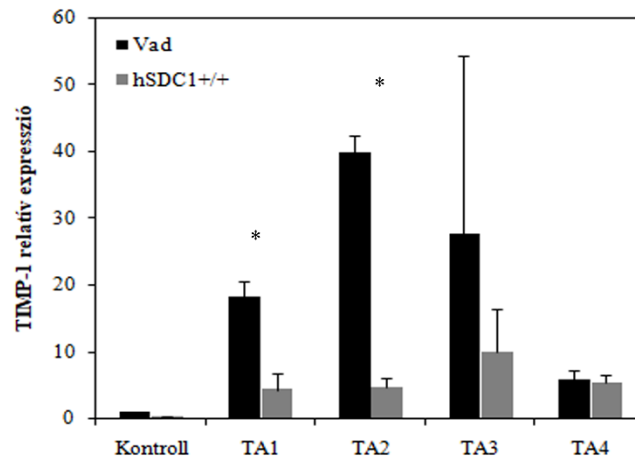
## V.10. Az MMP-2 és MMP-9 zselatinázok aktivitásának vizsgálata, TIMP-1 expressziójának változása

Az MMP-2 és -9 a thioacetamid a kezelés hatására mindkét csoportban megnő. Az MMP-9 esetében szignifikáns emelkedést tapasztaltunk a vad mintákban, azonban az enzim aktív formája nem jelent meg. Az MMP-2 esetén a kezelés első hónapjában tapasztaltunk szignifikáns különbséget a két csoport között az MMP-9 enzimhez hasonlóan a vad csoport javára, azonban az enzim aktív formájában itt sem jelent meg. (**27. ábra**)



27. ábra. Zselatináz aktivitás egerek májában. Denzitometria során a használt szignifikancia szint  $*p < 0,05$



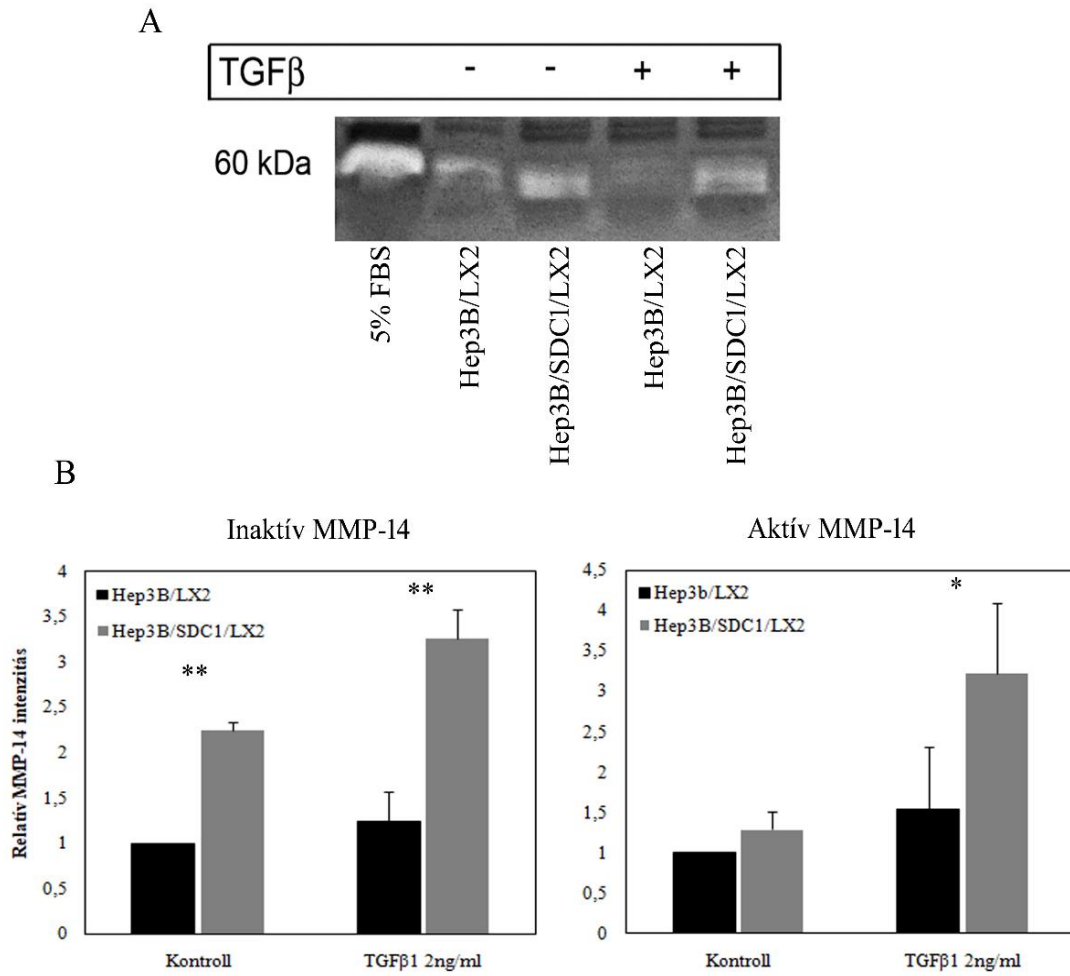


**28. ábra.** TIMP-1 mRNS szintű vizsgálata RT-PCR módszerrel. Szignifikancia szint \* $p < 0,05$

Az MMP-t gátló fehérjék közül a TIMP-1 mRNS szintű vizsgálata során, míg a vad példányok esetében szignifikáns emelkedést tapasztaltunk a kontroll csoporthoz képest, addig a humán syndecan-1 transzgén egerekben a thioacetamid hatására nem jelentkezett TIMP-1 mRNS szintű expressziója. (28. ábra)

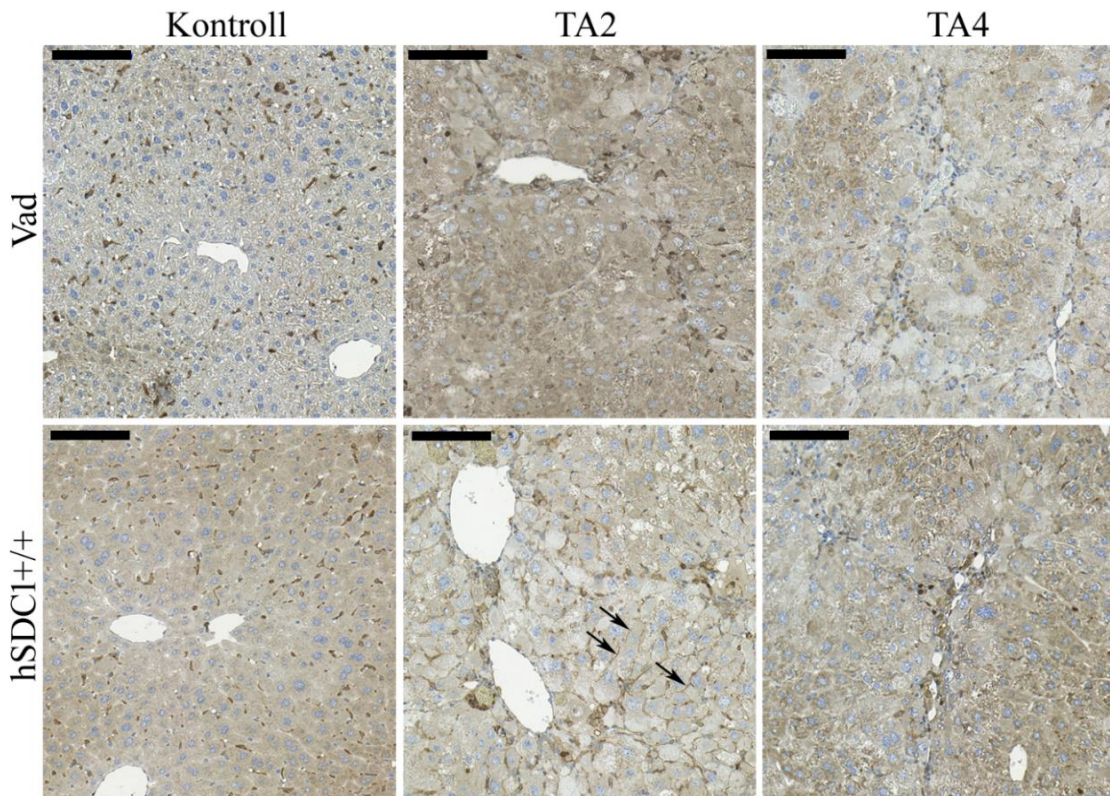
### V.11. MMP-14 (MT-MMP-1) aktivitásának vizsgálata

