

Az aktinok szerepe a szöveti átrendeződés patomechanizmusának kutatásában

Doktori értekezés

Veres-Székely Apor

Semmelweis Egyetem

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Vannay Ádám, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Hivatalos bírálók: Dr. Szarka András, D.Sc., egyetemi tanár

Dr. Lotz Gábor, Ph.D., egyetemi tanár

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Rosivall László, D.Sc., MTA doktora, egyetemi tanár

Tagok: Dr. Vásárhelyi Barna, D.Sc., egyetemi tanár

Dr. Szabó László, Ph.D., főiskolai tanár

Dr. Fogarasi András, D.Sc., egyetemi tanár

Budapest

2020

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	5
1. Bevezetés	7
1.1. Szöveti átrendeződés	7
1.1.1. Szöveti átrendeződés patomechanizmusa	7
1.1.2. Kóros szöveti átrendeződés a vesében	9
1.1.3. Kóros szöveti átrendeződés a bélben	10
1.2. Aktinok	12
1.2.1. Izom aktinok	13
1.2.2. Citoplazmatikus aktinok	13
1.3. IL-24	13
1.4. PARK7	14
2. Célkitűzések	15
3. Módszerek	16
3.1. <i>In vivo, ex vivo</i> kísérletek	16
3.1.1. Unilaterális uréter obstrukció (UUO)	16
3.1.2. Dextrán szódium szulfát (DSS)-indukálta bélgyulladás	16
3.1.3. Bélhám lokális kezelése	17
3.1.4. Vékonybél preparátum	17
3.2. Duodenum biopsziák	18
3.3. <i>In vitro</i> kísérletek	19
3.3.1. Primer duodenális miofibroblaszt (pdMF) sejt kultúra	19
3.3.2. FHs74Int vékonybél epitél sejt vonal	19
3.4. MTT sejtviabilitás teszt	20
3.5. LDH citotoxicitás teszt	20

3.6. Annexin V apoptózis teszt	21
3.7. ROS teszt	21
3.8. Immunfluoreszcens festés.....	21
3.9. Sejtvázkárosodás mértékének meghatározása	22
3.10. Stresszrost orientáció meghatározása	23
3.11. mRNS expresszió meghatározása.....	23
3.11.1. RNS izolálás és DNS szintézis.....	23
3.11.2. Primerek tervezése, gyűjtése.....	23
3.11.3. Mesterséges DNS templátok.....	29
3.11.4. Valós idejű PCR.....	29
3.11.5. Szekvenálás.....	29
3.12. Fehérje mennyiségének meghatározása.....	31
3.12.1. Fehérjeizolálás	31
3.12.2. Western blot.....	31
3.13. Szövettani festések vesefibrózis mértékének meghatározásához	32
3.14. Statisztika.....	32
4. Eredmények	34
4.1. α -SMA és β -aktin specifikus PCR primerek	34
4.1.1. Saját tervezésű egér α -SMA és β -aktin primerek templát-specifitása	34
4.1.1. Saját tervezésű egér α -SMA és β -aktin primerek PCR hatásfoka.....	36
4.1.2. Saját tervezésű egér α -SMA és β -aktin primerek specifitásának ellenőrzése	37
4.1.3. Irodalmi forrásból származó egér α -SMA és β -aktin primerek templát- specifitása.....	38
4.1.4. α -SMA és β -aktin expresszió mértéke UUO-n átesett egerek veseszövetében	40

4.1.5. Saját tervezésű human és patkány α -SMA és β -aktin primerek templát-specifitása.....	43
4.2. IL-24 szerepe a szöveti átépülésben	45
4.2.1. IL-24 kezelés hatása pdMF sejtek stresszrostorientációjára	45
4.2.2. α -SMA akkumuláció WT és Il20rb -/- állatok veséjében UUO-t követően ..	46
4.2.3. α -SMA akkumuláció WT és Il20rb -/- állatok vastagbelében DSS kezelést követően, illetve WT állatokban lokális IL-24 kezelést követően.....	48
4.3. PARK7 szerepe a bélmukóza oxidatív károsodásában cöliákia során	51
4.3.1. PARK7 jelenléte duodenális epitel sejtekben	51
4.3.2. A Comp23 kezelés hatása az intracelluláris ROS akkumulációra	51
4.3.3. A Comp23 kezelés hatása az oxidatív stressz indukálta sejthalálra.....	53
4.3.4. A Comp23 kezelés hatása az oxidatív stressz indukálta sejtvez károsodásra	54
4.3.5. A Comp23 kezelés hatása az oxidatív stressz indukálta sejtadhéziós károsodásra	56
4.3.6. A Comp23 kezelés hatása a bél permeabilitására	58
5. Megbeszélés.....	60
5.1. α -SMA és β -aktin specifikus PCR primerek	60
5.2. IL-24 szerepe a szöveti átépülésben	64
5.3. PARK7 szerepe a bélmukóza oxidatív károsodásában cöliákia során	68
6. Következtetések.....	72
7. Összefoglalás	73
8. Summary.....	74
9. Irodalomjegyzék	75
10. Saját publikációk jegyzéke	86
11. Köszönetnyilvánítás.....	89

Rövidítések jegyzéke

BAX	BCL2-asszociált X protein
BCL2	B-sejt limfóma protein 2
bp	bázispár
CDKN1A	p21 ciklin dependens kináz
CDS	kódoló szakasz
Comp23	N-[4-(8-metil(4-hidroimidazo[1,2-a]piridin-2-il))fenil](3,4,5-73 trimetoxifenil) karboxamid
DCFDA	2',7'-diklorofluoreszcein diacetát
DMEM	Dulbecco által módosított Eagle-médium
DMSO	dimetil-szulfoxid
DSS	dextrán szódium szulfát
ECM	extracelluláris mátrix
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
EGF	epidermális növekedési faktor
FI	fluoreszcencia intenzitás
FBS	magzati borjú szérum
GCLC	gamma-glutamil cisztein szintetáz
HMOX1	hem-oxigenáz
IBD	gyulladásos bélbetegség
IL-	interleukin-
KO	génkiütött („knock out”)
LDH	laktát dehidrogenáz
NRF2	eritroid eredetű 2-es típusú nukleáris faktor 2
NQO1	NAD(P)H:kinon oxidoreduktáz 1
PARK7	Parkinson's disease 7
PBS	foszfát-pufferes sóoldat
PCNA	proliferáló sejt nukleáris antigén
PCR	polimeráz láncreakció
PDGF-B	vérlemezke eredetű növekedési faktor B
pdMF	primer duodenális miofibroblaszt

PI	propídium-jodid
ROS	reaktív oxigén gyökök
TGF- β	transzformáló növekedési faktor béta
TP53	tumor antigén p53
TRX1	tioredoxin
UUO	unilaterális uréter obstrukció
WT	vad típusú
α -SMA	alfa simaizom aktin

1. Bevezetés

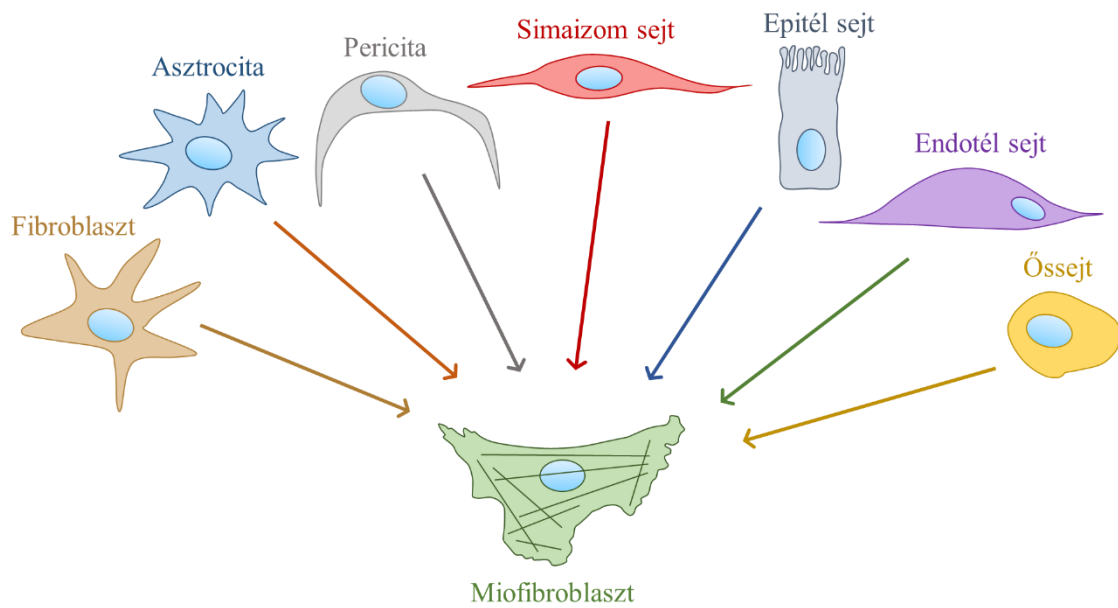
1.1. Szöveti átrendeződés

1.1.1. Szöveti átrendeződés patomechanizmusa

A szöveti átrendeződés alatt egy jól differenciált, meghatározott funkcióval bíró szövet strukturális megváltozását értjük. A szöveti átrendeződés két csoportba osztható. A fiziológias átrendeződés, mely elsősorban az embriogenezis során figyelhető meg, egy normális, endogén mechanizmus, mely többnyire az érintett szövet funkciójának megváltozásával jár [1]. Ezzel szemben a patológiás átrendeződést külső inger váltja ki, jellemzően egy sérülés vagy betegség szövődeményeként [2]. Jelen tanulmány középpontjában ez utóbbi típusú szöveti átrendeződés áll.

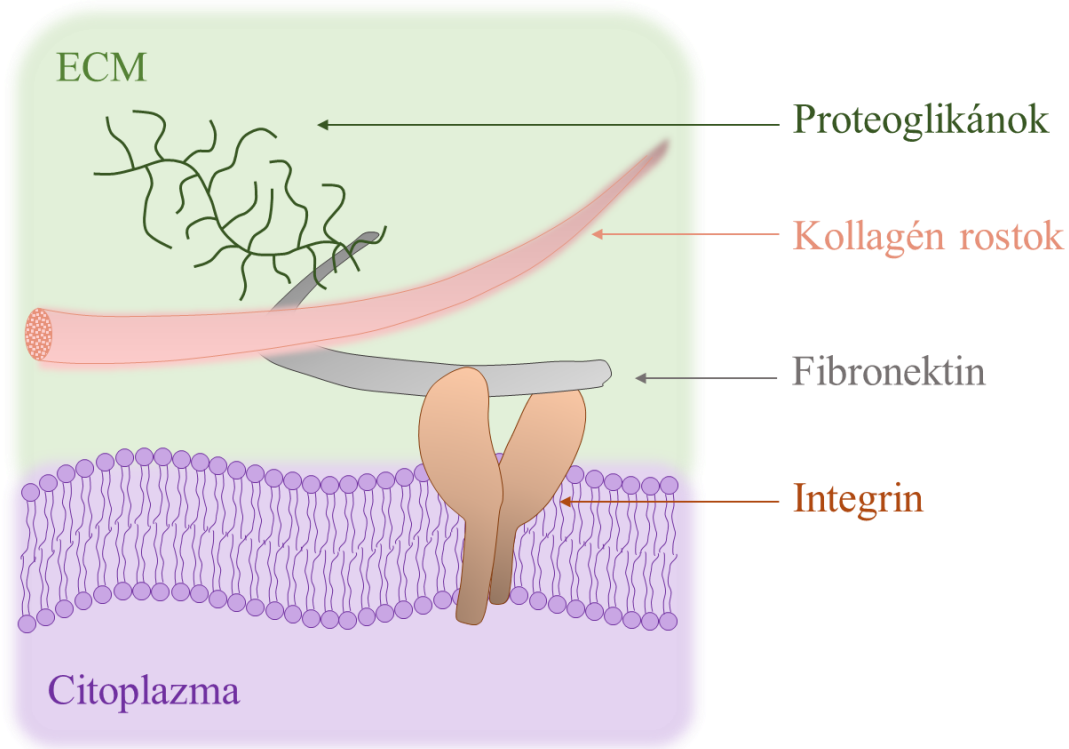
A kiváltó októl, az érintett szervtől függetlenül a folyamat patomechanizmusa szervezet szerzte egységes képet mutat [3]. A kóros szöveti átrendeződés folyamatát számos tényező aktiválhatja, ilyen a gyulladás, fertőzés, autoimmun reakció, toxin, sugárzás vagy mechanikai sérülés következtében kialakuló szövetkárosodás. A károsodó sejtekből gyulladásos mediátorok szabadulnak fel, melynek hatására a sérülés környékén vazodilatáció, fokozott érpermeabilitás, és a miofibroblasztok aktivációja figyelhető meg [1, 2].

A miofibroblasztok a szöveti átrendeződés kulcsfontosságú szereplői. A sejttípus eredetéről számos kísérletes bizonyíték, teória és ezzel együtt ellentmondás található az irodalomban [4, 5] (1. ábra). Legvalószínűbb elmélet szerint nyugvó állapotú fibroblasztok profibrotikus citokinek, például transzformáló növekedési faktor béta (TGF- β), illetve vérlemezke eredetű növekedési faktor (PDGF) hatására differenciálódnak miofibroblasztokká [6-9]. A miofibroblasztok, ahogy arra nevük is arra utal, két sejttípus jellegzetes tulajdonságait hordozzák. Izomsejtekhez hasonlóan (mio-) erőteljes kontrakcióra képesek az α_{simazom} -aktin (α -SMA) sejtvázkötő komponensüknek köszönhetően, melyet a sejttípus elsősorú biomarkereként ismerünk [10, 11]. Emellett a fibroblaszt sejtekhez hasonlóan extracelluláris mátrix (ECM) komponensek (pl. kollagének, fibronektinek, integrinek) (2. ábra), illetve a szilárd kötőszöveti struktúra kialakításához szükséges enzimek (mátrix metalloproteázok (MMP), illetve ezen enzimek szöveti inhibitorai (TIMP)) termelésére képesek, valamint fokozott proliferációs készséggel bírnak [12].



1. ábra. Miofibroblasztok lehetséges eredetéről számos elmélet létezik a szakirodalomban. A legvalószínűbb teória szerint nyugvó fibroblasztok aktivációjakor jönnek létre, de feltételezhetően más sejtípusok differenciálódása révén is keletkezhetnek. (Saját ábra [13])

A szöveti sérülés hatására aktiválódó miofibroblasztok a károsodott epitel- illetve endotél sejtekkel együtt MMP enzimek termelésével bontják meg nem-sejtes szöveti állományt, az ECM-et, megkönnyítve ezzel az immunsejtek infiltrációját a kitágult, fokozott permeabilitással bíró erekből [14]. A szövetbe jutó immunsejtek elsődleges feladata az immunogén szöveti törmelékek, az elpusztult sejtek, illetve az idegen organizmusok (baktériumok) eltávolítása. Ezt követően az immunsejtek által termelt citokinek, kemokinek indítják el a regenerációs folyamatot, mely célja a funkcióképes szövet visszaépülése [2]. A miofibroblasztok - fokozott proliferációs és migrációs készségüknek köszönhetően - a sérülés helyén felszaporodva igyekeznek helyreállítani a megbomlott szöveti struktúrát. Az ECM komponensek, MMP és TIMP enzimek termelésének kényes egyensúlyával alakítják ki azt a kötőszöveti alapot, mely a reepitelizációt biztosítja [14].



2. ábra. Az extracelluláris mátrix (ECM) összetétele. Az ECM legfőbb komponensei közé a kollagénrostok, a glikoproteinek, mint amilyen fibronektin, valamint proteoglikánok sorolhatók. Sejtfelszínen található transzmembrán fehérjékhez, például integrinhez kötődhetve befolyásolhatják a sejtek működését. (Saját ábra [13])

A fent említett folyamat precízen szabályozott, célja az eredeti szöveti struktúra helyreállítása. Abban az esetben, ha a miofibroblasztok aktivációt kiváltó faktork tartósan jelen maradnak (pl. krónikus gyulladás esetén), felborul a kötőszövet felépülése és bontása közti kényes egyensúly [15]. A hegszövet túlzott mértékű feldúsulása gátolja a funkcióképes szövet visszaalakulását, és ez az érintett szerv funkciójának csökkenéséhez, súlyosabb esetben elvesztéséhez vezethet [7]. Egyes becslések szerint a fejlett nyugati világban történő halálesetek 45%-ának hátterében fibrotikus elváltozások fedezhetők fel [2].