A Hep3B/LX2 és Hep3B SDC1/LX2 ko-kultúrák médiumaiban vizsgáltuk a kazeint bontó fehérjék aktivitását. Az MMP-14 mindkét sejt modell médiumában megjelent, habár a Hep3B/LX2 sejt ko-kultúra esetén kevesebb volt a syndecan-1 túltermelő mintákhoz képest. (29. ábra) Míg a Hep3B/LX2 modellben inkább az inaktív forma, addig a Hep3B SDC1/LX2 minták esetén az aktív forma is megfigyelhető. Az MMP-14 mennyisége nem változik a TGF $\beta$ 1 kezelés hatására. Azonban syndecan-1 jelenléte MMP-14 mennyiségét megnöveli.



**29. ábra.** A: MMP-14 enzim aktivitás vizsgálata kazeináz reakcióval. B: a denzitometriai vizsgálatok során használt szignifikancia szint: \* $p < 0,05$

Az egér mintákban MMP-14 immunreakcióval vizsgáltuk az enzim megjelenését és változását a kezelések során. Az MMP-14 a thioacetamid kezelés második hónapjában fokozódott a humán syndecan-1-et termelő májakban. A többi csoporttal ellentétben a hSDCI<sup>+/+</sup> állatok májában a kezelés második hónapjában nemcsak a sinusoidokban lévő non-parenchymalis sejteken, hanem a hepatocyták plazmamembránjában is megjelennek. (30. ábra)



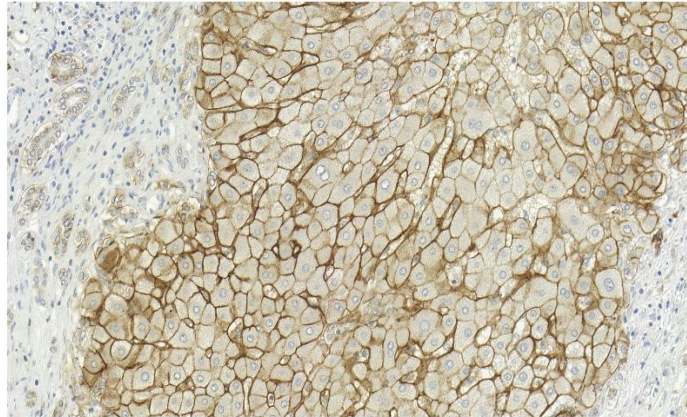
**30. ábra.** MMP-14 immunreakciók az egér máj mintákon. A syndecan-1 transzgén egerek májában a TA kezelés második hónapjában jelenik meg MMP-14 a hepatocyták felszínén. Lépték: 100  $\mu$ m



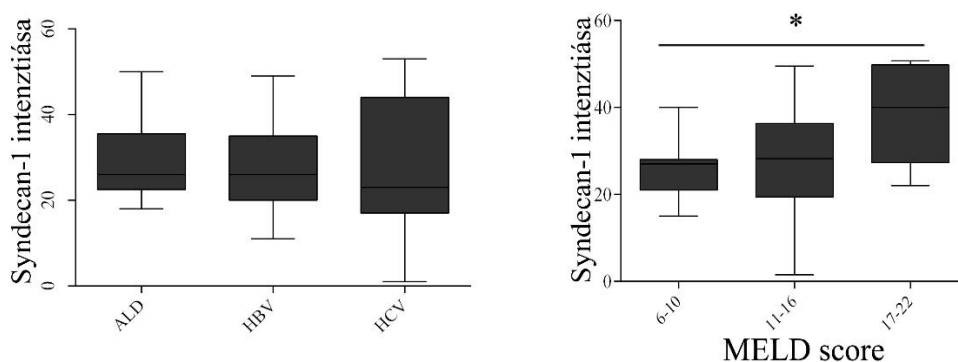
## V.12. Cirrhotikus humán májminták vizsgálata

Habár kutató csoportunk korábbi eredményei alapján már tudtuk, hogy a syndecan-1 mennyisége megnő cirrhosis hatására, megvizsgáltuk, hogy a májbetegségek klinikai vonatkozásában tapasztalható-e releváns, a diagnosztika és a terápia szempontjából is hasznos eltérés. A három leggyakoribb etiológiai faktort megvizsgálva pusztán az etiológia alapján nem találtunk szignifikáns eltérést az egyes csoportok között. A MELD-score pontérték emelkedése pozitív tendenciát mutatott a syndecan-1 szintjével, itt a legalacsonyabb és a legmagasabb pontérték közötti különbség szignifikánsnak bizonyult. (31. ábra)

A



B



**31 ábra.** A: Humán cirrhotikus máj mintákból készült syndecan-1 immunreakció egy reprezentatív területe. B: A reakció erősségének vizsgálata etiológia és a MELD score függvényében. ALD: alkoholos májbetegség („alcoholic liver disease”) HBV: hepatitis B vírus HCV: hepatitis C vírus. Szignifikancia szint  $*p < 0,05$ .

## VI. MEGBESZÉLÉS

A májbetegségek, közöttük is a májcirrhosis ma is egyike a vezető mortalitási és morbiditási okoknak. Májcirrhosis kialakulását elősegítő etiológiai tényezők közül a hepatitis C vírus fertőzés kezelésére már van elérhető terápiás lehetőség (80, 81), azonban a májcirrhosis prognózisának megítélésére jelenleg tökéletes marker még nem áll rendelkezésre. A kialakult májcirrhosis mai tudásunk szerint spontán regresszióra nem képes, egyedüli hatásos terápiás lehetőség a májtranszplantáció. Ezen okok miatt szükséges olyan biológiai markerek kutatása, amelyek később diagnosztikai és talán terápiás célpontként is hasznosíthatóak.

A syndecan-1 a máj egyik fontos proteoglikánja, amely fiziológias körülmények között a hepatocyták basolaterális felszínén mutatható ki. Az ép májban a syndecan-1 szerepe kevésbé ismert, azonban fontos szerepet játszik a VLDL („very low density lipoprotein”, nagyon alacsony sűrűségű lipoprotein) clearanceben (82, 83). Kutatócsoportunk korábbi vizsgálati eredményei alapján májbetegségekben, így többek között hepatocellularis carcinomában és máj cirrhosisban megnő a proteoglikánok mennyisége. Ezen vizsgálatok arra is fényt derítettek, hogy a cirrhotikus májban megnő a syndecan-1 mennyisége (54). Jelen kísérletünk során humán syndecan-1 termelést és így az össz syndecan-1 túltermelést egy albumin promoterral ellátott expressziós vektorral indukáltunk. Az albumin promoter teszi lehetővé, hogy a syndecan-1 a hepatocyták felszínén konstitutív módon termelődjön, mivel a májban a hepatocyták képesek egyedül az állandó albumin termelésre. A transzgén egerek létrehozása után több módszerrel is egyértelműen bizonyítottuk, hogy ezen egerek májában a hepatocyták felszínén kezelés nélkül a humán syndecan-1 folyamatosan jelen van. A humán syndecan-1 transzgén egerek fenotípusukban és fertilitásukban nem térnek el a vad típusú állatoktól, a máj szerkezetében és funkciójában toxikus károsítás nélkül eltérést nem tapasztaltunk. A kötőszövet felhalmozódását és a májfibrosist a vad és a transzgén egerekben thioacetamiddal indukáltunk, majd négy hónapon át vizsgáltuk a kialakult cirrhosis mértékét és a jelenség mögött álló jelátviteli utakat (84). Mivel eddig ilyen génkonstrukcióval rendelkező állatokban májfibrosist még nem vizsgáltak, így kutatásunk számos egyedi megállapítást eredményezett.

Általános érvényű megfigyelés, hogy minden szervben az ott aktuálisan jelenlévő kötőszövet mennyiségét annak termelődése és lebontásának aránya határozza meg. A felhalmozódott kötőszövet mennyiségét *in vivo* modell rendszerünkben picrosirius-vörössel festett metszeteken, morfometriai analízissel, kollagén-1 immunhisztokémiai reakcióval vizsgáltuk, míg *in vitro* kísérletek során dot-blottal néztük a sejtek médiumában lévő kollagén-1 akkumulációját. A kötőszövet termelésének ütemét a kollagén-1 mRNS szintjének változásával, valamint a kollagének termelő myofibroblastok mennyiségének nyomon követésével vizsgáltuk, utóbbit az SMA mennyiségének változásán keresztül elemeztük. Mind kvalitatív, mind kvantitatív vizsgálattal arra a következtetésre jutottunk, hogy a transzgen egerekben a fibrosis kialakulása lassabb, bár a kísérlet végére a két csoport között a felhalmozódott kötőszövet mértéke kiegyenlített. A kollagén-1 termelése és az aktivált myofibroblastok mennyisége követi a kötőszöveti felhalmozódás ütemét, mely bizonyítja, hogy a kiindulási állapotban jelenlévő nagy mennyiségű syndecan-1 gátolja a kötőszövet termelődését. Sejtes modell rendszerünkben az állatkísérleti rendszerhez hasonló eredményeket kaptunk, amellyel igazoltuk a hepatocyták felszínén lévő syndecan-1 gátló hatását a myofibroblast sejteken. A syndecan-1 szerepét fibrosissal járó betegségek közül eddig elsősorban a szívizom hegesedése kapcsán vizsgálták. Schellings és munkatársainak munkája bizonyította, hogy syndecan-1 null szívizom fibroblastok angiotenzin-II hatására csökkent mértékű kötőszövet termelést mutatnak, így ebben a rendszerben a syndecan-1 profibrotikus szerepét vetették fel (85). A syndecan-1-re ez az ellentétes megjelenés a különböző szervekben nemcsak a fibrosis esetén, hanem malignus daganatoknál is ismert. Míg hepatocellularis carcinomák esetében a normál májhoz képest a syndecan-1 mennyisége megnő, addig colon adenocarcinomák esetében a normál vastagbélhez képest expressziója csökkenő tendenciát mutathat (54, 86).

A syndecan-1 kötőszövet termelést gátló szerepe kapcsán felmerül, hogy miként változik a májfibrosis során a jelátviteli útvonalak aktivációja. A májfibrosis kapcsán az egyik legfontosabb szabályozó citokin a TGF $\beta$ 1, melynek hatására a myofibroblastok aktiválódnak, így kötőszöveti fehérjék termelődését segíti elő (87, 23, 88). A TGF $\beta$ 1 hatását a sejteken a TGF $\beta$ 1 korai válasz génjének a TIEG mRNS szintű változásával, valamint kanonikus jelátviteli útvonalának két tagjának, a pSmad2 és pSmad3 mennyiségi változásának vizsgálatával, továbbá a non-kanonikus jelátviteli útvonalának

tagjaként megnéztük a MAPK, Akt és Wnt jelátviteli útvonalak akitválódását (89-95). Minden TGF $\beta$ 1 választ tükröző fehérje és gén expressziós mintázata a kötőszövet felhalmozódásának ütemét követte, mellyel igazoltuk a TGF $\beta$ 1 útvonal gátlását syndecan-1 jelenlétében. A TGF $\beta$ 1 képes saját termelését autokrin úton fokozni, ezért megvizsgáltuk a TGF $\beta$ 1 mRNS szintű változását (87). A TGF $\beta$ 1 mRNS a kísérlet során mindkét csoportban megnőtt, a vad csoportban a kezelés harmadik hónapjában szignifikánsan nagyobb mértékben a transzgén egerekhez képest. A syndecan-1 transzgén egerekben a kisebb TGF $\beta$ 1 szint hozzájárul a csökkent TGF $\beta$ 1 hatáshoz, azonban a syndecan-1 overexpresszió is képes lecsökkenteni a TGF $\beta$ 1 és receptorának termelődését (96, 97). Ismert az is, hogy a heparán-szulfát (, amellyel a syndecan-1 is rendelkezik) csökkenti a TGF $\beta$ 1 hatásosságát az epithel sejteken, ami a mi modellünkben is hozzájárulhat a csökkent TGF $\beta$ 1 hatásához (98). A sejt kultúrákban-hasonlóan az *in vivo* modellhez megfigyeltük a syndecan-1 TGF $\beta$ 1-et gátló hatását. Az *in vitro* modell rendszerben igazoltuk továbbá, hogy a látens-TGF $\beta$ 1 egyik fontos aktivátor glikoproteinje, a thrombospondin-1, szintén kisebb mennyiségben van jelen syndecan-1 túltermelés esetén. A thrombospondin-1-et a májban a non-parenchymalis sejtek termelik. A fehérje a májfibrosist nem csak a látens-TGF $\beta$ 1 akitválásával segíti elő, hanem proangiogenikus hatása révén is. A syndecan-1 anti-fibrotikus hatása többek között a thrombospondin-1 heparán-szulfát kötő tulajdonságának köszönhető, mivel így a shedding során a proteoglikánnal együtt kikerül a májból (99-101).

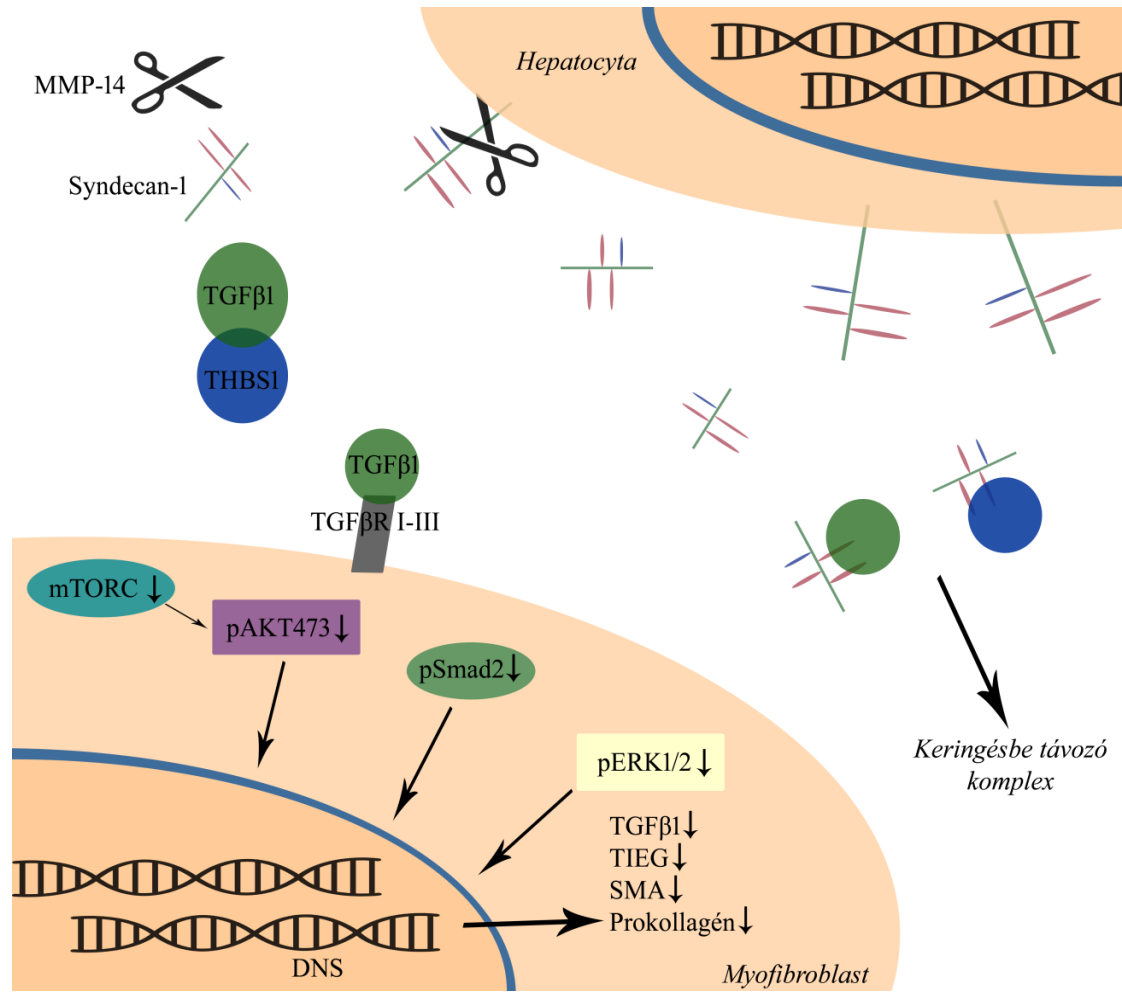
A kötőszövet lebontásában a mátrix metalloproteázok, valamint endogén inhibitoraik a TIMP-ek fontos szerepet játszanak (7, 46). Az aktivált HSC sejtek által termelt MMP-2 és MMP-9 mennyisége megnő a májcirrhosis során (102). Az MMP-2 és MMP-9 enzimek aktivitása zymogram vagy zselatináz tesztekkel vizsgálható. Legfontosabb szubsztrátai a IV-es típusú kollagén és a denaturált I-es típusú kollagén (zselatin) (78). Az MMP-k aktivitása fokozatosan nő a TA kezelés során, ugyanakkor aktív formában elsősorban az MMP-2 esetében figyelhető meg. Az aktiválódott enzimek mértékének növekedése nagyobb mértékű volt a vad csoportban a syndecan-1 transzgén csoportokhoz képest. A TIMP-1 expresszió növekedése az MMP-khez hasonlóan nagyobb mértékű a vad csoportban a transzgén egyedekhez képest. Az MMP-2 és MMP-9 enzimek változása alapján a felhalmozódott kötőszövetben tapasztalt eltérések nem a fokozott lebontással magyarázhatók, hanem a kötőszövet termelésének csökkenésével. A