1.1.2. Kóros szöveti átrendeződés a vesében

A különböző eredetű krónikus vesebetegségek (CKD) a világ lakosságának hozzávetőlegesen 10-15%-át érintik [16, 17]. A CKD során a vese hegesedése végül, vese működésének súlyos beszűküléséhez, végstádiumú veseelégtelenséghez vezet [18]. A leggyakoribb kiváltó okok közül kiemelkedik a cukorbetegség és a magas vérnyomás,

autoimmun reakciók, de különböző mutációk, virális és bakteriális infekció, trauma, hipoxia, toxikus hatás következtében is kialakulhat a veseszövet hegeseése [19]. A hegeseedés szövettani képe a vese primer betegségtől függően változhat, érintheti a tubulointersticiális teret, a glomerulusokat és az ereket [20, 21]. Jelenleg a végstádiumú veseelégtelenség lehetséges terápiajaként vesepótló kezelés, mint a dialízis vagy a vesetranszplantáció jön szóba [17].

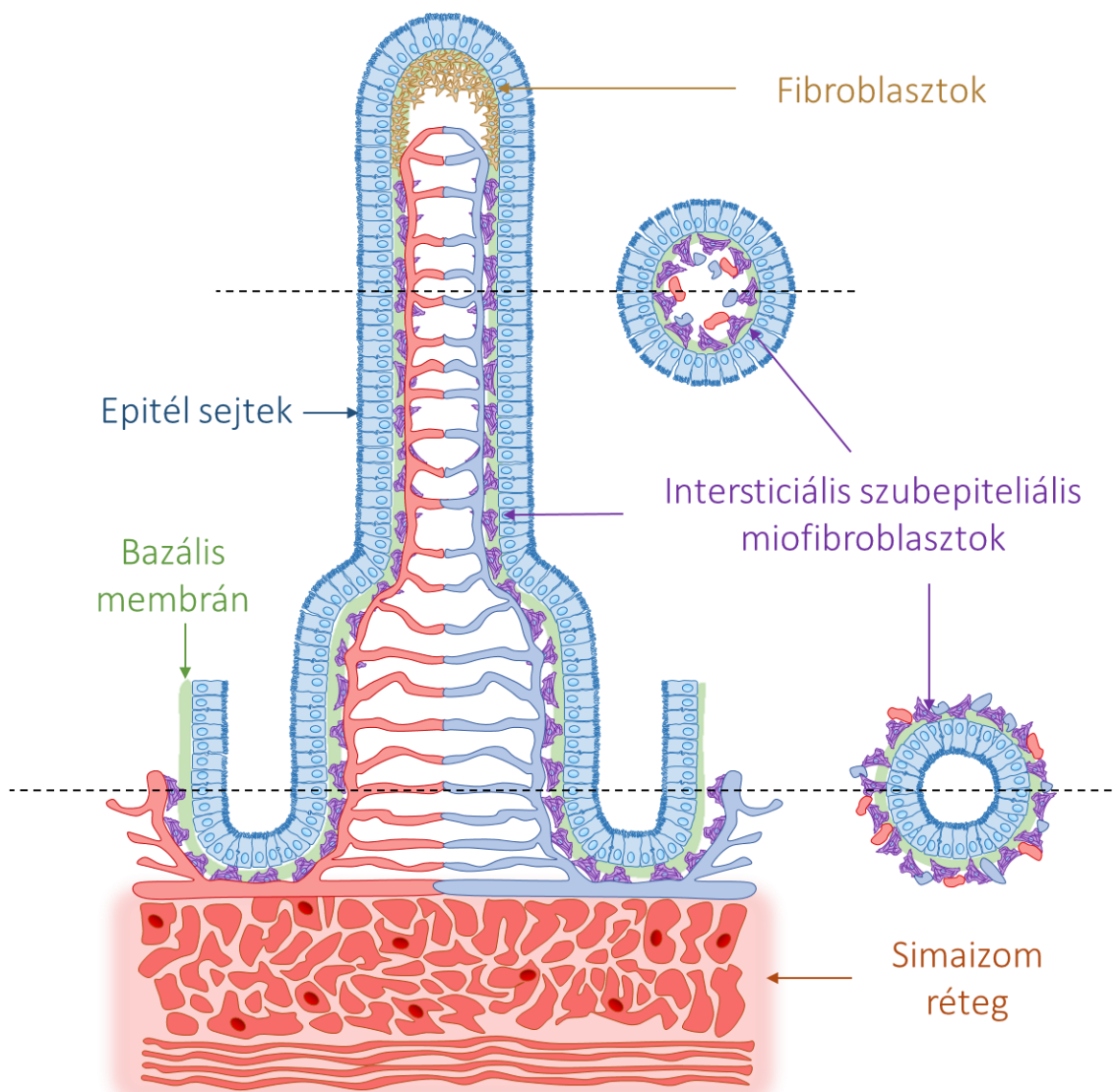
1.1.3. Kóros szöveti átrendeződés a bélben

A bélhám jellegzetessége, hogy a béllumen felől folyamatos mechanikai, biológiai és kémiai ingereknek van kitéve, emiatt a sejtek károsodása és regenerációja egy állandóan jelen lévő folyamat. Emiatt az egészséges bélszövetben is állandó a miofibroblasztok jelenléte, melyek a reepitelizációhoz nélkülözhetetlen bazális membrán komponenseit termelik [13] (3. ábra).

Számos bélrendszeri megbetegedéshez társul kóros szöveti átrendeződés. A legismertebb talán ezek közül a gyulladáshoz társuló bélbetegség (IBD)-asszociált hegeseedés, de az irradiációs enteritisz, krónikus ischaemiás enteritisz, vagy cisztás fibrózis is eredményezheti a bélfal hegeseését. A gasztrointesztinális tályogok és fekélyek szintén a kóros szöveti átrendeződés eredményei, hasonlóan a cöliákia jellegzetes szövettani elváltozásaihoz, mint a boholyatrófia vagy a hiperplázia [22, 23]. Érdekes, hogy bár a cöliákiára nem jellemző a hegeseedés tipikus folyamata, a betegség során nagyfokú, funkciócsökkenéssel járó átalakulás látható a bélmukózában, amely háttérben többek közt abnormális bazális membrán struktúrát és miofibroblaszt működést írtak le [13, 24, 25].

A bélmukóza károsodásában kiemelkedő szerepet játszik az oxidatív stressz, illetve az epitél sejtek antioxidáns védekezőképessége közti egyensúly felbomlása [22]. A bélhámba infiltrálódó immunsejtek által termelt oxigén- és hidroxilgyökök az immunogén anyagok mellett az epitél sejteket is károsítják, de egyes, a tápcsatornában levő anyagok (pl. gliadin) közvetlenül is kiválthatnak oxidatív stresszt [26]. A bélmukóza károsodásának hatására romlik a bélhám barrier funkciója is, ami az immunogén anyagok, kórokozók penetrációjának fokozódásához, és a gyulladás progressziójához vezet. Az oxidatív stressz fontosságát jól jelzi, hogy a betegek mintáin mért antioxidáns kapacitás jól korrelál a gyulladáshoz társuló bélbetegségek progressziójával, legyen szó IBD-ről, vagy cöliákiáról [27-29].

A bélhám kóros átépülése súlyos következményekkel jár. A nem megfelelő reepitelizáció a funkciócsökkenés miatt felszívódási zavarokhoz, gyermekkorban fejlődési zavarokhoz vezet, de a bélhám integritásának csökkenése krónikus gyulladás kialakulását is progrediálja. A hegesedés a bélfal megvastagodásához, passzázsavarhoz, súlyosabb esetben strictura kialakulásához vagy bélezáródáshoz vezethet [23]. Mivel napjainkban nem létezik megfelelő antifibrotikus terápia, egyetlen lehetőségként szükségessé válhat az érintett bélszakasz műtéti úton való eltávolítása is. A Crohn betegségben szenvedők 75%-a élete során legalább egyszer átesik a bélrendszerét érintő sebészeti beavatkozáson [30].



3. ábra. Sematikus ábra a bélszövet szerkezetéről. Az epitél sejtek alatti rétegben elhelyezkedő miofibroblasztok biztosítják a bazális membránt alkotó molekulák folyamatos termelését, amely a bélhám regenerációjának az alapja. (Saját ábra [13])

1.2. Aktinok

Az aktin fehérjék számos sejtfunció nélkülözhetetlen elemei, ilyen a sejtosztódás, az alak- és helyváltoztatás, sejtkecsolatok kialakítása, mikroorganellumok koordinálása és rögzítése. Bár az aktinokról az irodalomban gyakran egyszerűen „az aktin”-ként beszélnek, valójában egy jól konzervált, hat különböző fehérjét magába foglaló fehérjecsalsádról van szó. A különböző aktin izoformákat külön gének kódolják, az egyes fehérjék közti különbség már-már elenyésző. A két legkevésbé hasonló aktin aminosavszekvenciája is 93%-ban megegyezik, ennek ellenére biológiai funkciójuk jól elkülöníthető, egymás szerepét nem, vagy csak részben helyettesíthetik [31].

Az aktinok többféle szempont szerint csoportosíthatóak (1. táblázat). Az egyes izoformák izoelektromos pontjuk, tehát a fehérjék struktúrája szerint, bázikusságuk alapján sorolva α -, β -, illetve γ -aktinok lehetnek. Szöveti jelenlétük szerint izom- és citoplazmatikus formát különböztethetünk meg [32]. Monomer formában az aktin fehérjék globuláris negyedleges szerkezetűek (G-aktin), polimerként fibrillumokat alkotnak (F-aktin). A két forma közti átmenet reverzibilis folyamat, azonban a legtöbb ismert biológiai funkció az F-aktinhoz köthető, így annak depolimerizációja (többek közt oxidatív stressz hatására) funkcióvesztéssel jár.

1. táblázat. Aktin izoformák csoportosítása, főbb jellemzői. F: fibrilláris negyedleges szerkezet; G: globuláris negyedleges szerkezet

Gén	Fehérje	Bázicitás	Szöveti funkció	Jellemző szövet, sejt típus	Funkcionális forma
<i>ACTA1</i>	α _{vázizom} -aktin	α	izom	vázizom	F
<i>ACTA2</i>	α _{simaizom} -aktin	α	izom	simaizom, miofibroblaszt	F
<i>ACTB</i>	β -aktin	β	citoplazma	minden sejt	F, G
<i>ACTC</i>	α _{szívizom} -aktin	α	izom	szívizom	F
<i>ACTG1</i>	γ _{citoplazmatikus} -aktin	γ	citoplazma	minden sejt	F, G
<i>ACTG2</i>	γ _{simaizom} -aktin	γ	izom	bélrendszer simaizma	F

1.2.1. Izom aktinok

Az izomszövetekben előforduló izoformák, az $\alpha_{\text{simai}}\text{zom-}$ (α -SMA, melyet az *ACTA2* gén kódol), $\alpha_{\text{szív}}\text{zom-}$ (*ACTC*), $\alpha_{\text{váz}}\text{zom-}$ (*ACTA1*) és $\gamma_{\text{simai}}\text{zom-}$ (*ACTG2*) aktinok – ahogy arra nevük utal, főként speciális izomszövet sejtjeiben expresszálódnak [32]. Az α -SMA simaiizomsejtek mellett miofibroblasztokban fejeződik ki, jellegzetes stresszrost hálózatot alkotva [6]. Az izom aktinok stabil fibrillumokként polimerizálódnak, amelyek miozinnal komplexet képezve erőteljes kontrakcióra képesek. Ezen formák biztosítják az individuális sejtek összehúzódását, motilitását, alakváltozását, sejtcsoportként pedig az izomszövet összehúzódozó képességét [31].

1.2.2. Citoplazmatikus aktinok

A citoplazmatikus aktinok közé tartozik a β - (*ACTB*), illetve a $\gamma_{\text{citoplazmatikus-}}$ (*ACTG1*) aktin, melyek minden sejtben megtalálhatóak, a sejtváza legfőbb alkotóelemeinként ismerjük őket [31, 32]. Ezen izoformák filamentáris alakja kevésbé stabil, polimerizációja-depolimerizációja az izom aktinokhoz képest jóval dinamikusabb folyamat. Bár struktúrelemkénti funkcióját filamentáris formában tudja ellátni, az F-G formák közti átalakulás számos intracelluláris folyamat alapja, mint amilyen a kromatin átrendeződés, nukleáris transzport, vagy a mikrofilamentumok és -tubulusok működése [33]. Stabil expressziójuknak köszönhetően gyakran használják molekuláris biológiai módszerek referencia elemeként mind fehérje, mind génextpressziós mérések esetén [34].

1.3. IL-24

Az interleukin 24 (IL-24) az IL-10 citokinsalád, azon belül az IL-20 alcsalád tagja [35]. Fő forrásaiként az immunsejteket azonosították, de kimutatták, hogy epitél sejtek, illetve fibroblasztok is termelhetik [36, 37].

Biológiai hatását az IL-20RA/IL-20RB, illetve IL-22RA/IL-20RB heterodimer receptorokon keresztül fejtheti ki, melyet főként epitél-, immun- és fibroblaszt sejtek expresszálnak [36, 38-40]. Ennek megfelelően irodalmi ismereteink elsősorban az IL-24 epitéliumban zajló immunológiai folyamatok, illetve a szöveti regeneráció szabályzásában betöltött szerepéről szólnak. Az IL-24 – IL-20RB jelátviteléről fellelhető adatok ellentmondásosak. Bár ismert, hogy a receptor aktivációja JAK, STAT, SOCS

jelátviteli útvonalak aktiválódásához vezethet, a citokin ezen útvonalaktól független hatását is leírták már [37, 41].

Az IL-24 fokozott jelenlétét mutatták ki számos szöveti átrendeződéssel járó betegség kapcsán, így pszoriázisban, gyulladásoos bélbetegségben, reumatoid artritiszben szenvedő betegek szöveti mintáiban [42]. Emellett korábban kutatócsoportunk a vesefibrózis experimentális modelljében az egyik legnagyobb mértékben expresszálódó molekulaként azonosította [43]. Mindezen eredmények az IL-24 szöveti átrendeződésben betöltött fontos szerepére utalnak, azonban a pontos mechanizmusa máig sem tisztázott.

1.4. PARK7

A Parkinson's disease 7 (PARK7) egy rendkívül sokoldalú, citoprotektív molekula, mely főként neurodegeneratív betegségek kapcsán ismert, de szerepe más betegségek kapcsán is feltételezhető [44-46]. Kutatócsoportunk egy korábbi közleményében fokozott PARK7 expressziót mutatott ki cöliákiában szenvedő betegek gyulladt vékonybél nyálkahártyájában [47]. Hasonlóképp, genomszintű asszociációs tanulmányok egyes polimorfizmusait intesztinális gyulladással járó megbetegedés hajlamosító tényezőjeként azonosították [48, 49].

A PARK7 sejtvédő hatását több különböző mechanizmuson keresztül fejtheti ki. A PARK7 direkt antioxidáns hatása enzimaktivitásának, illetve dajkafehérje (chaperon) funkciójának köszönhető, e mellett az oxidatív károsodás mérséklésében főként transzkripció-regulációs szerepe érvényesül. A fehérje egyfajta oxidatív szenzorként az oxidációs állapotától függően transzkripció faktorokat, például NRF2 és P53 molekulákat stabilizál. A PARK7 oxidációja révén megváltozik konformációs állapota, az addig komplexált transzkripció faktorok felszabadulnak, melyek a sejtmagba történő transzlokációt követően a stresszválaszban szerepet játszó elemek expresszióját indukálják [50, 51]. A fenti mechanizmusok együttesen az oxidatív károsodás mérséklését, a sérült makromolekulák javítását, illetve az érintett sejt túlélését segítik elő. Mindez összhangban van azzal a ténnyel, hogy a PARK7 funkcióvesztő mutációja a magas oxigénszintnek kitett neuronsejtek fokozott halálát, ezáltal neurodegeneratív betegségek korai kialakulását eredményezi [44, 45]. Ezzel szemben funkciónyerő mutációja onkogén, mivel az érintett sejtek ellenállóvá válnak az apoptózissal szemben, s ez kóros sejtburjánzáshoz vezet [52].

2. Célkitűzések

PhD dolgozatom középpontjában a szöveti átrendeződés patomechanizmusának vizsgálata áll. A bemutatott kísérletek fő célja az átrendeződés folyamatában szerepet játszó molekulák azonosítása, illetve azok biológiai szerepének tisztázása. Kísérleteim során különös figyelmet kap az aktin molekula, mint a témában kiemelkedő fontossággal bíró marker. A munkám során az alábbi célokat tűztem ki:

- A szöveti átrendeződéssel kapcsolatos szakirodalomban alkalmazott, a különböző aktinok expressziójának meghatározásához használt PCR primerek specifikusságának felmérése.
- Az irodalomban alkalmazott, aspecifikus aktin primerek használatából adódó mérési hiba jelentőségének felmérése *in vivo* kísérletből származó mintákon.
- Human, egér, illetve patkány aktin expressziók analízisére alkalmas primerek tervezése, optimalizálása, validálása.
- Az IL-24 szerepének vizsgálata a vese és bél szöveti átrendeződésének patomechanizmusában, különös figyelemmel a miofibroblasztok aktivációjára.
- A PARK7 szerepének vizsgálata a cöliákia során tapasztalható szöveti átrendeződés patomechanizmusában, különös figyelemmel az epitélsejtek oxidatív károsodására.