TGF $\beta$ 1, hasonlóan a májfibrosisban szerepet játszó más fehérjékhez, indukálja az MMP-2 transzkripciós aktivitását, míg az MMP-9 mennyiségét poszttranszkripciós módon, az MMP-9 mRNS stabilitásának fokozásával éri el (103, 104).

Az MMP-14 mennyisége szignifikánsan nő a thioacetamid kezelés második hónapjában. Az *in vitro* kísérletünk alapján igazoltuk, hogy a syndecan-1 fokozza az MMP-14 mennyiségét a sejt kultúrák médiumában. Az irodalomból ismert, hogy az MMP-14 képes a "shedding" mechanizmusát elősegíteni, mely során a membránkötött fehérjék extracelluláris domainét lehasítja. Az MMP-14 nemcsak saját maga lehasítására képes autokatalitikus módon, hanem képes a syndecan-1 lehasítására is (49, 105). Az állatkísérletek során thioacetamid kezelés hatására a humán syndecan-1 szérumban koncentrációja szignifikáns növekedési tendenciát mutat. Ezzel párhuzamosan a syndecan-1 transzgen állatok szérumban az eger TGF $\beta$ 1 stabil koncentrációban jelenik meg, míg a vad példányokban a TGF $\beta$ 1 szint csökkenő tendenciát mutat. Habár a két csoport között a különbség nem bizonyult szignifikánsnak, mégis levonható az a következtetés, hogy a szérumban megjelenő syndecan-1 magával viheti a keringésbe a TGF $\beta$ 1-et, mellyel csökkenti a fibrogenesis kialakulását. Kísérleteink során is bizonyítottuk a syndecan-1 TGF $\beta$ 1 direkt kötőhatását, amely legnagyobb valószínűséggel a syndecan-1 heparán-szulfát láncon keresztül valósul meg (24).

A felhalmozódott kötőszövet mennyisége a kísérlet végén kiegyenlített a két csoport között, melynek hátterében feltehetőleg a felszíni syndecan-1 és heparán-szulfát csökkenésével magyarázható, amelynek következtében az endogén MMP-14 mennyisége is lecsökken.

A fent leírt mechanizmus sematikus ábrázolását lásd a **32. ábrán**.



**32. ábra.** Syndecan-1 okozta TGFβ1 hatásmechanizmusának gátlása, mely a fokozott MMP-14 aktivitáson keresztül valósul meg.

A syndecan-1 protektív szerepének bizonyítása és a molekuláris mechanizmusának feltárása után megvizsgáltuk a syndecan-1 mennyiségének változását klinikopatológiai szempontból.

A syndecan-1 mennyisége megnőtt a máj cirrhosisa során, és a hepatocyták felszínén körkörös festődést tapasztaltunk. Az etiológiai faktorok közül a három leggyakoribb kórokozót vizsgáltuk, amely az alkohol, a hepatitis C és hepatitis B vírusfertőzés volt. A hepatitis C vírusnak a syndecan-1 a receptora (106). Habár hepatocellularis carcinomák esetében szignifikánsan nagyobbak bizonyult a syndecan-1 mennyisége hepatitis C vírus fertőzés esetén a többi etiológiához képest, mégis a csak cirrhosis miatt transzplantáltak májában hasonló eltérést nem tudtunk igazolni (108).

A májfibrosisa kapcsán a kiterjedt parenchyma károsodás miatt az egyedüli terápiás lehetőség a májtranszplantáció. Tekintettel ez elérhető donor májak alacsony számára, a megfelelő recipiens kiválasztása a transzplantációs munka egyik legnehezebb feladata. A májcirrhosis súlyosságának és a megmaradt májfunkció megítélésére laborparataméterek által meghatározott MELD-score alkalmazható, mely jól korrelál a három hónapos mortalitással (72). A mi vizsgálatunk során magasabb MELD-score értékekhez szignifikánsan magasabb syndecan-1 expresszió társult. Irodalmi adatok alapján a syndecan-1 csökkentette az acetaminophen-indukálta máj elégtelenség kialakulását egerekben (107). A fentiek alapján habár sikerült igazolni a syndecan-1 májfibrosis kialakulásának védő mechanizmusát, azonban ez a defenzív hatás sajnos azonban egy idő után kimerül.

Kutatásaink további céljaként vizsgálni szeretnénk a syndecan-1 szerepét a hepatocellularis carcinomák kialakulásában, valamint a rendelkezésre álló klinikai adatok alapján tervezzük megvizsgálni a szérumban mérhető syndecan-1 mennyiségét a májbetegségek progressziójában és a májbetegségekhez kapcsolódó mortalitásban is.

## VII. KÖVETKEZTETÉSEK

- A humán syndecan-1 termelése véd a fibrogenesis korai fázisában a kötőszövet felhalmozódása ellen.
- A csökkent kötőszöveti felhalmozódás hátterében a csökkent myofibroblast aktivitása és az alacsonyabb kollagén-1 termelés áll.
- A syndecan-1 megköti a TGF $\beta$ 1-et.
- Mivel a syndecan-1 a TGF $\beta$ 1 koncentráció az egerek szérumában párhuzamosan nő, feltételezhető, hogy a szérumban részben egymáshoz kötött formában vannak jelen.
- A transzgén egerek májában a TGF $\beta$ 1 függő jelátviteli utak a vad csoporthoz képest csökkent aktivitást mutatnak, amit a kötőszövetben lévő relatív TGF $\beta$ 1 hiány magyarázhat.
- A syndecan-1 autokrin módon a saját „shedding”-jét fokozza az MMP-14 aktivációján keresztül.
- A vizsgált humán, cirrhotikus mintákban a syndecan-1 mennyisége nem mutatott összefüggést a cirrhosis etiológiájával.
- A humán cirrhotikus mintákban magasabb MELD-score érték esetén szignifikánsan magasabb syndecan-1 mennyiséget igazoltunk.