3. Módszerek

3.1. *In vivo, ex vivo* kísérletek

Állatkísérleteinket a Semmelweis Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottsága engedélyezte (PEI/001/83-4/2013). A vizsgálatok során 6-8 hetes, 20-24 g súlyú hím C57BL/6J (Charles River Laboratories), illetve C57BL/6J genetikai háttérrel rendelkező *Il20rb* génkiütött (KO) egereket (University Medical Center Ulm) használtunk. Az állatokat standard körülmények között tartottuk, kontrollált hőmérsékletű ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) szobákban, 12 óránként váltakozó világos és sötét periódusok mellett. Az állatoknak szabadon elérhető standard rágcsálótápot és vizet biztosítottunk.

3.1.1. *Unilaterális uréter obstrukció (UUO)*

A vesehegesedés során zajló folyamatokat UUO-n átesett állatokon vizsgáltuk (n=6-8/csoport).

A műtéti előkészítés során az egerek altatását és általános érzéstelenítését intraperitoneális ketamin-xilazin injekcióval végeztük. Az állatok hasának középvonalán 2 cm-es bemetszést ejtettünk, a hasizmokat oldalirányba széthúztuk, így könnyen hozzáférhetővé váltak az egerek uréterei. Az egerek bal uréterét megtisztítottuk a környező zsír- és kötőszövetektől, majd azt 4-0-s, nem felszívódó fonállal az uréter eredésétől kb. 5 mm-re elkötöttük. Ezek után a hasfal rétegeit 4-0-s sebészi fonállal egyesítettük. A kontroll csoportban résztvevő, „álműtött” állatok a fent leírt beavatkozáson estek át, az uréterüket azonban érintetlenül hagytuk.

Az egerek bal veséit a műtét utáni 7. vagy 14. napon távolítottuk el, ketamin-xilazinnal történő túlaltatást követően. A veseburok lefejtése után levágtuk a vesecsúcsokat, a fennmaradó szövetet feldaraboltuk, és a további vizsgálatokig -80°C -os hűtőben tároltuk.

3.1.2. *Dextrán szódium szulfát (DSS)-indukálta bélgyulladás*

A krónikus gyulladás hatására végbemenő szöveti átépülés, hegesedés folyamatát a bélgyulladás experimentális állatmodelljén, DSS oldattal itatott egereken vizsgáltuk (n=6-8/csoport).

A kísérletek során az állatokat 7 napig 2,5% DSS (MP Biomedicals) oldattal itattuk, majd 12 napig újra normál ivóvizet kaptak. A kontroll állatok a teljes kísérlet alatt tiszta vizet kaptak. Az egerek testsúlyát, illetve a kólitisz klinikai tüneteinek súlyosságát [53] naponta monitoroztuk.

Az indukciót követő 19. napon ketamin-xilazinos altatás után átvágtuk az állatok aorta abdominálisát, majd kioperáltuk a vizsgálni kívánt bélszakaszokat. A foszfát-pufferes sóoldattal (PBS) átmosott szövetdarabokat a további vizsgálatokig -80°C -os hűtőben tároltuk.

3.1.3. Bélhám lokális kezelése

Az IL-24 fehérjének a bélhám szöveti átépülésre gyakorolt direkt hatását rekombináns citokin bélfalba történő injekcióját követően vizsgáltuk (n=6/csoport).

A műtéti előkészítés során az egerek altatását és általános érzéstelenítését intraperitoneális ketamin-xilazin injekcióval végeztük. Az állatok hasának középvonalán 2 cm-es bemetszést ejtettünk, a hasizmokat oldalirányba széthúztuk, majd izoláltuk a vastagbélüket. A disztális vastagbél falába $0,1\ \mu\text{g}$, $50\ \mu\text{l}$ térfogatú PBS-ben oldott rekombináns IL-24 (R&D Systems) oldatot injektáltunk. A kontroll állatokat azonos mennyiségű PBS-sel kezeltük.

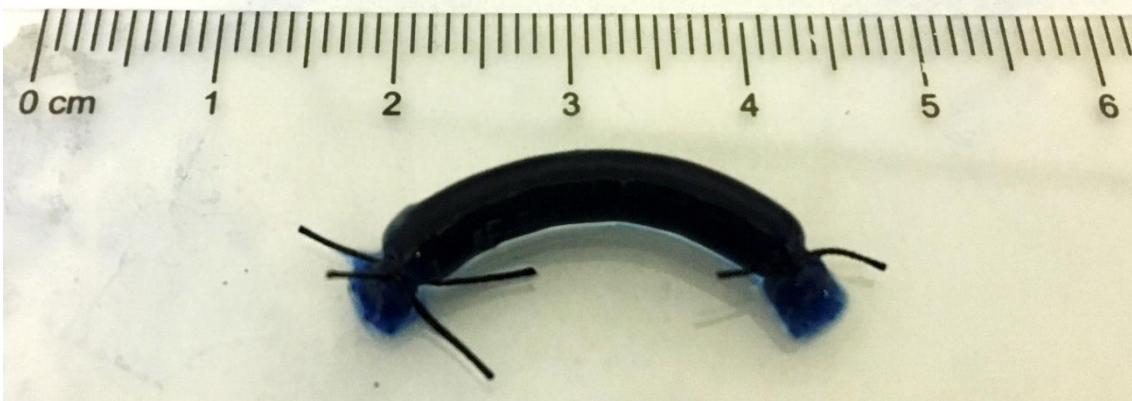
A kísérletet a kezelést követően 24 órával termináltuk. Ketamin-xilazinos altatás után átvágtuk az állatok aorta abdominálisát, majd a vizsgálni kívánt bélszakaszokat eltávolítottuk. A PBS-sel átmosott szövetdarabokat a további vizsgálatokig -80°C -os hűtőben tároltuk.

3.1.4. Vékonybél preparátum

A PARK7 fehérjének a bélhám integritásának fenntartásában betöltött szerepét *ex vivo*, vékonybél preparátumok permeabilitásának meghatározásával [54, 55] vizsgáltuk (n=7-9/csoport).

A kísérlet során kezeletlen, illetve $10\ \text{mg/kg}$ Comp23 ([N-[4-(8-metil(4-hidroimidazo[1,2-a]piridin-2-il))fenil](3,4,5-trimetoxifenil)karboxamid]; AKSci) hatóanyaggal, a műtétet megelőzően 1 órával, intraperitoneálisan előkezelt egereket használtunk. Ketamin-xilazinos altatás után átvágtuk az állatok aorta abdominálisát, majd duodenális bélszakaszukat kioperáltuk. A PBS-sel kimosott vékonybelekből 4-0-s varrónal segítségével $2\ \text{cm}$ hosszú „zsákokat” készítettünk, melyeket $0,1\%$ evans kék (Sigma-Aldrich) festéket tartalmazó, Dulbecco által módosított Eagle-médiával töltöttünk fel (4. ábra) $1000\ \mu\text{M}$ H_2O_2 hozzáadása mellett vagy anélkül. Az így kapott preparátumokat $5\ \text{ml}$ 37°C -os PBS-be helyeztük. A folyadékokból 20 percenként mintát vettünk, a preparátumokból penetráló evans kék festék mennyiségét az $590\ \text{nm}$

hullámhosszon elnyelt abszorbanca alapján határoztuk meg Hidex Chameleon Microplate Reader (300SL Lablogic Systems) spektrofotométerrel, MikroWin 2000 v4.43 (Mikrotek Laborsysteme) szoftver segítségével.



4. ábra. *Ex vivo* permeabilitás vizsgálathoz használt egér vékonybél preparátum. A bélhám átteresztőképességét evans kék festékoldattal feltöltött, egér vékonybélből készült „zsákok” segítségével vizsgáltuk.

3.2. Duodénum biopsziák

Vizsgálatainkat frissen diagnosztizált cöliákiás, valamint kontroll gyermek duodenumából származó biopszia mintán végeztük, melyeket a Semmelweis Egyetem I.sz. Gyermekgyógyászati Klinikáján gyűjtöttünk a Semmelweis Egyetem Regionális, Intézményi, Tudományos és Kutatásetikai Bizottságának engedélyével (TUKEB 58/2013).

A cöliákia diagnózisa az European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN) diagnosztikai kritériumai alapján került felállításra [56]. Minden cöliákiás gyermeknél igazolható volt boholyatrófia, kripta hiperplázia valamint emelkedett szöveti transzglutamináz szint. A kontroll csoportba tartozó gyermekeknél krónikus hasmenés, hasfájás vagy növekedési elmaradás diagnosztikai algoritmusa miatt került sor felső endoszkópiás mintavételre, azonban esetükben a duodenális nyálkahártya szövettanilag épnek bizonyult.

Mintavételt követően a biopsziákat további vizsgálatokig -80°C -os hűtőben tároltuk.

3.3. *In vitro* kísérletek

3.3.1. *Primer duodenális miofibroblaszt (pdMF) sejt kultúra*

Kontroll gyermekek duodenum nyálkahártyájából vett biopsziás mintákból primer miofibroblaszt (pdMF) sejttenyészetet hoztunk létre.

A pdMF-eket 1% magzati borjú szérumot (FBS), valamint 1% penicillin-streptomycin oldatot tartalmazó DMEM (Life Technologies) tápoldatban tenyésztettük 37°C-on 5% CO₂ tartalom mellett. A sejteket passzáltuk és 1:3 arányban új tenyésztőflaskában vittük tovább. A sejtek *in vitro* mérésekhez történő felhasználása a 2. és 6. passzázs között történt. Az pdMF sejteket a különböző kezelések előtt 24 órával az adott kísérlet igényeinek megfelelő lyukszámú sejttenyésztő lemezekre osztottuk és FBS mentes tápoldatban tartottuk őket.

A valós idejű PCR-rel végzett vizsgálatainkhoz a sejteket 96 lyukú sejttenyésztő lemezekre osztottuk (10⁴ sejt/lyuk, n=5 lyuk/kezelési csoport). A sejteket 0,1 ng/ml rekombináns IL-24-gyel (R&D) kezeltük 24 órán keresztül.

A pdMF-ok α -SMA immunopozitív stresszrostjainak orientációját vizsgálva a sejteket 4 lyukú tárgylemezekre osztottuk (2x10⁴ sejt/lyuk), és 24 órán keresztül 0,5 nM TGF- β -val kezeltük 0,1 ng/ml IL-24 hozzáadásával vagy anélkül.

A kontrollként szolgáló csoportokat a reagensek oldószereivel kezeltük.

3.3.2. *FHs74Int vékonybél epitel sejt vonal*

Az FHs74Int humán vékonybél epitel sejtet (American Type Culture Collection; ATCC) 30 ng/ml epidermális növekedési faktort (EGF), 10% FBS-t, valamint 1% penicillin-streptomycin oldatot (Life Technologies) tartalmazó Hybri-Care tápoldatban (ATCC) tenyésztettük 37°C-on 5% CO₂ tartalom mellett. A sejtek további fenntartása, és a velük végzett kísérletekre való előkészítése során a pdMF sejteknél leírtakhoz hasonlóan jártunk el.

A ROS akkumuláció méréshez a sejteket 96 lyukú sejttenyésztő lemezekre osztottuk (10⁴ sejt/lyuk, n=5 lyuk/kezelési csoport). A kontroll, illetve 0,001 μ M Comp23 hatóanyaggal 24 órán át előkezelt sejteket 50, 100, 250, 500, illetve 1000 μ M H₂O₂-dal kezeltük 30 percen át.

Az MTT és LDH tesztek kivitelezéséhez a sejteket 96 lyukú sejttenyésztő lemezekre osztottuk (10⁴ sejt/lyuk, n=5 lyuk/kezelési csoport). A kontroll, illetve 0,0001, 0,001,

0,01, 0,1, illetve 1 μM Comp23 hatóanyaggal 24 órán át előkezelt sejteket 1000 μM H_2O_2 –dal kezeltük 24 órán át.

Az Annexin V apoptózis teszthez a sejteket 6 lyukú sejttenyésztő lemezekre osztottuk (3×10^5 sejt/lyuk). A kontroll, illetve 0,001 μM Comp23 hatóanyaggal 24 órán át előkezelt sejteket 1000 μM H_2O_2 –dal kezeltük 24 órán át. A mérés előtt a sejteket három részre osztva, triplikátumokként mértük ($n=9$ /kezelési csoport).

A valós idejű PCR-rel végzett vizsgálatainkhoz a sejteket 96 lyukú sejttenyésztő lemezekre osztottuk (10^4 sejt/lyuk, $n=5$ lyuk/kezelési csoport). A kontroll, illetve 0,001 μM Comp23 hatóanyaggal 24 órán át előkezelt sejteket 1000 μM H_2O_2 –dal kezeltük 24 órán át.

Az immunfluoreszcens festéshez a sejteket 4 lyukú tárgylemezekre osztottuk (8×10^4 sejt/lyuk). A kontroll, illetve 0,001 μM Comp23 hatóanyaggal 24 órán át előkezelt sejteket 1000 μM H_2O_2 –dal kezeltük 4 órán át.

A kontrollként szolgáló csoportokat a reagensek oldószereivel kezeltük.

3.4. MTT sejtviabilitás teszt

Az FHs74Int sejtek életképességének mérése a 3.3.2 alfejezetben ismertetett kezeléseket követően 24 órával történt. A sejtek médiumához (100 μl /lyuk) 1/10 térfogatnyi (10 μl), steril vízben oldott, 5 mg/ml töménységű Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (Sigma-Aldrich) festékoldatot hozzáadva a sejteket további 4 órán át 37 °C-on inkubáltuk. A médium eltávolítását követően a sejtekben felhalmozódott, a sejtszámmal, illetve metabolikus aktivitásukkal arányos mennyiségű festéket 100 μl DMSO-etanol 1:1 arányú elegyével eluáltuk. A kioldott festék mennyiségét 570 nm hullámhosszon elnyelt abszorbancia alapján határoztuk meg Hidex Chameleon Microplate Reader spektrofotométerrel, MikroWin 2000 v4.43 szoftver segítségével.

3.5. LDH citotoxicitás teszt

A sejthalál mértékének meghatározása FHs74Int sejteken a 3.3.2 alfejezetben ismertetett kezeléseket követően 24 órával történt, az elpusztult sejtekből a médiumba jutó laktát dehidrogenáz (LDH) enzimaktivitása alapján. A sejtekről leszívott 40 μl médiumhoz 96 lyukú lemezen azonos térfogatú LDH reagenst [57] adagoltunk, melynek összetétele 109 mM tejsav, 3,3 mM B-nikotinamid-adenin-dinukleotid-hidrát, 2,2 U/ml diaforáz, 3 mM Tris, 30 mM HEPES, 10 mM NaCl, 350 μM Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromid (Sigma-

Aldrich). A lemezeket 1 órán át 37 °C-on inkubáltuk, majd a médiumban az elpusztult sejtekből kijutott enzimek által átalakított festék mennyiségét 570 nm hullámhosszon elnyelt abszorbancia alapján határoztuk meg Hidex Chameleon Microplate Reader spektrofotométerrel, MikroWin 2000 v4.43 szoftver segítségével.

3.6. Annexin V apoptózis teszt

Az apoptotikus sejtek arányának meghatározása FHs74Int sejteken a 3.3.2 alfejezetben ismertetett kezeléseket követően 24 órával történt FITC Annexin V apoptózis detektáló Kit I segítségével (BD Pharmingen) a gyártó protokollja szerint. A sejteket PBS-es mosást követően 1X Binding Buffer-ben szuszpendáltuk, majd FITC Annexin V és propidium-jodid (PI) festékeket hozzáadva sötétben szobahőmérsékleten 1 órán keresztül inkubáltuk. Ezt követően a megfestett mintákat 1X Binding Buffer-rel hígítottuk. A mérést BD FACS Aria™ áramlási citométerrel (BD Biosciences) végeztük. A vizsgálható sejteket méret (forward scatter) és granuláltság szerinti (side scatter) szórás alapján határoztuk be. Minden kezelési csoportból 10.000 sejtet számoltunk le. Az élő (Annexin V és PI negatív), korai apoptotikus (Annexin V pozitív), illetve késői apoptotikus és halott sejteket (Annexin V és PI pozitív) festődésük alapján azonosítottuk. Az eredményeket ezután BD CellQuest™ Pro (BD Biosciences) szoftver segítségével értékeltük ki.

3.7. ROS teszt

Az FHs74Int sejtek intracelluláris ROS akkumulációjának meghatározása redox-szenzitív fluoreszcens festék, 2',7'-diklorofluorescein diacetát (DCFDA) segítségével történt [58]. A 96 lyukú lemezen levő sejteket PBS-sel mostuk, majd 50 µl, PBS-ben oldott, 5 µM-os DCFDA (Sigma-Aldrich) festékkoldat hozzáadását követően 30 percen át 37 °C-on inkubáltuk. A 3.3.2 alfejezetben ismertetett kezeléseket követően a felülúszók fluoreszcenciaintenzitásának változását 30 percen át, 5 percenként vizsgáltuk. A 485 nm hullámhosszú fényel történő gerjesztés mellett 535 nm hullámhosszú fényt emittáló jelet Hidex Chameleon Microplate Reader spektrofotométerrel detektáltuk, MikroWin 2000 v4.43 szoftver segítségével.

3.8. Immunfluoreszcens festés

Egyes fehérjéknek a szövetmintákon, illetve FHs74Int és pdMF sejteken való jelenlétének, szövetbeli, illetve sejtbeli lokalizációjának meghatározása érdekében

immunfluoreszcens festést végeztünk el. A szövetmintákat Shandon Cryomatrix gyantába (Thermo Fisher Scientific) ágyaztuk, majd a beágyazást követően 5 µm vastag metszeteket készítettünk, a sejteket citokémiai festésre alkalmas 4 lyukú tárgylemezre osztottuk.

A mintákat Cytifix/Cytoperm oldattal (BD Pharmingen) 15 percen át szobahőmérsékleten fixáltuk, permeabilizáltuk. A mosási, illetve jelölési lépések WashPerm oldattal (BD Pharmingen) történtek. A mintákat mosást követően 1 órán keresztül, szobahőmérsékleten α-SMA (sc-53015; 1:1000; egér; Santa Cruz Biotechnology), PARK7 (ab18257; 1:1000; nyúl; Abcam), ZO-1 (ab96587; 1:1000; nyúl; Abcam) ellen termelt elsődleges antitestekkel, vagy az aktin rostokhoz kötődő Alexa Fluor 546 falloidinnel (A22283; 7,5 unit/ml; Thermo Fisher Scientific) jelöltük. Többszöri mosást követően az adott elsődleges antitest ellen termelt, fluoreszcensen jelölt másodlagos, anti-egér Alexa Fluor 488 (A11001; Thermo Fisher Scientific), anti-nyúl Alexa Fluor 568 (A11036; 1:1000; Thermo Fisher Scientific) vagy anti-nyúl Alexa Fluor 488 (A21206; 1:1000; Thermo Fisher Scientific) antitestekkel 30 percen át, szobahőmérsékleten inkubáltuk mintáinkat. Újabb mosási lépéseket követően a tárgylemezeket DAPI sejtmagfestéket tartalmazó ProLong Gold Antifade Mountant (Thermo Fisher Scientific) médiummal fedtük. A jelölés specificitásának ellenőrzése, illetve az autofluoreszcencia kiküszöbölése végett a festési kontrollként alkalmazott minták esetében a primer antitesttel való jelölési lépést kihagytuk.

Az immunfluoreszcens képeket Olympus IX81 fluoreszcens mikroszkóp rendszerrel készítettük.

3.9. Sejtvázkárosodás mértékének meghatározása

A 3.3.2 alfejezetben ismertetett kezeléseket követően 4 órával az FHs74Int sejtek sejtvázát a 3.8 alfejezetben leírtak szerint falloidinnel jelöltük, majd a sejtvázkárosodás mértékét grafikus módszerrel vizsgáltuk. Kezelési csoportonként ugyanazon területről Olympus IX81 fluoreszcens mikroszkóppal, 10x nagyítású objektívet alkalmazva képet készítettünk. Ezt követően az egyes képek látóterében található összes sejtet (kezelési csoportonként hozzávetőlegesen 400-500 sejt) sejtvázállapotuk alapján kategorizáltuk ImageJ 1.48v szoftver segítségével (The National Institutes of Health, Bethesda) [59] az alábbiak szerint. Meghatároztuk az ép sejtvázú, károsodott sejtvázú sejteket, illetve az

elpusztult sejtekre utaló sejtmaradványok számát, majd kiszámoltuk ezeknek a látótérben látott összes sejtszámra vonatkoztatott arányát.

3.10. Stresszrost orientáció meghatározása

A 3.3.1 alfejezetben ismertetett kezeléseket követően 24 órával a pdMF-ek α -SMA pozitív stresszrostjait a 3.8 alfejezetben leírtak szerint festettük, majd a stresszrostok orientációját grafikus módszerrel vizsgáltuk. Kezelési csoportonként 35-40 véletlenszerűen kiválasztott sejtről Olympus IX81 fluoreszcens mikroszkóppal, 100x nagyítású olajimmerziós objektívet alkalmazva képet készítettünk. Annak érdekében, hogy az adott sejt teljes stresszrost-hálózatára jellemző információt kapjunk, minden sejtben meghatároztuk legalább 20 stresszrostnak a sejt hosszanti tengelyével bezárt szögét. A grafikai analízist ImageJ 1.48v szoftver segítségével végeztük el. Az egyes sejtek stresszrostjainak párhuzamosságát a meghatározott dőlésszögek 95%-os konfidenciaintervallumával jellemeztük.

3.11. mRNS expresszió meghatározása

3.11.1. RNS izolálás és DNS szintézis

Vizsgálataink során a szövetmintákból és sejtekből Geneaid Total RNA Mini Kit (Geneaid Biotech) segítségével RNS-t izoláltunk a gyártó protokolljának megfelelően. A kinyert RNS mennyiségét és minőségét DS-11 spektrofotométerrel (Denovix) határoztuk meg. Mintánként egységes mennyiségű RNS-ből komplementer DNS-t szintetizáltunk Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (Thermo Fisher Scientific) reagensekkel a gyártó utasításainak megfelelően.

3.11.2. Primerek tervezése, gyűjtése

A vizsgálni kívánt génekre specifikus primereket az NCBI (National Center for Biotechnology Information) nukleotid adatbázisában [60] található szekvenciák alapján, Lasergene PrimerSelect v7.1.0 (DNASTAR) szoftver segítségével terveztük.

Az α -SMA és β -aktin PCR reakciók specifikusságának vizsgálatát célzó méréseinkhez 3-3 pár, véletlenszerűen kiválasztott, neves szaklapokban publikált tanulmányokban alkalmazott primer szekvenciáit gyűjtöttük le. Az oligonukleotidokat az Integrated DNA Technologies (IDT) cég szintetizálta.

A reakciók során alkalmazott primerek szekvenciáit, optimális anellációs hőmérsékletét, illetve az általuk eredményezett PCR termékek méretét az 2. táblázat, illetve 3. táblázat tartalmazza.

2. táblázat. Valós idejű PCR mérések során használt primerek jellemzői. F: forward primer; R: reverse primer; bp: bázispár; T_a: optimális anellációs hőmérséklet

Gén	NCBI ref. Seq	Faj	Primer szekvenciák	Termékhossz	T _a
<i>BAX</i>	NM_001291428.2	human	F: 5'-GGATGATTGCCCGCCGTGGACACAG-3' R: 5'-CAACAGCCGCTCCCGGAGGAAGTC-3'	215 bp	60 °C
<i>BCL2</i>	NM_000633.2	human	F: 5'-CGGGGTGAACTGGGGGAGGATTGT-3' R: 5'-AGGTGTGCAGGTGCCGGTTCAGGT-3'	143 bp	60 °C
<i>CDH1</i>	NM_004360.4	human	F: 5'-AAGGAGGCGGAGAAGAGGACCAG-3' R: 5'-GATTGGCAGGGCGGGGAAG-3'	138 bp	60 °C
<i>CDKN1A</i>	NM_001220777.1	human	F: 5'-TTGTACCCTTGTGCCTCGCTCAGG-3' R: 5'-ATCAGCCGCGTTTTGGAGTGGTAG-3'	126 bp	60 °C
<i>GCLC</i>	NM_001498.4	human	F: 5'-AAAAGTCCGGTTGGTCCTGTCTGG-3' R: 5'-GGCTGTCTGGTGTCCCTCAATC-3'	138 bp	56 °C
<i>HMOX1</i>	NM_002133.2	human	F: 5'-CCAGCGGGCCAGCAACAAAG-3' R: 5'-TGTCGCCACCAGAAAGCTGAGTGT-3'	130 bp	60 °C
<i>ITGB5</i>	NM_002213.5	human	F: 5'-TCCGCCATCTGCTGCCTCTCAC-3' R: 5'-CATCCTTTTCGCCAGCCAATCTTCTC-3'	156 bp	60 °C
<i>NQO1</i>	NM_000903.3	human	F: 5'-CTGCTGCAGCGGCTTTGAAGA-3' R: 5'-GCCAGAACAGACTCGGCAGGATAC-3'	151 bp	60 °C
<i>NRF2</i>	NM_006164.4	human	F: 5'-CAGCAGGACATGGATTTGATTG-3' R: 5'-ACTGGTTTCTGACTGGATGTGCT-3'	252 bp	54 °C
<i>PCNA</i>	NM_002592.2	human	F: 5'-GCGGTCTGAGGGCTTCGACACCTA-3' R: 5'-CCGCGTTATCTTCGGCCCTTAGTG-3'	134 bp	60 °C
<i>RN18S</i>	HQ387008.1	human	F: 5'-GGCGGCGACGACCCATTC-3' R: 5'-TGGATGTGGTAGCCGTTTCTCAGG-3'	136 bp	60 °C
<i>SNAIL</i>	NM_005985.3	human	F: 5'-GCCATGTCCGGACCCACACTG-3' R: 5'-TCGGGAGAAGGTCCGAGCACAC-3'	152 bp	60 °C

<i>SNAI2</i>	NM_003068.4	human	F:5'-CGCGCTCCTTCCTGGTCA-3' R:5'-GGCTGTATGCTCCTGAGCTG-3'	159 bp	60 °C
<i>TP53</i>	NM_001126118.1	human	F: 5'-TGGTCTGGCCCCTCCTCAGCATCT-3' R: 5'-TCAGGCGGCTCATAGGGCACCAC-3'	114 bp	60 °C
<i>TRX1</i>	NM_003329.3	human	F: 5'-ATGCATGCCAACATTCCAGTTTT-3' R: 5'-ATGGTGGCTTCAAGCTTTTCCTTA-3'	87 bp	56 °C
<i>VIM</i>	NM_003380.4	human	F:5'-GAGGCTGCCAACCGGAACAATGAC-3' R:5'-TCCTGCAGGCGGCCAATAGTGTCT-3'	203 bp	60 °C
<i>VCL</i>	NM_014000.2	human	F: 5'-CCACGGCGCCTCCTGATGC-3' R: 5'-GGCCTGAATGCCTTCCACTGTTGA-3'	152 bp	60 °C
<i>ZOI</i>	NM_021258.3	human	F: 5'-ACCACAAGCGCAGCCACAACCAAT-3' R: 5'-GGGGTGGGCTCCTCCAGTCTGACAT-3'	186 bp	60 °C
<i>Coll1a1</i>	NM_007742.4	egér	F: 5'-CAAAGCTGCTGATGGTTCT-3' R: 5'-GACCAGCTTACCCTTG-3'	107 bp	60 °C
<i>Col3a1</i>	NM_009930.2	egér	F: 5'-GTCCCCTGGCTCAAATGGCTCAC-3' R: 5'-GGGGCCCCTTGCTCCTATTAGTCC-3'	175 bp	61 °C
<i>Fn1</i>	NM_010233.2	egér	F:5'-GGTCAGGGCCGGGGCAGAT-3' R:5'-CTGGCTGGGGGTCTCCGTGATAAT-3'	228 bp	60 °C
<i>Gapdh</i>	NM_007475.5	egér	F: 5'-ATCTGACGTGCCGCCTGGAGAAAC-3' R: 5'-CCCGGCATCGAAGGTGGAAGAGT-3'	164 bp	60 °C
<i>Hprt</i>	NM_013556.2	egér	F: 5'-GGTTAAGCAGTACAGCCCCAAAAT-3' F: 5'-TCAAGGGCATATCCAACAACAAC-3'	135 bp	54 °C
<i>Mmp2</i>	NM_008610.3	egér	F: 5'-ATCTGACGTGCCGCCTGGAGAAAC-3' R: 5'-CCCGGCATCGAAGGTGGAAGAGT-3'	164 bp	60 °C
<i>Mmp9</i>	NM_013599.4	egér	F: 5'-ATCTGACGTGCCGCCTGGAGAAAC-3' R: 5'-CCCGGCATCGAAGGTGGAAGAGT-3'	164 bp	60 °C
<i>Rn18s</i>	AY248756.1	egér	R: 5'-AGCGGTCGGCGTCCCCAACTTCT-3' F: 5'-GCGCGTGCAGCCCCGACATCTA-3'	107 bp	60 °C

<i>Rplp0</i>	NM_007475.5	egér	F: 5'-CCGCGCGTCCTGGCATTGTCTGTG-3' R: 5'-CCGCAGGGGCAGCAGTGGTG-3'	136 bp	60 °C
<i>Timp1</i>	NM_001044384.1	egér	F:5'-CACGGGCCGCCTAAGGAAC-3' R:5'-CGTGGCAGGCAAGCAAAGTG-3'	249 bp	58 °C
<i>Timp2</i>	NM_011594.3	egér	F:5'-TGCCCTGGCACACGCTTAGC-3' R:5'-GTACCACGCGCAAGAACCATCA-3'	221 bp	58 °C

3. táblázat. α -SMA és β -aktin PCR mérések során használt primerek jellemzői. F: forward primer; R: reverse primer; bp: bázispár; T_a : optimális anellációs hőmérséklet

Név	Gén	NCBI ref. Seq	Faj	Forrás	Primer szekvenciák	Termékhossz	T_a
m α -SMA _{SD}	<i>Acta2</i>	NM_007392.3	egér	saját	F: 5'-CCCCTGAAGAGCATCGGACA-3' R: 5'-TGGCGGGGACATTGAAGGT-3'	105 bp	60 °C
m β -actin _{SD}	<i>Actb</i>	NM_007393.5	egér	saját	F: 5'-CCCCTGAGGAGCACCGTGTG-3' R: 5'-ATGGCTGGGGTGTGAAGGT-3'	106 bp	60 °C
m α -SMA _{L1}	<i>Acta2</i>	NM_007392.3	egér	[61, 62]	F: 5'-CACTATTGGCAACGAGCGC-3' R: 5'-CCAATGAAGGAAGGCTGGAA-3'	60 bp	48 °C
m α -SMA _{L2}	<i>Acta2</i>	NM_007392.3	egér	[63, 64]	F: 5'-GTCCCAGACATCAGGGAGTAA-3' R: 5'-TCGGATACTTCAGCGTCAGGA-3'	101 bp	57 °C
m α -SMA _{L3}	<i>Acta2</i>	NM_007392.3	egér	[65]	F: 5'-GAGGCACCACTGAACCCTAA-3' R: 5'-CATCTCCAGAGTCCAGCAC-3'	154 bp	54 °C
m β -actin _{L1}	<i>Actb</i>	NM_007393.5	egér	[4, 66]	F: 5'-GGCTGTATCCCCTCCATCG-3' R: 5'-CCAGTTGGTAACAATGCCATGT-3'	154 bp	56 °C
m β -actin _{L2}	<i>Actb</i>	NM_007393.5	egér	[64]	F: 5'-TGTTACCAACTGGGACGACA-3' R: 5'-GGGGTGTGAAGGTCTCAAA-3'	165 bp	55 °C
m β -actin _{L3}	<i>Actb</i>	NM_007393.5	egér	[67]	F: 5'-AGCCATGTACGTAGCCATCC-3' R: 5'-CTCTCAGCTGTGGTGGTGAA-3'	228 bp	57 °C
h α -SMA _{SD}	<i>ACTA2</i>	NM_001141945.2	human	saját	F: 5'-ACTGAGCGTGGCTATTCCTCCGTT-3' R: 5'-GCAGTGGCCATCTCATTTTCA-3'	111 bp	58 °C
h β -actin _{SD}	<i>ACTB</i>	NM_001101.3	human	saját	F: 5'-ACCGAGCGTGGCTACAGCTTCACC-3' R: 5'-AGCACCCGTGGCCATCTCTTTCTCG-3'	114 bp	53 °C
r α -SMA _{SD}	<i>Acta2</i>	NM_031004.2	patkány	saját	F: 5'-GAGCGTGGCTATTCCTTCGTG-3' R: 5'-CAGTGGCCATCTCATTTCAAAGT-3'	106 bp	54 °C
r β -actin _{SD}	<i>Actb</i>	NM_031144.3	patkány	saját	F: 5'-ACCGAGCATGGCTACAGCGTCACC-3' R: 5'-GTGGCCATCTCTTGCTCGGAGTCT-3'	106 bp	54 °C

3.11.3. Mesterséges DNS templátok

Az egér α -SMA és β -aktin PCR reakciók specifikusságának vizsgálatát célzó méréseink során α -SMA (*Acta2*), β -aktin (*Actb*), γ -cito-aktin (*Actg1*) és γ -simaizom-aktin (*Actg2*) gének szekvenciájával megegyező mesterséges DNS templátokat ($m\alpha$ -SMA_T, $m\beta$ -actin_T, $m\gamma$ -cyto-actin_T, $m\gamma$ -smooth-actin_T) használtunk (gBlocks Gene Fragments, IDT), melyek a vizsgált egér α -SMA és β -aktin primerek anellációs szakaszait tartalmazták. A génfragszensek szekvenciái a 4. táblázatban találhatóak.