## VIII. ÖSSZEFOGLALÁS

A syndecan-1 fokozott expressziója a májcirrhosis esetén egy régóta ismert jelenség, azonban eddig a fokozott expresszió funkcióját megmagyarázó vizsgálat nem történt. A jelenség megmagyarázásához *in vivo* vizsgálatainkhoz albumin promoterral ellátott humán syndecan-1 transzgén egér törzset hoztunk létre, mely csak a májában termelte a proteoglikánt, majd a májfibrogenesist thioacetamiddal indukáltunk. *In vitro* vizsgálataink során normál és syndecan-1 overexpresszáló Hep3B hepatocellularis carcinoma és LX2 immortalizált myofibroblast sejtek direkt és indirekt ko-kultúrás modelljét hoztuk létre, melyekben a TGF $\beta$ 1 citokin hatását vizsgáltuk, mely a májfibrosis egyik fő mediátor citokinje.

Kezelés nélkül a vad és syndecan-1 transzgén egér törzsek között morfológiai eltérést nem tapasztaltunk, a máj szerkezete mindkét egértörzsben megtartott. A thioacetamid indukálta kötőszövet szaporulat a kezelés első két hónapjában a humán syndecan-1 transzgén egerek esetében szignifikánsan kevesebb volt a kontroll csoporthoz képest. A vizsgált jelátviteli útvonalak közül a csökkent Smad, MAPK, Akt és GSK3 jelátviteli útvonal csökkent aktivitása a TGF $\beta$ 1 csökkent hatására volt visszavezethető. Az egerek szérum koncentrációjának vizsgálata során növekvő tendenciájú syndecan-1 mellett tartósan magas TGF $\beta$ 1 szinteket mértünk, mely azzal magyarázható, hogy a májkárosítás során a syndecan-1 extracelluláris doménje fokozott mértékben hasad le a hepatocyták felszínéről és magával viszi a heparán-szulfát láncához kötött TGF $\beta$ 1-et. A fokozott lehasadás/shedding mechanizmusában, fontos szerepet játszik az MMP-14 aktivitása, melynek termelését a syndecan-1 autokrin módon fokozza.

A humán cirrhotikus mintákban a syndecan-1 mennyisége nem mutatott összefüggést a cirrhosis etiológiájával, azonban magasabb MELD-score érték esetén (, mely érték a májtranszplantáció szempontjából egy a klinikumban fontos prognosztikai marker) szignifikánsabb magasabb syndecan-1 mennyiség tapasztalható.

## IX. SUMMARY

The overexpression of syndecan-1 in liver cirrhosis is a well known phenomenon, however the underlying molecular mechanisms hasn't been examined so far. In order to investigate the role of syndecan-1 in liver cirrhosis we have established an animal model, containing albumin promoter driven human syndecan-1, thus human syndecan-1 expresses only in the hepatocytes. For induction of liver fibrosis animals were exposed to thioacetamide. For in vitro studies wild type and syndecan-1 overexpressing Hep3B hepatocellular carcinoma and LX2 immortalised myofibroblast cells were cultivated in direct and indirect co-culture systems. The cells were exposed to recombinant TGF $\beta$ 1, the main mediator of liver fibrosis.

Without challenge wild type and human syndecan-1 mice strains could not be distinguished, no morphological changes could be observed, the liver structure were preserved. In the first and second month of thioacetamid exposure liver fibrosis was attenuated, the amount of accumulated connective tissue and the production of collagen-1 was significantly lower in human syndecan-1 expressing animals. This went together with decreased activation of TGF $\beta$ 1 driven signaling pathways like Smad, MAPK, Akt and GSK3. In the animals sera the concentration of syndecan-1 increased during liver fibrosis accompanied by TGF $\beta$ 1 elevation. The mechanism behind this phenomenon is the direct TGF $\beta$ 1 binding capacity of syndecan-1. Thioacetamide exposure facilitated the shedding of syndecan-1 which has taken away the bound growth factor to the circulation. Shedding was fulfilled by MMP-14, a membrane bound protease upregulated by syndecan-1, creating a vicious circle this way.

In human liver cirrhotic samples the amount of syndecan-1 didn't show any correlation with the etiology. However, in case of higher MELD-score, indicating impaired liver function, the amount of syndecan-1 proved to be higher.

**X. IRODALOMJEGYZÉK**

1. Kuniholm MH, Lesi OA, Mendy M, Akano AO, Sam O, Hall AJ, Whittle H, Bah E, Goedert JJ, Hainaut P, Kirk GD. (2008) Aflatoxin exposure and viral hepatitis in the etiology of liver cirrhosis in the Gambia, West Africa. *Environ Health Perspect*, 116: 1553-1557.
2. Bataller R, Brenner DA. (2005) Liver fibrosis. *J Clin Invest*, 115: 209-218.
3. Popper H. (1977) Pathologic aspects of cirrhosis. A review. *Am J Pathol*, 87: 228-264.
4. Iredale JP. (2007) Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ. *J Clin Invest*, 117: 539-548.
5. Seki E, Schwabe RF. (2015) Hepatic inflammation and fibrosis: functional links and key pathways. *Hepatology*, 61: 1066-1079.
6. Kovalszky I, Nagy P, Szende B, Lapis K, Szalay F, Jeney A, Schaff Z. (1998) Experimental and human liver fibrogenesis. *Scand J Gastroenterol Suppl*, 228: 51-55.
7. Friedman SL. (2008) Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology*, 134: 1655-1669.
8. Schnaper HW. (1995) Balance between matrix synthesis and degradation: a determinant of glomerulosclerosis. *Pediatr Nephrol*, 9: 104-111.
9. Ramadori G, Saile B. (2004) Portal tract fibrogenesis in the liver. *Lab Invest*, 84: 153-159.
10. Liu T, Wang X, Karsdal MA, Leeming DJ, Genovese F. (2012) Molecular serum markers of liver fibrosis. *Biomark Insights*, 7: 105-117.
11. Elpek GO. (2014) Cellular and molecular mechanisms in the pathogenesis of liver fibrosis: An update. *World J Gastroenterol*, 20: 7260-7276.
12. Hellerbrand C. (2013) Hepatic stellate cells--the pericytes in the liver. *Pflugers Arch*, 465: 775-778.
13. Brenner DA, Kisseleva T, Scholten D, Paik YH, Iwaisako K, Inokuchi S, Schnabl B, Seki E, De Minicis S, Oesterreicher C, Taura K. (2012) Origin of myofibroblasts in liver fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair*, 5: S17.
14. Henderson NC, Forbes SJ. (2008) Hepatic fibrogenesis: from within and outwith. *Toxicology*, 254: 130-135.

15. Darby IA, Zakuan N, Billet F, Desmouliere A. (2016) The myofibroblast, a key cell in normal and pathological tissue repair. *Cell Mol Life Sci*, 73: 1145-1157.
16. Poniatowski LA, Wojdasiewicz P. (2015) Transforming growth factor Beta family: insight into the role of growth factors in regulation of fracture healing biology and potential clinical applications. 2015: 137823.
17. Jenkins G. (2008) The role of proteases in transforming growth factor-beta activation. *Int J Biochem Cell Biol*, 40: 1068-1078.
18. Pohlers D, Brenmoehl J, Loffler I, Muller CK, Leipner C, Schultze-Mosgau S, Stallmach A, Kinne RW, Wolf G. (2009) TGF-beta and fibrosis in different organs - molecular pathway imprints. *Biochim Biophys Acta*, 1792: 746-756.
19. Meindl-Beinker NM, Dooley S. (2008) Transforming growth factor-beta and hepatocyte transdifferentiation in liver fibrogenesis. *J Gastroenterol Hepatol*, 23 Suppl 1: S122-127.
20. Lan HY. (2011) Diverse roles of TGF-beta/Smads in renal fibrosis and inflammation. *Int J Biol Sci*, 7: 1056-1067.
21. Cook T, Urrutia R. (2000) TIEG proteins join the Smads as TGF-beta-regulated transcription factors that control pancreatic cell growth. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 278: G513-521.
22. Johnsen SA, Subramaniam M, Janknecht R, Spelsberg TC. (2002) TGFbeta inducible early gene enhances TGFbeta/Smad-dependent transcriptional responses. *Oncogene*, 21: 5783-5790.
23. Caja L, Dituri F, Mancarella S, Caballero-Diaz D. (2018) TGF-beta and the Tissue Microenvironment: Relevance in Fibrosis and Cancer. 19.
24. Rider CC. (2006) Heparin/heparan sulphate binding in the TGF-beta cytokine superfamily. *Biochem Soc Trans*, 34: 458-460.
25. Aggarwal BB, Shishodia S, Ashikawa K, Bharti AC. (2002) The role of TNF and its family members in inflammation and cancer: lessons from gene deletion. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, 1: 327-341.
26. Luedde T, Schwabe RF. (2011) NF-kappaB in the liver--linking injury, fibrosis and hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 8: 108-118.
27. Siebenlist U, Franzoso G, Brown K. (1994) Structure, regulation and function of NF-kappa B. *Annu Rev Cell Biol*, 10: 405-455.

28. Saile B, Matthes N, El Armouche H, Neubauer K, Ramadori G. (2001) The bcl, NFkappaB and p53/p21/WAF1 systems are involved in spontaneous apoptosis and in the anti-apoptotic effect of TGF-beta or TNF-alpha on activated hepatic stellate cells. *Eur J Cell Biol*, 80: 554-561.
29. Lu HS, Chai JJ, Li M, Huang BR, He CH, Bi RC. (2001) Crystal structure of human epidermal growth factor and its dimerization. *J Biol Chem*, 276: 34913-34917.
30. Yarden Y. (2001) The EGFR family and its ligands in human cancer. signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *Eur J Cancer*, 37 Suppl 4: S3-8.
31. Katz M, Amit I, Yarden Y. (2007) Regulation of MAPKs by growth factors and receptor tyrosine kinases. *Biochim Biophys Acta*, 1773: 1161-1176.
32. Baghy K, Iozzo RV, Kovalszky I. (2012) Decorin-TGFbeta axis in hepatic fibrosis and cirrhosis. *J Histochem Cytochem*, 60: 262-268.
33. Kikuchi A, Monga SP. (2015) PDGFRalpha in liver pathophysiology: emerging roles in development, regeneration, fibrosis, and cancer. *Gene Expr*, 16: 109-127.
34. Svegliati-Baroni G, Ridolfi F, Caradonna Z, Alvaro D, Marzioni M, Saccomanno S, Candelaresi C, Trozzi L, Macarri G, Benedetti A, Folli F. (2003) Regulation of ERK/JNK/p70S6K in two rat models of liver injury and fibrosis. *J Hepatol*, 39: 528-537.
35. Beurel E, Grieco SF, Jope RS. (2015) Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): regulation, actions, and diseases. *Pharmacol Ther*, 148: 114-131.
36. Vilchez V, Turcios L, Marti F, Gedaly R. (2016) Targeting Wnt/beta-catenin pathway in hepatocellular carcinoma treatment. *World J Gastroenterol*, 22: 823-832.
37. Igota S, Tosa M, Murakami M, Egawa S, Shimizu H, Hyakusoku H, Ghazizadeh M. (2013) Identification and characterization of Wnt signaling pathway in keloid pathogenesis. *Int J Med Sci*, 10: 344-354.
38. MadanKumar P, NaveenKumar P, Manikandan S, Devaraj H, NiranjaliDevaraj S. (2014) Morin ameliorates chemically induced liver fibrosis in vivo and inhibits stellate cell proliferation in vitro by suppressing Wnt/beta-catenin signaling. *Toxicol Appl Pharmacol*, 277: 210-220.

39. Myung SJ, Yoon JH, Gwak GY, Kim W, Lee JH, Kim KM, Shin CS, Jang JJ, Lee SH, Lee SM, Lee HS. (2007) Wnt signaling enhances the activation and survival of human hepatic stellate cells. *FEBS Lett*, 581: 2954-2958.
40. Reif S, Lang A, Lindquist JN, Yata Y, Gabele E, Scanga A, Brenner DA, Rippe RA. (2003) The role of focal adhesion kinase-phosphatidylinositol 3-kinase-akt signaling in hepatic stellate cell proliferation and type I collagen expression. *J Biol Chem*, 278: 8083-8090.
41. Okuyama H, Shimahara Y, Kawada N. (2002) The hepatic stellate cell in the post-genomic era. *Histol Histopathol*, 17: 487-495.
42. Parsons CJ, Takashima M, Rippe RA. (2007) Molecular mechanisms of hepatic fibrogenesis. *J Gastroenterol Hepatol*, 22 Suppl 1: S79-84.
43. Asati V, Mahapatra DK, Bharti SK. (2016) PI3K/Akt/mTOR and Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathways inhibitors as anticancer agents: Structural and pharmacological perspectives. *Eur J Med Chem*, 109: 314-341.
44. Zhong W, Qian K, Xiong J, Ma K, Wang A, Zou Y. (2016) Curcumin alleviates lipopolysaccharide induced sepsis and liver failure by suppression of oxidative stress-related inflammation via PI3K/AKT and NF-kappaB related signaling. *Biomed Pharmacother*, 83: 302-313.
45. Iwamoto H, Sakai H, Nawata H. (1998) Inhibition of integrin signaling with Arg-Gly-Asp motifs in rat hepatic stellate cells. *J Hepatol*, 29: 752-759.
46. Visse R, Nagase H. (2003) Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res*, 92: 827-839.
47. Aimes RT, Quigley JP. (1995) Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. Inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific 3/4- and 1/4-length fragments. *J Biol Chem*, 270: 5872-5876.
48. Manon-Jensen T, Itoh Y, Couchman JR. (2010) Proteoglycans in health and disease: the multiple roles of syndecan shedding. *Febs j*, 277: 3876-3889.
49. Manon-Jensen T, Multhaupt HA, Couchman JR. (2013) Mapping of matrix metalloproteinase cleavage sites on syndecan-1 and syndecan-4 ectodomains. *Febs j*, 280: 2320-2331.

50. Humphries JD, Byron A, Humphries MJ. (2006) Integrin ligands at a glance. *J Cell Sci*, 119: 3901-3903.
51. Kovalszky I, Jeney A, Lapis K. (1993) [Proteoglycans (their structure, function and role in liver diseases)]. *Orv Hetil*, 134: 2019-2026.
52. Baghy K, Dezso K, Laszlo V, Fullar A, Peterfia B, Paku S, Nagy P, Schaff Z, Iozzo RV, Kovalszky I. (2011) Ablation of the decorin gene enhances experimental hepatic fibrosis and impairs hepatic healing in mice. *Lab Invest*, 91: 439-451.
53. Baghy K, Horvath Z, Regos E, Kiss K, Schaff Z, Iozzo RV, Kovalszky I. (2013) Decorin interferes with platelet-derived growth factor receptor signaling in experimental hepatocarcinogenesis. *Febs j*, 280: 2150-2164.
54. Kovalszky I, Dudás J, Gallai M, Hollósi P, Tátrai P, Tátrai E, Schaff Z. (2004) Proteoglikánok a májban. *Magyar Onkológia*, 1: 207-213.
55. Regos E, Abdelfattah HH, Reszegi A, Szilak L, Werling K, Szabo G, Kiss A, Schaff Z, Kovalszky I, Baghy K. (2018) Syndecan-1 inhibits early stages of liver fibrogenesis by interfering with TGFbeta1 action and upregulating MMP14. *Matrix Biol*.
56. Bernfield M, Sanderson RD. (1990) Syndecan, a developmentally regulated cell surface proteoglycan that binds extracellular matrix and growth factors. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 327: 171-186.
57. Stepp MA, Pal-Ghosh S, Tadvalkar G, Pajoohesh-Ganji A. (2015) Syndecan-1 and Its Expanding List of Contacts. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 4: 235-249.
58. Choi S, Lee H, Choi JR, Oh ES. (2010) Shedding; towards a new paradigm of syndecan function in cancer. *BMB Rep*, 43: 305-310.
59. Sanderson RD, Børset M. (2002) Syndecan-1 in B lymphoid malignancies. *Annals of Hematology*, 81: 125-135.
60. Mitsou I, Multhaupt HAB, Couchman JR. (2017) Proteoglycans, ion channels and cell-matrix adhesion. *Biochem J*, 474: 1965-1979.
61. Elenius V, Gotte M, Reizes O, Elenius K, Bernfield M. (2004) Inhibition by the soluble syndecan-1 ectodomains delays wound repair in mice overexpressing syndecan-1. *J Biol Chem*, 279: 41928-41935.