A human és patkány α -SMA és β -aktin DNS templátokat ($h\alpha$ -SMA_T, $h\beta$ -actin_T, $r\alpha$ -SMA_T, $r\beta$ -actin_T) specifikus PCR-reakció során állítottuk elő. A PCR termékeket 2%-os agaróz gélen (Bioline) gélelektroforézissel szeparáltuk, majd miután kivágtuk a gélből, a SureClean Plus purification kit (Bioline) segítségével tisztítottuk.

3.11.4. Valós idejű PCR

A valós idejű PCR méréseket LightCycler 480 (Roche Diagnostics) automatán végeztük. A 20 μ l reakcióelegy 10 pmol/ μ l forward és reverse primert, 10 μ l LightCycler 480 SYBR Green I Master enzyme mix (Roche Diagnostics) reagenst és 1 μ l DNS-t tartalmazott. A mérések kvalitatív és kvantitatív elemzése by Light Cyler 480 v1.5.0.39 szoftver (Roche Diagnostics) segítségével zajlott. A különböző célmolekulák referencia génre vonatkoztatott mRNS expresszióját az $x = 2^{-\Delta C_p}$ képlet [68] alapján határoztuk meg, és a kontroll csoportok átlagértékére normalizálva ábrázoltuk.

Az α -SMA és β -aktin specifikus primerek PCR-reakciónak termékeit 2%-os agaróz gélen gélelektroforézissel Tris-borát-EDTA pufferben szeparáltuk, a gélek DNS-tartalmát GelRed (Biotium) reagenssel festettük, és VersaDoc 5000MP (Bio-Rad Laboratories) berendezés segítségével vizualizáltuk.

3.11.5. Szekvenálás

A saját tervezésű, egér α -SMA és β -aktin specifikus primerek által amplifikált termékek szekvenciáját Sanger-szekvenálás útján ellenőriztük. Az UUO-n átesett egerek mintájából származó DNS-ből származó PCR termékeket SureClean Plus Purification Kit (Bioline) reagenssel tisztítottuk, majd BrightDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Nimagen), illetve ABI 3500 (Thermo Fisher Scientific) szekvenátor segítségével szekvenáltuk a gyártó utasításainak megfelelően. A kapott kromatogramok analízisét Unipro Ugene v.1.16.1 szoftverrel végeztük.

4. táblázat. Egér α -SMA és β -aktin PCR reakciók specifikusságának meghatározásához használt mesterséges DNS templátok. bp: bázispár

Név	Gén	NCBI ref. Seq	Faj	Pozíció	Templát szekvencia
$m\alpha$ -SMA _T	<i>Acta2</i>	NM_007392.3	egér	109-1005 bp	TGTGTGAAGAGGAAGACAGCACAGCCCTGGTGTGCGACAATGGCTCTGGGCTCTGTAAGG CCGGCTTCGCTGGTGATGATGCTCCCAGGGCTGTTTTCCCATCCATCGTGGGACGTCCCAG ACATCAGGGAGTAATGGTTGGAATGGGCCAAAAAGACAGCTATGTGGGGGATGAAGCCCA GAGCAAGAGAGGGATCCTGACGCTGAAGTATCCGATAGAACACGGCATCATACCAACTG GGACGACATGGAAAAGATCTGGCACCCTCTTTCTATAACGAGCTTCGTGTGGCCCCTGAA GAGCATCCGACACTGCTGACAGAGGCCACTGAACCCTAAGGCCAACCGGGAGAAAATG ACCCAGATTATGTTTGAGACCTTCAATGTCGCCCGCCATGTATGTGGCTATTCAGGCTGTGCT GTCCCTCTATGCCTCTGGACGTACAACCTGGTATTGTGCTGGACTCTGGAGATGGTGTGACT CACAACGTGCCTATCTATGAGGGCTATGCCCTGCCTCATGCCATCATGCGTCTGGACTTGG CTGGCCGAGATCTCACCGACTACCTCATGAAGATCCTGACTGAGCGTGGCTATTCCTTCGT GACTACTGCCGAGCGTGAGATTGTCCGTGACATCAAGGAGAAGCTGTGCTATGTAGCTCTG GACTTTGAAAATGAGATGGCCACGGCCGCCTCCTCTTCCCTCCCTGGAGAAGAGCTACGAAC TGCCTGACGGGCAGGTGATCACCATTGGAAACGAACGCTTCCGCTGCCAGAGACTCTCTT CCAGCCATCTTTCATTGGGATGGAGTCAGCGGGCATCCACGAAACCACCTATAACAGCATC ATGAAGTGTGATATTGACATCAGGAAGGATCTCTATGCTAACAACG
$m\beta$ -actin _T	<i>Actb</i>	NM_007393.5	egér	105-1001 bp	TCGCCATGGATGACGATATCGCTGCGCTGGTTCGTCGACAACGGCTCCGGCATGTGCAAAGC CGGCTTCGCGGGCGACGATGCTCCCCGGGCTGTATCCCTCCATCGTGGGCGCCCTAGG CACCAGGGTGTGATGGTGGGAATGGGTCAGAAGGACTCCTATGTGGGTGACGAGGCCAG AGCAAGAGAGGTATCCTGACCCTGAAGTACCCATTGAACATGGCATTGTTACCAACTGGG ACGACATGGAGAAGATCTGGCACCACACCTTCTACAATGAGCTGCGTGTGGCCCCTGAGG AGCACCTGTGCTGCTCACCGAGGCCCCCTGAACCCTAAGGCCAACCGTGAAGAAGATGA CCCAGATCATGTTTGAGACCTTCAACACCCAGCCATGTACGTAGCCATCCAGGCTGTGCT GTCCCTGTATGCCTCTGGTTCGTACCACAGGCATTGTGATGGACTCCGGAGACGGGGTCACC CACACTGTGCCATCTACGAGGGCTAT
$m\gamma$ -cyto-actin _T	<i>Actg1</i>	NM_009609	egér	362-477 bp	TGTGGCTCCTGAGGAGCACCCGGTGTCTTCTGACCGAGGCCCCCTGAACCCCAAAGCTAAC AGAGAGAAGATGACGCAGATAATGTTTGAACCTTCAATACCCAGCCATGTACG
$m\gamma$ -smooth-actin _T	<i>Actg2</i>	NM_009610	egér	396-510 bp	AGTAGCACCAGAAGAGCACCCACCCCTGCTCACAGAGGCCCCCTAAACCCCAAAGCAAA CAGAGAGAAGATGACCCAGATCATGTTGAAACCTTCAATGTCCCTGCCATGTAT

3.12. Fehérje mennyiségének meghatározása

3.12.1. Fehérjeizolálás

A vizsgált mintákat lízis pufferben (10 µg/ml leupeptin, 10 µg/ml aprotinin, 1% Triton-X 100, 0,1 M Tris-HCl (pH=8), 1 mM etilén-glikol-tetraecetsav (EGTA), 5 mM NaF, 1 mM fenil-metil-szulfonil fluorid (PMSF), 10 mM Na₃VO₄ (Sigma-Aldrich) homogenizáltuk. A felülúszók összfehérje koncentrációját spektrofotometriás módszerrel, Bradford reagenssel határoztuk meg (Bio-Rad Laboratories), Hidex Chameleon Microplate Reader spektrofotométer segítségével. Mintákból egységes koncentrációjú fehérjeoldatokat készítettünk desztillált víz hozzáadásával, majd ¼ térfogatnyi Leammi-féle treatment puffert (30% glicerol, 20% β-merkaptotanol, 0,7 M nátrium-dodecil-szulfát (SDS), 0,25 M Tris-HCl pH=6,8) hozzáadva 5 percig 100°C-on denaturáltuk őket.

3.12.2. Western blot

4-20%-os gradiens SDS-poliakrilamid gél (Mini-Protean TGX, Bio-Rad Laboratories) zsebeibe 20 µg összfehérjének megfelelő mintamennyiségeket, illetve molekulasúly markert (Precision Plus ProteinTM Dual Color, Bio-Rad Laboratories) vittünk fel. Az elektroforézist (PowerPac Basic Power Supply, Bio-Rad Laboratories) 200 V feszültség mellett végeztük 25 mM Tris, 192 mM glicin, 0,1% SDS tartalmú futtató pufferben. Ezt követően a szeparált fehérjéket az SDS-poliakrilamid gélről 0,2 µM pórusméretű nitrocellulóz membránra (Trans-Blot Turbo Transfer Pack, Bio-Rad Laboratories) blottoltuk (Trans-Blot Turbo Transfer system, Bio-Rad Laboratories). A fehérjetranszfer sikerességét 25%-os ecetsavban oldott 1%-os Ponceau (Sigma-Aldrich) festékkoldattal ellenőriztük. A blotmembránok aspecifikus kötőhelyeinek gátlására a membránokat szobahőmérsékleten, 1 órán keresztül, óvatos ráztatás mellett blokkoló oldatban (5% zsírmentes tejpor PBS pufferben) inkubáltuk. Blokkolást követően a membránokat mosó oldatban (1% zsírmentes tejpor, 0,05% Tween 20 detergens, PBS puffer) hígított elsődleges α-SMA (sc-53015; 1:10000; egér; Santa Cruz Biotechnology), illetve GAPDH (sc-47724; 1:1000; egér; Santa Cruz Biotechnology) specifikus ellenanyagokkal jelöltük 4°C-on 24 órán keresztül. A mosási lépéseket követően tormaperoxidáz-konjugált anti-egér másodlagos antitesttel (7076S; 1:2000; Cell Signaling Technology) 1 órán keresztül, szobahőmérsékleten inkubáltuk a membránokat. Az immunoreaktív helyek

kemilumineszcens szignálját ECL (enhanced chemieluminescence) reagens (Western Blotting Luminol Reagent, GE Healthcare) hozzáadásával detektáltuk VersaDoc 5000MP képalkotó rendszer (Bio-Rad Laboratories) segítségével. Eredményeinket a Quantity One v4.6.9 szoftverrel (Bio-Rad Laboratories) denzitometráltuk és értékeltük. A vizsgált fehérjék relatív mennyiségét a GAPDH belső kontroll hányadosaként, a kontroll szövetben kapott átlagértékre normalizálva adtuk meg.

3.13. Szövettani festések vesefibrózis mértékének meghatározásához

A 4%-os PFA oldatban tárolt vese szövetmintákból paraffinba ágyazást követően 5 µm vastag metszeteket készítettünk, majd Masson trikróm, illetve pikro-SiriusRed szövettani eljárásokkal festettük meg őket. A festett metszetek digitalizálása Panoramic 250 Flash 3 (3DHISTECH Kft., Budapest, Magyarország) szkennelvel történt.

A fibrotikus terület kvantifikálása érdekében minden állat veséjéről egyenként 10-20 darab, 20-szoros nagyítású, a teljes cortex régiót lefedő, de egymással át nem fedő területet jelöltünk ki. Az így annotált képeket exportáltuk, majd képelemző szoftver által feldolgozható formátumúvá alakítottuk. A képeknek Masson festés esetén kék, SiriusRed esetén piros színű, kollagénben dús kötőszöveti lerakódás területének százalékos arányát ImageJ szoftverrel számítottuk ki.

3.14. Statisztika

Az adatsorok statisztikai értékelését GraphPad Prism 6.01 szoftverrel (GraphPad Software Inc.) végeztük. Az adatok normál eloszlását Kolmogorow Smirnov teszt segítségével vizsgáltuk, teljesülése esetén két csoport esetén egymintás t-próbát, több csoport esetén varianciaanalízist (ANOVA) használtunk. Amennyiben az adatok nem normál-eloszlást mutattak, Mann-Whitney U-tesztet, vagy Kruskal-Wallis tesztet végeztünk. A többváltozós, assay jellegű vizsgálatainkból (MTT, LDH, Annexin V, ROS tesztek) származó adatsorok összehasonlítását többszörös t-próba, illetve két-szemponos ANOVA segítségével végeztük el. Többcsoportos analízis esetén a páronkénti összehasonlításhoz Dunnett-féle post-hoc tesztet alkalmaztunk. A relatív expressziók közti összefüggéseket Spearman-féle korrelációs analízissel vizsgáltuk, a koefficiens értékek (r) értelmezését az 5. táblázatban foglaltuk össze [69, 70]. A különböző kezelési csoportokban tapasztalt sejtvázkárosodás mértékét Khí-négyzet próba segítségével hasonlítottuk össze. A statisztikailag szignifikáns eltéréseket $p < 0.05$ valószínűségi érték

teljesülése esetén különböző szimbólumokkal jelöltük, az összehasonlítás alapjául szolgáló csoportok, illetve az alkalmazott statisztikai módszer feltüntetésével. A szemléltető grafikonokon átlag és szórás (SD) látható.

5. táblázat. Spearman-féle korrelációs koefficiens értékek (r) értelmezése.

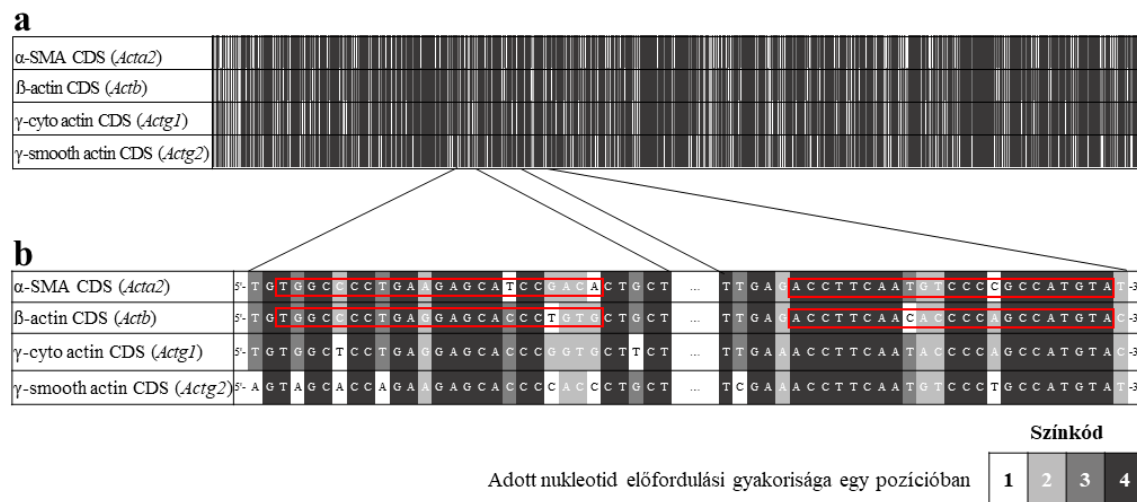
Korrelációs koefficiens értékek	Összefüggés mértéke
$0,9 \leq r \leq 1$	Nagyon szoros kapcsolat
$0,7 \leq r \leq 0,9$	Szoros kapcsolat
$0,5 \leq r \leq 0,7$	Közepes kapcsolat
$0,3 \leq r \leq 0,5$	Gyenge kapcsolat
$0 \leq r \leq 0,3$	Elhanyagolható kapcsolat

4. Eredmények

4.1. α -SMA és β -aktin specifikus PCR primerek

4.1.1. Saját tervezésű egér α -SMA és β -aktin primerek templát-specifitása

Az egér α -SMA és β -aktin forward primerek anellációs pozícióját úgy terveztük, hogy az adott szekvencia szakasz a különböző aktin izoformák kódoló szakaszán (*Acta2*, *Actb*, *Actg1*, *Actg2*) a lehető legtöbb bázis eltérést tartalmazza, különösen a primerek 3' végén (5. ábra).