62. Vanhoutte D, Schellings MW, Gotte M, Swinnen M, Herias V, Wild MK, Vestweber D, Chorianopoulos E, Cortes V, Rigotti A, Stepp MA, Van de Werf F, Carmeliet P, Pinto YM, Heymans S. (2007) Increased expression of syndecan-1 protects against cardiac dilatation and dysfunction after myocardial infarction. *Circulation*, 115: 475-482.
63. Lunde IG, Herum KM, Carlson CC, Christensen G. (2016) Syndecans in heart fibrosis. *Cell Tissue Res*.
64. Kovalszky H, Gallai M, Armbrust T, Ramadori G. (1994) Syndecan-1 gene expression in isolated rat liver cells (hepatocytes, Kupffer cells, endothelial and Ito cells). *Biochem Biophys Res Commun*, 204: 944-949.
65. Baghy K, Tatrai P, Regos E, Kovalszky I. (2016) Proteoglycans in liver cancer. *World J Gastroenterol*, 22: 379-393.
66. Zvibel I, Halfon P, Fishman S, Penaranda G, Leshno M, Or AB, Halpern Z, Oren R. (2009) Syndecan 1 (CD138) serum levels: a novel biomarker in predicting liver fibrosis stage in patients with hepatitis C. *Liver Int*, 29: 208-212.
67. Metwaly HA, Al-Gayyar MM, Eletreby S, Ebrahim MA, El-Shishtawy MM. (2012) Relevance of serum levels of interleukin-6 and syndecan-1 in patients with hepatocellular carcinoma. *Sci Pharm*, 80: 179-188.
68. Grattagliano I, Ubaldi E, Bonfrate L, Portincasa P. (2011) Management of liver cirrhosis between primary care and specialists. *World journal of gastroenterology*, 17: 2273-2282.
69. Bedreli S, Sowa J-P, Gerken G, Saner FH, Canbay A. (2016) Management of acute-on-chronic liver failure: rotational thromboelastometry may reduce substitution of coagulation factors in liver cirrhosis. *Gut*, 65: 357.
70. Peng Y, Qi X, Guo X. (2016) Child-Pugh Versus MELD Score for the Assessment of Prognosis in Liver Cirrhosis: A Systematic Review and Meta-Analysis of Observational Studies. *Medicine*, 95: e2877-e2877.
71. Durand F, Valla D. (2008) Assessment of prognosis of cirrhosis. *Semin Liver Dis*, 28: 110-122.
72. Reddy SS, Civan JM. (2016) From Child-Pugh to Model for End-Stage Liver Disease: Deciding Who Needs a Liver Transplant. *Med Clin North Am*, 100: 449-464.



73. Zakareya T, Abbasy M, Abdel-Razek W, Elsiesy H, Abal Khail F, Al Sebayel M, Waked I. (2017) Utility of post-liver transplantation MELD and delta MELD in predicting early and late mortality. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 29: 1424-1427.
74. Arni P. (1989) Review on the genotoxic activity of thioacetamide. *Mutat Res*, 221: 153-162.
75. Liedtke C, Luedde T, Sauerbruch T, Scholten D, Streetz K, Tacke F, Tolba R, Trautwein C, Trebicka J, Weiskirchen R. (2013) Experimental liver fibrosis research: update on animal models, legal issues and translational aspects. *Fibrogenesis Tissue Repair*, 6: 19.
76. Peterfia B, Fule T, Baghy K, Szabadkai K, Fullar A, Dobos K, Zong F, Dobra K, Hollosi P, Jeney A, Paku S, Kovalszky I. (2012) Syndecan-1 enhances proliferation, migration and metastasis of HT-1080 cells in cooperation with syndecan-2. *PLoS One*, 7: e39474.
77. 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.
78. Toth M, Sohail A, Fridman R. (2012) Assessment of gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by gelatin zymography. *Methods Mol Biol*, 878: 121-135.
79. Coulson-Thomas VJ, ferreira t. (2014) Dimethylmethylene Blue Assay (DMMB). *Bio-protocol*, 4: e1236.
80. Jung YK, Yim HJ. (2017) Reversal of liver cirrhosis: current evidence and expectations. *Korean J Intern Med*, 32: 213-228.
81. Kohli A, Shaffer A, Sherman A, Kottlilil S. (2014) Treatment of hepatitis C: a systematic review. *Jama*, 312: 631-640.
82. Deng Y, Foley EM, Gonzales JC, Gordts PL, Li Y, Esko JD. (2012) Shedding of syndecan-1 from human hepatocytes alters very low density lipoprotein clearance. *Hepatology*, 55: 277-286.
83. Stanford KI, Bishop JR, Foley EM, Gonzales JC, Niesman IR, Witztum JL, Esko JD. (2009) Syndecan-1 is the primary heparan sulfate proteoglycan mediating hepatic clearance of triglyceride-rich lipoproteins in mice. *J Clin Invest*, 119: 3236-3245.

84. Hayashi H, Sakai T. (2011) Animal models for the study of liver fibrosis: new insights from knockout mouse models. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 300: G729-738.
85. Schellings MW, Vanhoutte D, van Almen GC, Swinnen M, Leenders JJ, Kubben N, van Leeuwen RE, Hofstra L, Heymans S, Pinto YM. (2010) Syndecan-1 amplifies angiotensin II-induced cardiac fibrosis. *Hypertension*, 55: 249-256.
86. 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.
87. Brenner DA. (2009) Molecular pathogenesis of liver fibrosis. *Trans Am Clin Climatol Assoc*, 120: 361-368.
88. Dudas J, Kovalszky I, Gallai M, Nagy JO, Schaff Z, Knittel T, Mehde M, Neubauer K, Szalay F, Ramadori G. (2001) Expression of decorin, transforming growth factor-beta 1, tissue inhibitor metalloproteinase 1 and 2, and type IV collagenases in chronic hepatitis. *Am J Clin Pathol*, 115: 725-735.
89. Carthy JM, Sundqvist A, Heldin A, van Dam H, Kletsas D, Heldin CH, Moustakas A. (2015) Tamoxifen Inhibits TGF-beta-Mediated Activation of Myofibroblasts by Blocking Non-Smad Signaling Through ERK1/2. *J Cell Physiol*, 230: 3084-3092.
90. Li J, Ren J, Liu X, Jiang L, He W, Yuan W, Yang J, Dai C. (2015) Rictor/mTORC2 signaling mediates TGFbeta1-induced fibroblast activation and kidney fibrosis. *Kidney Int*, 88: 515-527.
91. Qiang H, Lin Y, Zhang X, Zeng X, Shi J, Chen YX, Yang MF, Han ZG, Xie WF. (2006) Differential expression genes analyzed by cDNA array in the regulation of rat hepatic fibrogenesis. *Liver Int*, 26: 1126-1137.
92. Sysa P, Potter JJ, Liu X, Mezey E. (2009) Transforming growth factor-beta1 up-regulation of human alpha(1)(I) collagen is mediated by Sp1 and Smad2 transacting factors. *DNA Cell Biol*, 28: 425-434.
93. Voelkl J, Mia S, Meissner A, Ahmed MS, Feger M, Elvira B, Walker B, Alessi DR, Alesutan I, Lang F. (2013) PKB/SGK-resistant GSK-3 signaling following unilateral ureteral obstruction. *Kidney Blood Press Res*, 38: 156-164.