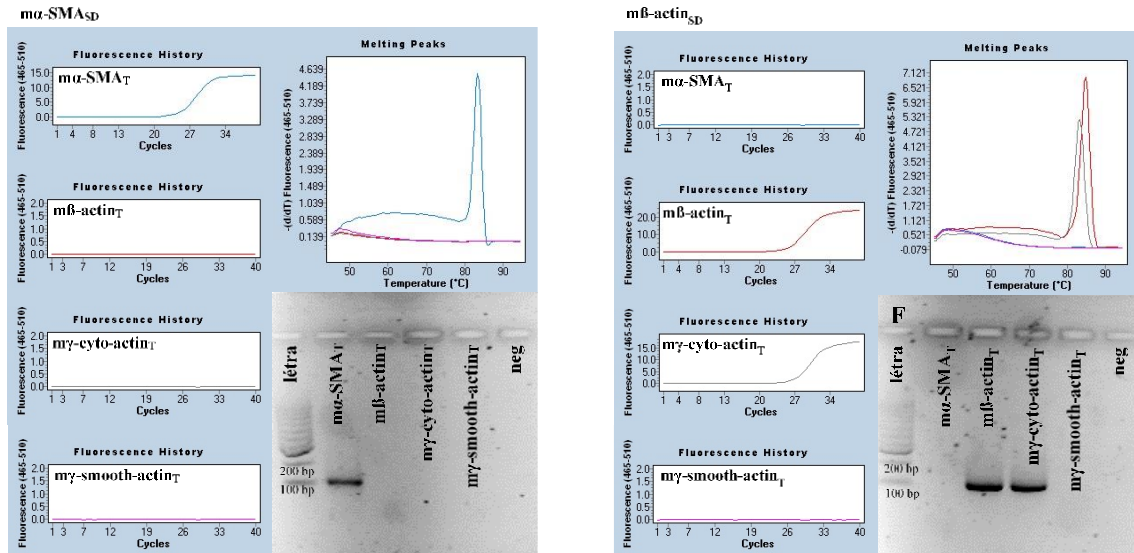


5. ábra. Hő térkép a különböző egér aktin izoformákat kódoló szekvenciák (CDS) közti homológiáról a saját tervezésű $m\alpha$ -SMA_{SD} és $m\beta$ -actin_{SD} primerek bekötődési szakaszán. Egymásra illesztve az *Acta2*, *Actb*, *Actg1*, illetve az *Actg2* szekvenciákat, minden nukleotidot 1-től 4-ig pontoztunk aszerint, hogy az adott pozícióban hány izoforma esetén fordul elő (a). A kinagyított szakaszon a saját tervezésű $m\alpha$ -SMA_{SD}, illetve $m\beta$ -actin_{SD} primerek anellációs pozícióit piros négyzettel jelöltük (b).

A primereink specificitását egér *Acta2*, *Actb*, *Actg1* és *Actg2* gének szekvenciáinak megfelelő mesterséges DNS templátok ($m\alpha$ -SMA_T, $m\beta$ -actin_T, γ -cyto-actin_T, illetve $m\gamma$ -smooth-actin_T) segítségével végzett PCR-ekkel vizsgáltuk.

A saját tervezésű $m\alpha$ -SMA_{SD} primerrel végzett PCR-ek során az $m\alpha$ -SMA_T templátról megfelelő méretű és olvadáspontú PCR termék keletkezett, azonban $m\beta$ -actin_T, γ -cyto-actin_T és $m\gamma$ -smooth-actin_T oligonukleotidok nem sokszorozódtak fel. Hasonlóképp, a $m\beta$ -

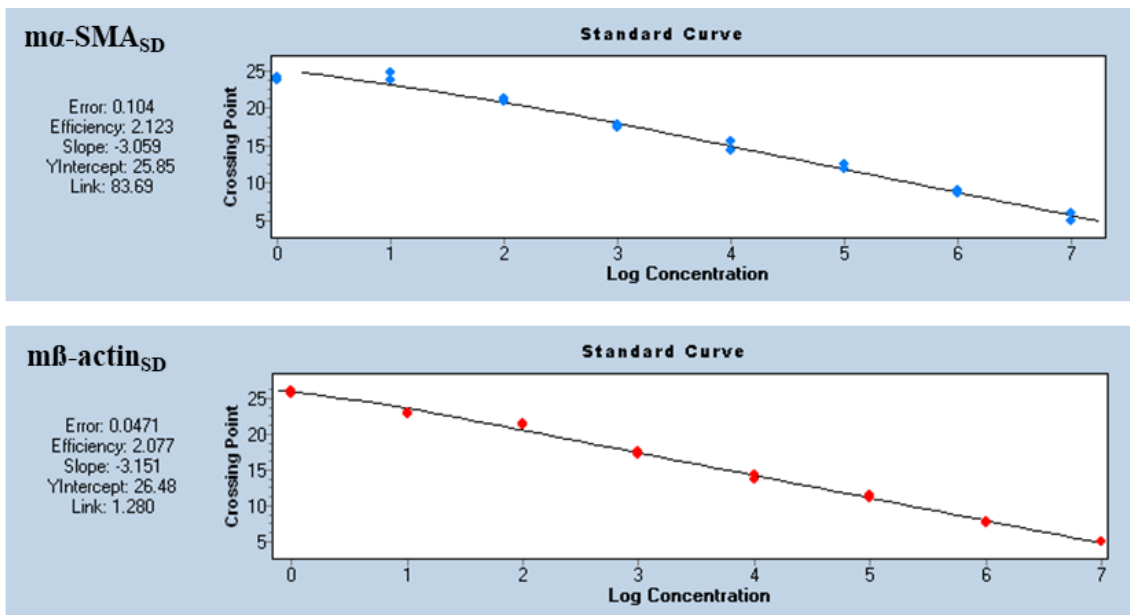
actins_{SD} primerrel végzett PCR-ek során a m β -actin_T illetve a γ -cyto-actin_T DNS templátok felsokszorozódtak, míg a m α -SMA_T és m γ -smooth-actin_T DNS-ek nem (6. ábra).



6. ábra. Saját tervezésű m α -SMA_{SD} és m β -actin_{SD} primerek templát-specifitása. A PCR-ek során m α -SMA_{SD} primer kizárólag a m α -SMA_T mesterséges DNS templátot sokszorozta fel, a termék melynek olvadáspontja 83,4 °C, mérete a várt 105 bp-nak megfelelő. A m β -actin_{SD} primer m β -actin_T és m γ -cyto-actin_T DNS templáttal eredményezett termékeket a PCR-ek során, melyek olvadáspontja 84,8 °C, illetve 83,3 °C, méretük a várt 106 bp-nak megfelelő.

4.1.2. Saját tervezésű egér α -SMA és β -aktin primerek PCR hatásfoka

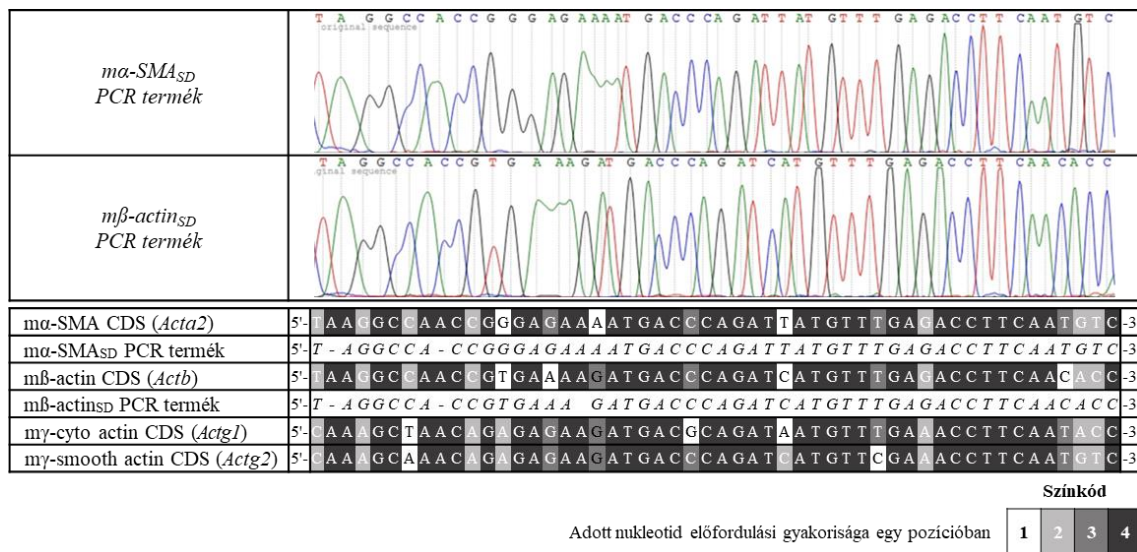
A α -SMA_{SD} és β -actin_{SD} primerek PCR reakciónak hatásfokát α -SMA_T, illetve β -actin_T templátok 7-tagú, 10-es alapú hígítási sora (10 nM - 1 fM) segítségével határoztuk meg. A reakciók áttörési ciklusszámai által adott (C_p) kalibrációs görbemeredekségéből számolt amplifikációs hatékonysága α -SMA_{SD} esetén 2,123, β -actin_{SD} esetén 2,077 értéket eredményezett (7. ábra).



7. ábra. α -SMA_{SD} és β -actin_{SD} primerek PCR reakcióinak hatásfoka. A reakciók amplifikációs hatékonyságát az adott primerhez tartozó α -SMA_T, illetve β -actin_T mesterséges oligonukleotid templátok 7-tagú, 10-es alapú hígítási sora (10 nM - 1 fM) segítségével határoztuk meg.

4.1.3. Saját tervezésű egér α -SMA és β -aktin primerek specificitásának ellenőrzése

Az egér α -SMA és β -aktin primerek specificitását Sanger-szekvenálással ellenőriztük. A PCR reakcióban UUO-n átesett egér veseszövetéből készült DNS-t használtunk templátként. A $m\alpha$ -SMA_{SD} és $m\beta$ -actin_{SD} primerek adta PCR termékek szekvenciája tökéletes egyezést mutatott az α -SMA (*Acta2*, NM_007392.3) illetve β -aktin (*Actb*, NM_007393.5) gének referencia nukleotid szekvenciáival (8. ábra).



8. ábra. Saját tervezésű $m\alpha$ -SMA_{SD} és $m\beta$ -actin_{SD} primerek PCR termékeinek szekvenciája. A $m\alpha$ -SMA_{SD} és $m\beta$ -actin_{SD} primerekkel PCR reakciót végeztünk, UUO-n átesett egerek veseszövetéből készült DNS mintát használva templátként. A PCR termékek Sanger-szekvenálása során kapott szekvenciáinak megfelelőségét az *Acta2*, *Actb*, *Actg1* és *Actg2* gének kódoló szakaszaira (CDS) illetve ellenőriztük.

4.1.4. Irodalmi forrásból származó egér α -SMA és β -aktin primerek templát-specifitása

Az irodalmi α -SMA ($m\alpha$ -SMA_{L1}, $m\alpha$ -SMA_{L2}, $m\alpha$ -SMA_{L3}) és β -aktin ($m\beta$ -actin_{L1}, $m\beta$ -actin_{L2}, $m\beta$ -actin_{L3}) primerek anellációs szakaszait vizsgálva nagymértékű átfedést tapasztaltunk az aktin-izoformák szekvenciái között az adott szakaszon (9. ábra). Átlagos báziseltérések száma 3 ± 2 bázis/primer (medián).

$m\alpha$ -SMA _{L1}	
α -SMA CDS (<i>Acta2</i>)	5'-T C A C C A T T G G A A A C G A A C G C T ... C T T C C A G C C A T C T T T C A T T G G G -3'
β -actin CDS (<i>Actb</i>)	5'-T C A C T A T T G G C A A C G A G C G G T ... T T T C C A G C C T T C C T T C T T G G G T -3'
γ -cytoactin CDS (<i>Actg1</i>)	5'-T C A C C A T T G G C A A T G A G C G G T ... C T T C C A G C C T T C C T T C C T G G G C -3'
γ -smooth actin CDS (<i>Actg2</i>)	5'-T C A C T A T T G G C A A C G A G C G G T ... C T T C C A G C C T T C C T T C A T T G G C -3'
$m\alpha$ -SMA _{L2}	
α -SMA CDS (<i>Acta2</i>)	5'-C G T C C E A G A C A T C A G G G A G T A A T ... A T C C T G A C G C T G A A G T A T C C G A T -3'
β -actin CDS (<i>Actb</i>)	5'-C G C C C T A G G C A C C A G G G T G T G A T ... A T C C T G A C C C T G A A G T A C C C A T -3'
γ -cytoactin CDS (<i>Actg1</i>)	5'-C G G C C C C G A C A C C A G G G C G T C A T ... A T C C T G A C C C T G A A G T A C C C T A T -3'
γ -smooth actin CDS (<i>Actg2</i>)	5'-C G G C C T A G A C A T C A G G G T G T G A T ... A T C C T A A C T C T C A A G T A C C C T A T -3'
$m\alpha$ -SMA _{L3}	
α -SMA CDS (<i>Acta2</i>)	5'-A G A G G C A C C A C T G A A C C C T A A G ... T T G T G C T G G A C T C T G G A G A T G G -3'
β -actin CDS (<i>Actb</i>)	5'-C G A G G C C C C C T G A A C C C T A A G ... T T G T G A T G G A C T C C G G A G A C G G -3'
γ -cytoactin CDS (<i>Actg1</i>)	5'-C G A G G C C C C C T G A A C C C C A A A ... T T G T C A T G G A C T C T G G T G A C G G -3'
γ -smooth actin CDS (<i>Actg2</i>)	5'-A G A G G C C C C C T A A A C C C C A A A ... T C G T T C T G G A T T C G G G G E A T G G -3'
$m\beta$ -actin _{L1}	
α -SMA CDS (<i>Acta2</i>)	5'-G G G C T G T T T T C C C A T T C C A T C G T ... A A C A G G C A T C A T C A C C A A C T G G G -3'
β -actin CDS (<i>Actb</i>)	5'-G G G C T G T A T T C C C C T T C C A T C G T ... A A C A G G C A T T G T T A C C A A C T G G G -3'
γ -cytoactin CDS (<i>Actg1</i>)	5'-G G G C C G T G T T C C C T T C C A T C G T ... A A C A G G C A T T G T C A C T A A C T G G G -3'
γ -smooth actin CDS (<i>Actg2</i>)	5'-G G G C T G T C T T C C C C T T C C A T T G T ... A A C A T G G C A T C A T C A C C A A C T G G G -3'
$m\beta$ -actin _{L2}	
α -SMA CDS (<i>Acta2</i>)	5'-T C A T C A C C A A C T G G G A C G A C A T ... G T T T G A G A C C T T C A A T G T C C C C -3'
β -actin CDS (<i>Actb</i>)	5'-T G T T A C C A A C T G G G A C G A C A T ... G T T T G A G A C C T T C A A C A C C C C A -3'
γ -cytoactin CDS (<i>Actg1</i>)	5'-T T G T C A C T A A C T G G G A C G A C A T ... G T T T G A A A A C C T T C A A T A C C C C A -3'
γ -smooth actin CDS (<i>Actg2</i>)	5'-T C A T C A C C A A C T G G G A T G A C A T ... G T T C G A A A A C C T T C A A T G T C C C T -3'
$m\beta$ -actin _{L3}	
α -SMA CDS (<i>Acta2</i>)	5'-C G C C A T G T A T G T G C T A T T C A ... C T T C G T G A C T A C T G C C G A G C G T -3'
β -actin CDS (<i>Actb</i>)	5'-C G C C A T G T A C G T A G C C A T C C A ... C T T C A C C A C C A C A G C T G A G A G C -3'
γ -cytoactin CDS (<i>Actg1</i>)	5'-C A G C C A T G T A C G T G C C A T T C A ... C T T C A C C A C C A C T G C T G A G A G C -3'
γ -smooth actin CDS (<i>Actg2</i>)	5'-C T G C C A T G T A T G T G C T A T T C A ... C T T T G T G A C C A C A G C T G A G A G A -3'