94. Xu F, Liu C, Zhou D, Zhang L. (2016) TGF-beta/SMAD Pathway and Its Regulation in Hepatic Fibrosis. *J Histochem Cytochem*, 64: 157-167.
95. Xu P, Zhang Y, Liu Y, Yuan Q, Song L, Liu M, Liu Z, Yang Y, Li J, Li D, Ren G. (2016) Fibroblast growth factor 21 attenuates hepatic fibrogenesis through TGF-beta/smad2/3 and NF-kappaB signaling pathways. *Toxicol Appl Pharmacol*, 290: 43-53.
96. Bascom CC, Wolfshohl JR, Coffey RJ, Jr., Madisen L, Webb NR, Purchio AR, Derynck R, Moses HL. (1989) Complex regulation of transforming growth factor beta 1, beta 2, and beta 3 mRNA expression in mouse fibroblasts and keratinocytes by transforming growth factors beta 1 and beta 2. *Mol Cell Biol*, 9: 5508-5515.
97. Szatmari T, Mundt F, Heidari-Hamedani G, Zong F, Ferolla E, Alexeyenko A, Hjerpe A, Dobra K. (2012) Novel genes and pathways modulated by syndecan-1: implications for the proliferation and cell-cycle regulation of malignant mesothelioma cells. *PLoS One*, 7: e48091.
98. Chen CL, Huang SS, Huang JS. (2006) Cellular heparan sulfate negatively modulates transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) responsiveness in epithelial cells. *J Biol Chem*, 281: 11506-11514.
99. Li Y, Turpin CP, Wang S. (2017) Role of thrombospondin 1 in liver diseases. *Hepatol Res*, 47: 186-193.
100. Murphy-Ullrich JE, Poczatek M. (2000) Activation of latent TGF-beta by thrombospondin-1: mechanisms and physiology. *Cytokine Growth Factor Rev*, 11: 59-69.
101. Sasaki A, Naganuma H, Satoh E, Kawataki T, Amagasaki K, Nukui H. (2001) Participation of thrombospondin-1 in the activation of latent transforming growth factor-beta in malignant glioma cells. *Neurol Med Chir (Tokyo)*, 41: 253-258; discussion 258-259.
102. Han YP. (2006) Matrix metalloproteinases, the pros and cons, in liver fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol*, 21 Suppl 3: S88-91.
103. Kim ES, Sohn YW, Moon A. (2007) TGF-beta-induced transcriptional activation of MMP-2 is mediated by activating transcription factor (ATF)2 in human breast epithelial cells. *Cancer Lett*, 252: 147-156.

104. Sehgal I, Thompson TC. (1999) Novel regulation of type IV collagenase (matrix metalloproteinase-9 and -2) activities by transforming growth factor-beta1 in human prostate cancer cell lines. *Mol Biol Cell*, 10: 407-416.
105. Osenkowski P, Toth M, Fridman R. (2004) Processing, shedding, and endocytosis of membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP). *J Cell Physiol*, 200: 2-10.
106. Shi Q, Jiang J, Luo G. (2013) Syndecan-1 serves as the major receptor for attachment of hepatitis C virus to the surfaces of hepatocytes. *Journal of virology*, 87: 6866-6875.
107. Nam EJ, Hayashida K, Aquino RS, Couchman JR, Kozar RA, Liu J, Park PW. (2017) Syndecan-1 limits the progression of liver injury and promotes liver repair in acetaminophen-induced liver injury in mice. *Hepatology*, 66: 1601-1615.
108. Regős E, Karászi K, Reszegi A, Kiss A, Schaff Z, Baghy K, Kovalszky I. (2019) Syndecan-1 in Liver Diseases. *Pathol Oncol Res*. DOI 10.1007/s12253-019-00617-0

## XI. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

### XI.1. Értekezés témájában megjelent közlemények

1. Regos E, Abdelfattah HH , Reszegi A , Szilak L , Werling K , Szabo G , Kiss A , Schaff Z , Kovalszky I , Baghy K  
Syndecan-1 inhibits early stages of liver fibrogenesis by interfering with TGFbeta1 action and upregulating MMP14.  
*MATRIX BIOLOGY* 68-69: pp. 474-489. (2018) IF: 6,986

2. Kiss K , Regos E, Rada K , Firneisz G , Baghy K , Kovalszky I  
Chronic Hyperglycaemia Induced Alterations of Hepatic Stellate Cells Differ from the Effect of TGFB1, and Point toward Metabolic Stress.  
*PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH* DOI 10.1007/s12253-018-0458-9  
(2018) IF: 2,433

3. Regos E, Karaszi K, Kiss A, Schaff Zs, Baghy K, Kovalszky I: Syndecan-1 in liver disease  
*PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH* DOI 10.1007/s12253-019-00617-0 (2019) IF (2018): 2,433

### XI.2. Egyéb témában megjelent közlemények

1. Fullar A , Firneisz G , Regos E, Dudas J , Szarvas T , Baghy K , Ramadori G , Kovalszky I  
Response of Hepatic Stellate Cells to TGFB1 Differs from the Response of Myofibroblasts. Decorin Protects against the Action of Growth Factor  
*PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH* 23:(2) pp. 287-294. (2017) IF: 2,068

2. Baghy K , Tátrai P , Regos E, Kovalszky I  
Proteoglycans in liver cancer  
*WORLD JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY* 22:(1) pp. 379-393. (2016) IF: 3,365

3. Baghy K , Horvath Z , Regos E, Kiss K , Schaff Z , Iozzo RV , Kovalszky I  
Decorin interferes with platelet-derived growth factor receptor signaling in experimental hepatocarcinogenesis.  
*FEBS JOURNAL* 280:(10) pp. 2150-2164. (2013) IF: 3,986

## **XII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS**

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

Első helyen szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, **Prof. Dr. Kovalszky Ilonának** és **Dr. Baghy Kornéliának**, a TDK és PhD munkám éve alatt nyújtott felbecsülhetetlen értékű szakmai és emberi segítségért, a soha nem fogyó türelemért és bizalomért.

Köszönöm **Dr. Matolcsy András** egyetemi tanárnak az I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet jelenlegi igazgatójának, amiért munkámat lehetővé tette, és támogató figyelemmel kísérte.

Külön köszönet illeti **Reszegi Andreát, Karászi Katalint, Dr. Kiss Katalint, Dr. Péterfia Bálintot, Egedi Krisztinát, Császár Krisztinát** és **Oláhné Nagy Júliát** a módszerek elsajátításában, kivitelezésében és az eredmények értékelésében nyújtott felbecsülhetetlen segítségükért.

Köszönöm a jelenleg hivatalos nevén **Molekuláris Patológiának** nevezett ám tradicionálisan csak mindenki által **Biokémia** laborként ismert laboratórium minden volt és jelenlegi munkatársának, közvetlen munkatársaimnak, név szerint: **Fullár Alexandrának, Dr. Hollósi Péternek, Horváth Zsoltnak** és **Mervai Zsoltnak**, akik munkám elvégzéséhez segítő baráti légkört teremtettek. Az említetteken kívül köszönet illeti az I.sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet minden tagját, hogy munkámat maximális segítőkészségüket élvezve végezhettem. Hálával tartozom az Állatház dolgozóinak, név szerint **Sztodola Andrásnak** az állatkísérletek kivitelezésében nyújtott nélkülözhetetlen segítségükért és odaadó munkájukért.

Végezetül őszinte hálámat és szeretetemet fejezem ki családomnak név szerint: édesanyámnak, **Regősné Knoska Juditnak**, édesapámnak, **Regős Lászlónak**, bátyámnak, **Dr. Regős Gábornak** és férjemnek, **Timkó Attila Baláznak** szeretetükért, az odaadásukért, a soha nem apadó támogatásukért, a belém vetett hitükért és bizalmukért.