Szinkód

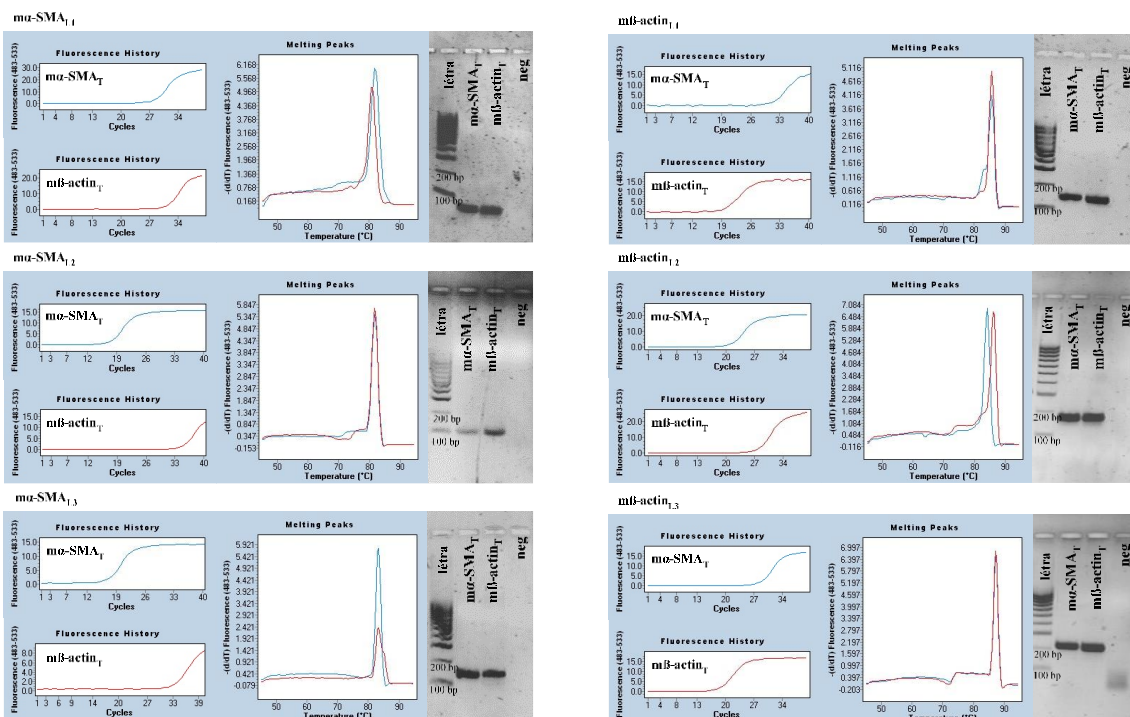
Adott nukleotid előfordulási gyakorisága egy pozícióban

1	2	3	4
---	---	---	---

9. ábra. Hőtérkép a különböző egér aktin izoformákat kódoló szekvenciák (CDS) közti homológiáról az irodalmi forrásból származó egér α -SMA és β -aktin primerek

bekötődési szakaszán. Egymásra illesztve az *Acta2*, *Actb*, *Actg1*, *Actg2* szekvenciákat, minden nukleotidot 1-től 4-ig pontoztunk aszerint, hogy az adott pozícióban hány izoforma esetén fordul elő. Az anellációs pozíciókban a α -SMA_{L1}, α -SMA_{L2}, α -SMA_{L3}, illetve β -actin_{L1}, β -actin_{L2}, β -actin_{L3} irodalmi primereknek az *Acta2* és *Actb* szekvenciákkal közös nukleotid egyezéseit piros négyzettel jelöltük.

A primerek specificitását, egér *Acta2* és *Actb* génfragmensek szekvenciáinak megfelelő mesterséges DNS templátok (α -SMA_T, illetve β -actin_T) használatával végzett PCR reakciókkal vizsgáltuk. Az általunk vizsgált irodalmi primerek esetén bár különböző mértékű, de minden esetben jól megfigyelhető keresztreakciót tapasztaltunk a nem-specifikus DNS templátokkal végzett reakciók során is. Az α -SMA_{L1}, α -SMA_{L2}, α -SMA_{L3} primerek nem csak a névleges target oligonukleotidot, az α -SMA_T templátot sokszorozták fel, hanem a β -actin_T-t is. Hasonlóképp, az β -actin_{L1}, β -actin_{L2}, β -actin_{L3} primerek PCR terméket képeztek a β -actin_T mellett a α -SMA_T DNS templáttal is (10. ábra).



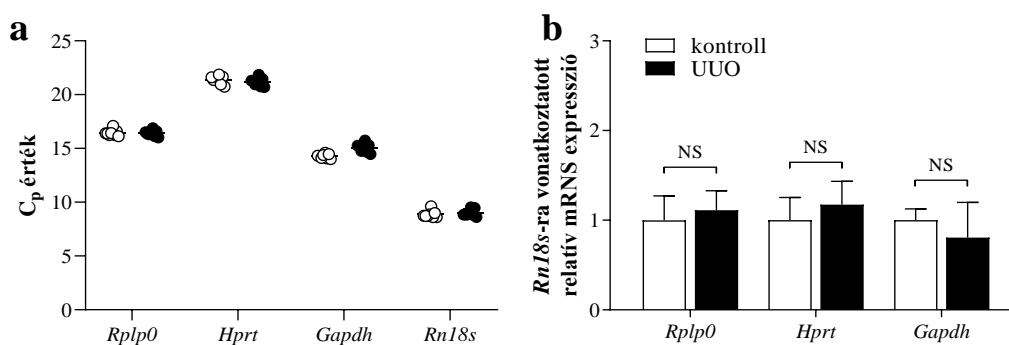
10. ábra. Irodalmi forrásból származó egér α -SMA és β -actin primerek templát-specifitása. Az alkalmazott α -SMA_{L1}, α -SMA_{L2} és α -SMA_{L3} primerek a PCR-ek során a α -SMA_T DNS templát felsokszorozódását eredményezték, a termékek

olvadáspontja és mérete 82 °C – 60 pb, 81,9 °C – 101 bp, illetve 83,3 °C – 154 bp, valamint felszorzották a nem specifikus m β -actin_T templátot is, 81 °C – kb. 60 pb, 81,9 °C – kb. 101 bp, illetve 83,3 °C – kb. 154 bp terméktulajdonságokkal. A m β -actin_{L1}, m β -actin_{L2} és m β -actin_{L3} primerek m β -actin_T DNS templátokkal PCR termékeket eredményeztek, melyek olvadáspontja és mérete 85,6 °C – 154 pb, 86,3 °C – 165 bp, illetve 87,4 °C – 228 bp, valamint felszorzották a nem specifikus m α -SMA_T templátot is, 85,6 °C – 154 pb, 84,2 °C – 165 bp, illetve 87,4 °C – 228 bp terméktulajdonságokkal.

4.1.5. α -SMA és β -aktin expresszió mértéke UUO-n átesett egerek veseszövetében

Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk, milyen hatással lehetnek kísérleti eredményeinkre a különböző egér α -SMA és β -aktin primerek mesterséges templát-specifitásaiban tapasztalt eltérései, kontroll, illetve UUO-n átesett egerek veseszövetéből készült DNS mintákon végeztünk valós idejű PCR méréseket.

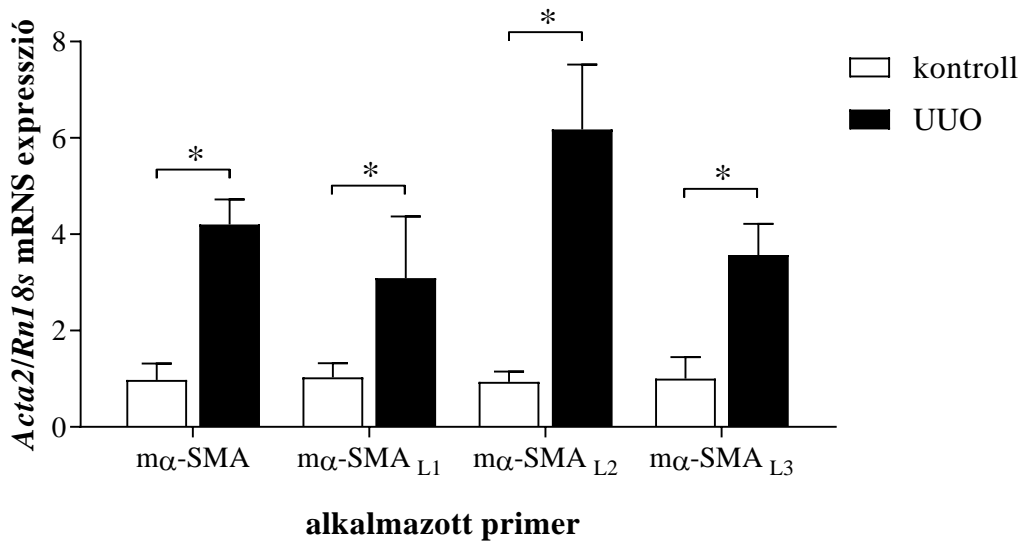
Mintáinkon elsőként a leggyakrabban alkalmazott referenciagének (*Rn18s*, *Rplp0*, *Hprt*, *Gapdh*) expresszióit határoztuk meg. Méréseink alapján a mintapopulációinkban az *Rn18s* mutatta a legstabilabb expressziót, illetve legalacsonyabb szórást (11. ábra/a), így a további mérések esetén a különböző gének értékeit *Rn18s*-re vonatkoztatott relatív expresszióként ábrázoltuk. A kontroll és UUO-s mintákban az *Rplp0*, *Hprt* és *Gapdh* relatív expressziója egyenlőnek bizonyult, nem találtunk szignifikáns eltérést a csoportok között (11. ábra/b).



11. ábra. Gyakran használt referenciagének mRNS expressziója kontroll és UUO-n átesett egerek veseszövetében. Az *Rplp0*, *Hprt*, *Gapdh* és *Rn18s* expresszióját valós idejű PCR-rel határoztuk meg. Az értékeket az áttörési ciklusszámok (C_p) (a), illetve az *Rn18s* hányadosaként (b) ábrázoltuk, a kontroll csoport átlagértékére normalizálva. Az

oszlopdiaagramon átlag + szórás adatok láthatóak (n=6-7/csoport). NS: nincs szignifikáns eltérés kontroll vs. UUO (t-próba)

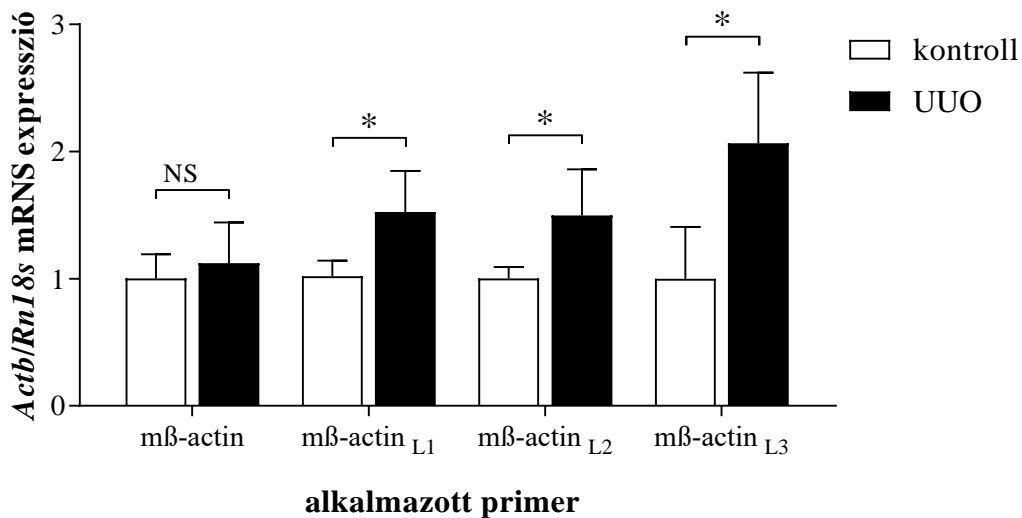
Az egér veseszövet *Acta2* mRNS expressziója fokozódott UUO hatására. A változás mértéke 3,1-6,2-szeres érték között mozgott, attól függően, hogy az általunk tervezett $m\alpha$ -SMA_{SD}, vagy az irodalomban használt $m\alpha$ -SMA_{L1}, $m\alpha$ -SMA_{L2} vagy $m\alpha$ -SMA_{L3} primerrel történt a mérés (12. ábra).



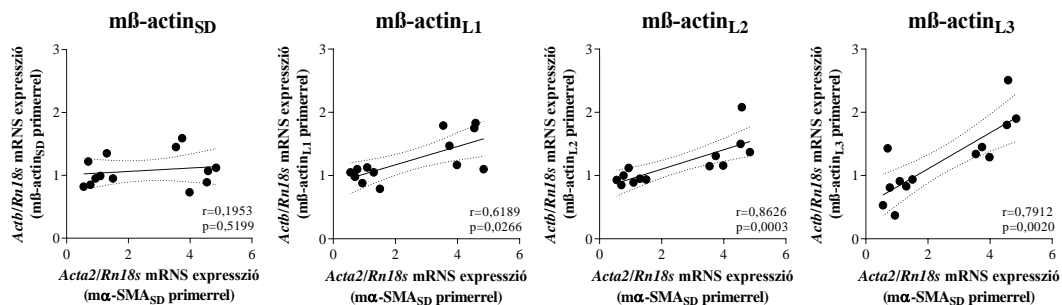
12. ábra. *Acta2* mRNS expressziója kontroll és UUO-n átesett egerek veseszövetében. Az *Acta2* expresszióját valós idejű PCR-rel, saját tervezésű $m\alpha$ -SMA_{SD}, illetve irodalmi forrásból származó $m\alpha$ -SMA_{L1}, $m\alpha$ -SMA_{L2} és $m\alpha$ -SMA_{L3} primerekkel határoztuk meg. Az értékeket *Rn18s* hányadosaként ábrázoltuk, a kontroll csoport átlagértékére normalizálva. Az oszlopdiaagramon átlag + szórás adatok láthatóak (n=6-7/csoport). *p<0,05 kontroll vs. UUO (t-próba)

Hasonló markáns különbséget tapasztaltunk az *Actb* expresszió meghatározása esetén. Míg a saját tervezésű, $m\beta$ -actin_{SD} primer esetén - hasonlóan a többi referenciagénhez, nem tapasztaltunk eltérést a kontroll és UUO csoportok relatív expressziós értékei közt, addig az irodalmi forrásból származó $m\beta$ -actin_{L1}, $m\beta$ -actin_{L2}, $m\beta$ -actin_{L3} primerekkel történt mérés alapján UUO hatására fokozódott a veseszövet *Actb* mRNS mennyisége

(13. ábra). A korrelációs vizsgálatok közepes, illetve szoros pozitív összefüggést mutattak az irodalmi β -aktin primerekkel meghatározott *Actb* és a $m\alpha$ -SMA_{SD} primerrel meghatározott relatív *Acta2* mRNS expressziók között (14. ábra), tehát minél magasabb egy minta *Acta2* mRNS expressziója, annál magasabb *Actb* expressziót mutatnak az irodalmi primerekkel végzett PCR mérések.



13. ábra. *Actb* mRNS expressziója kontroll és UUO-n átesett egerek veseszövetében. Az *Actb* expresszióját valós idejű PCR-rel, saját tervezésű $m\beta$ -actin_{SD}, illetve irodalmi forrásból származó $m\beta$ -actin_{L1}, $m\beta$ -actin_{L2} és $m\beta$ -actin_{L3} primerekkel határoztuk meg. Az értékeket *Rn18s* hányadosaként ábráztuk, a kontroll csoport átlagértékére normalizálva. Az oszlopdiagramon átlag + szórás adatok láthatóak (n=6-7/csoport). NS: nincs szignifikáns eltérés (t-próba); *p<0,05 kontroll vs. UUO (t-próba)

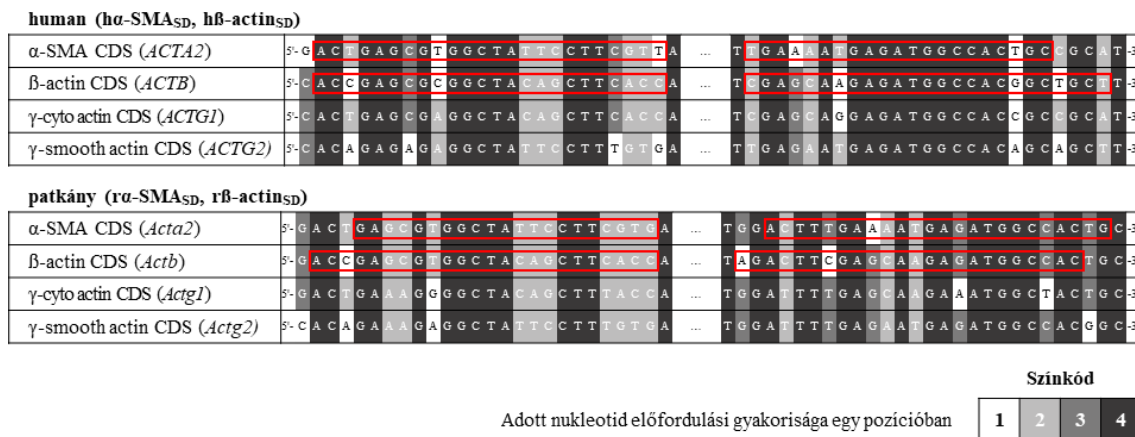


14. ábra. Összefüggés a különböző primerekkel meghatározott *Actb* és *Acta2* mRNS expressziója közt. Az individuális minták saját tervezésű $m\beta$ -actin_{SD}, illetve az irodalmi forrásból származó $m\beta$ -actin_{L1}, $m\beta$ -actin_{L2} és $m\beta$ -actin_{L3} primerekkel meghatározott *Actb*

expressziók (13. ábra) a saját tervezésű α -SMA_{SD} primerrel kapott *Acta2* expresszióval (14. ábra) való korrelációját Spearman módszerrel vizsgáltuk. r: korrelációs koefficiens

4.1.6. Saját tervezésű human és patkány α -SMA és β -aktin primerek templát-specifitása

A human és patkány α -SMA és β -aktin primerek tervezésekor az egér primerekhez hasonlóképp jártunk el. A forward primerek anellációs pozícióit úgy terveztük, hogy az adott szekvencia szakasz a különböző aktin izoformák kapcsán a lehető legtöbb bázis eltérést tartalmazza, különösen a primerek 3' végén (15. ábra).

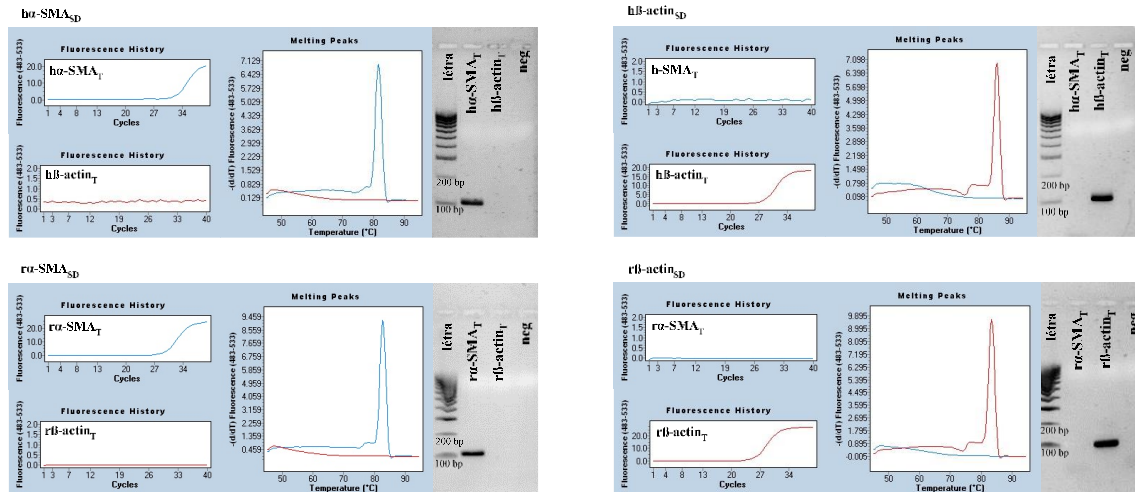


15. ábra. Hőtérkép a különböző aktin izoformákat kódoló szekvenciák (CDS) közti homológiáról a saját tervezésű human és patkány α -SMA és β -actin primerek bekötődési szakaszán. Egymásra illesztve a human *ACTA2*, *ACTB*, *ACTG1*, *ACTG2*, illetve a patkány *Acta2*, *Actb*, *Actg1*, *Actg2* szekvenciákat, minden nukleotidot 1-től 4-ig pontosítottunk aszerint, hogy az adott pozícióban hány izoforma esetén fordul elő. A saját tervezésű $h\alpha$ -SMA_{SD}, $h\beta$ -actin_{SD} és $r\alpha$ -SMA_{SD}, $r\beta$ -actin_{SD} primerek anellációs pozícióit piros négyzettel jelöltük.

A primerek specificitását human, illetve patkány *Acta2* és *Actb* génfragmensek szekvenciáinak megfelelő ($h\alpha$ -SMA_T, $r\alpha$ -SMA_T, $h\beta$ -actin_T, $r\beta$ -actin_T) DNS templátok használatával végzett PCR reakciókkal vizsgáltuk.

A PCR-ek során a saját tervezésű $h\alpha$ -SMA_{SD} primer a $h\alpha$ -SMA_T, a $r\alpha$ -SMA_{SD} primer a $r\alpha$ -SMA_T, a $h\beta$ -actin_{SD} primer a $h\beta$ -actin_T, a $r\beta$ -actin_{SD} primer pedig a $r\beta$ -actin_T templáttal eredményezett megfelelő méretű és olvadáspontú terméket. A vizsgált

primerek egyikének alkalmazása sem vezetett nem-specifikus aktin izoformák DNS templátjának amplifikációjához (16. ábra).



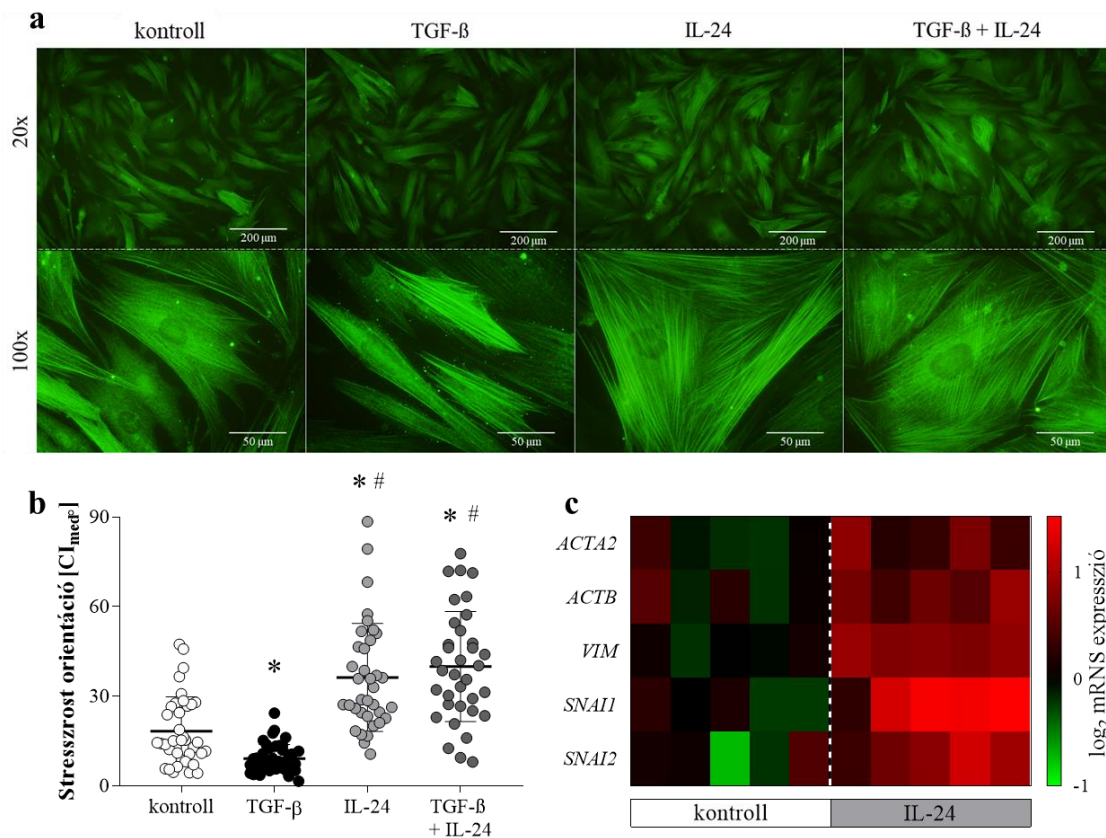
16. ábra. Saját tervezésű human és patkány α -SMA és β -actin primerek templát-specifitása. A PCR-ek során a $h\alpha$ -SMA_{SD} primer kizárólag a $h\alpha$ -SMA_T templáttal eredményezett terméket, melynek olvadáspontja 81,7 °C, mérete a várt 111 bp-nak megfelelő. A $h\beta$ -actin_{SD} primer kizárólag a $h\beta$ -actin_T templáttal eredményezett PCR terméket, melynek olvadáspontja 86 °C, mérete a várt 114 bp-nak megfelelő. A $r\alpha$ -SMA_{SD} primer kizárólag a $r\alpha$ -SMA_T templáttal eredményezett PCR terméket, melynek olvadáspontja 82,8 °C, mérete a várt 106 bp-nak megfelelő. A $r\beta$ -actin_{SD} primer kizárólag a $r\beta$ -actin_T templáttal eredményezett PCR terméket, melynek olvadáspontja 83,4 °C, mérete a várt 106 bp-nak megfelelő.

4.2. IL-24 szerepe a szöveti átépülésben

4.2.1. IL-24 kezelés hatása pdMF sejtek stresszrostorientációjára

Az IL-24 sejtalakra alakjára gyakorolt hatását fluoreszcens mikroszkóp segítségével vizsgáltuk kezeletlen, illetve TGF- β kezelés által aktivált pdMF sejteken. A kezeletlen, sejtek hosszúkas, elnyúlt alakkal, illetve párhuzamos stresszrosthálózattal rendelkeztek, mely jellemzők TGF- β kezelés hatására tovább fokozódtak. IL-24 kezelés hatására azonban a sejtek lepedőszerű alakot vettek fel, a stresszrostok rendezettsége megszűnt, nőtt a stresszrostok sejt tengelyével bezárt szögének eloszlása (17. ábra/a, b).

Génexpressziós vizsgálataink alapján IL-24 kezelés hatására fokozódott a sejtek *ACTA2*, *ACTB*, *VIM*, *SNAI1* és *SNAI2* mRNS expressziója (17. ábra/c).



17. ábra. Az IL-24 hatása a duodenális fibroblasztok sejtalakjára. A pdMF sejtek α -SMA (zöld) stresszrostjait immunfluoreszcens festéssel, mikroszkóp segítségével vizualizáltuk a különböző kezeléseket követően (a). Az individuális sejteken belüli stresszrostok orientációját grafikai analízissel határoztuk meg (b), a rostok sejt

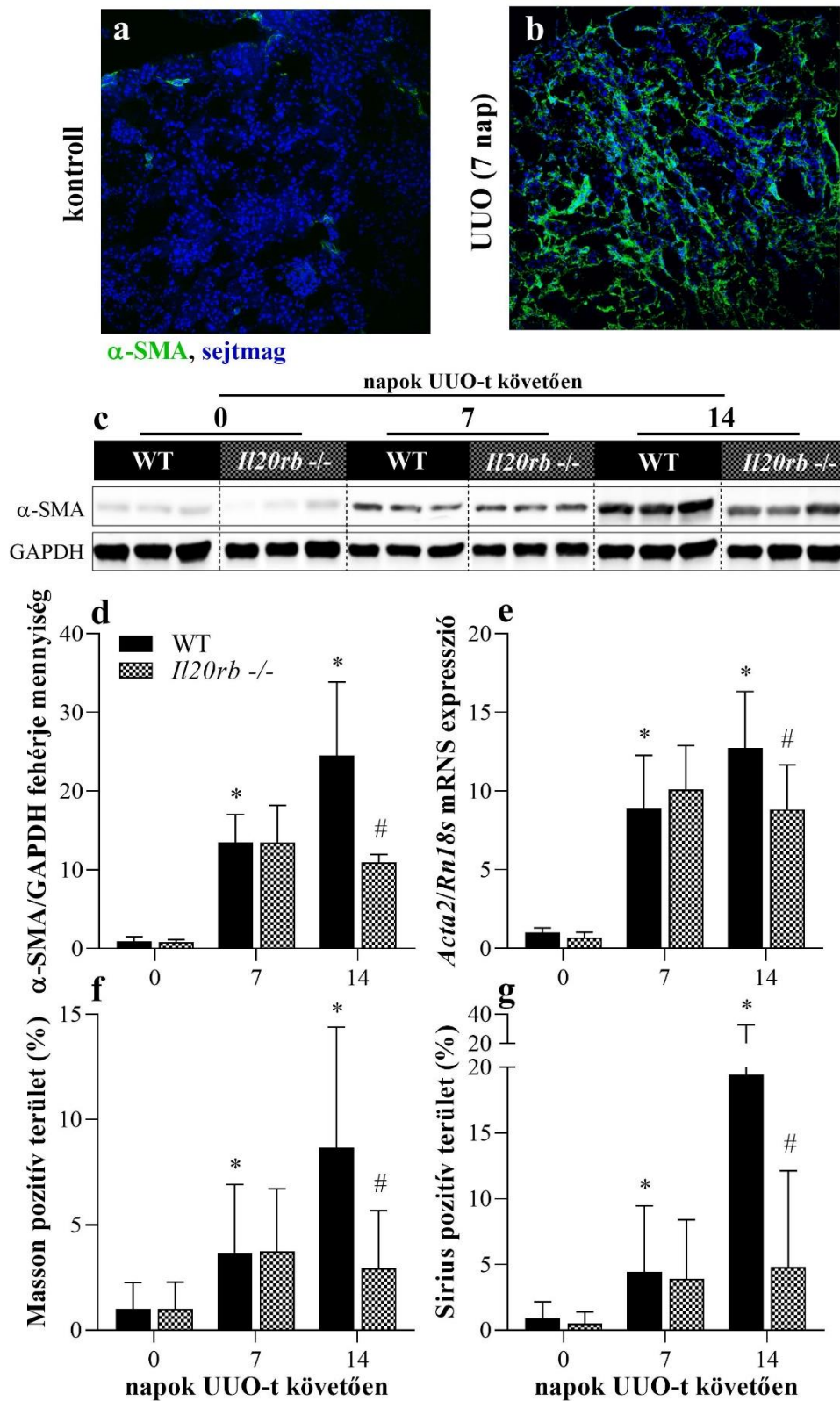
hosszanti tengelyével bezárt szögét azok 95%-os konfidenciaintervallumával (CI_{med}°) jellemezve ábrázoltuk (n=35-40/csoport). A pontok az egyes sejtek értékeit szimbolizálják, míg a függőleges vonalak az adott kezelési csoport átlag + szórás adatait mutatják. A génexpressziós vizsgálatokat valós idejű PCR segítségével végeztük el. A hőterképen (c) a vizsgált gének relatív mRNS expresszió változásainak mértékét logaritmikus skálán ábrázoltuk. A piros szín a kontroll csoport átlagához képest az emelkedést, a zöld szín a csökkenést jelzi. * $p < 0,05$ vs. kontroll (Kruskal-Wallis teszt); # $p < 0,05$ vs. TGF- β (Kruskal-Wallis teszt)

4.2.2. α -SMA akkumuláció WT és *Il20rb* $-/-$ állatok veséjében UUO-t követően

Az α -SMA renális lokalizációját fluoreszcens mikroszkóp segítségével vizsgáltuk. Az egészséges egerek veseszövetében alacsony α -SMA immunopozitivitást detektálunk, mely a vese erek simaizomsejteinek felelnek meg (18. ábra/a). Az UUO-n átesett egerek metszete ezzel szemben erős pozitivitást mutatott, különösen a tubulointersticiális területeken (18. ábra/b).

A vese α -SMA fehérje mennyiségét Western blot módszerrel határoztuk meg WT és *Il20rb* $-/-$ állatokban. Az egészséges állatok veseszövetében közel detektálhatatlan α -SMA mennyisége UUO hatására nagymértékben fokozódott (18. ábra/c,d). Hasonlóképp, génexpressziós vizsgálataink alapján az *Acta2* mRNS expressziója többszörösére emelkedett a 7, illetve 14 napos UUO-s csoportokban (18. ábra/e). Mind a fehérje, mind az mRNS szintű méréseink alapján az *Il20rb* $-/-$ állatokban méréseltek volt az α -SMA akkumulációja a WT csoporthoz viszonyítva a 14 napos mintákban.

A veseszövet hegesedését Masson trikróm, illetve SiriusRed szövettani festéseket követően, grafikai analízissel határoztuk meg. Mindkét eljárás alapján látható, hogy (hasonlóan az SMA-hoz) UUO hatására fokozódott a fibrózissal érintett terület aránya (18. ábra/f, g). A 14 napos mintákban az *Il20rb* $-/-$ állatokban a WT egerekben tapasztaltakhoz képest a heges terület kiterjedése kisebb volt.



18. ábra. α -SMA akkumulációja WT és *Il20rb*^{-/-} állatok veséjében UUO-t követően. Az α -SMA-pozitív fibroblasztok megjelenését immunfluoreszcens festést követően

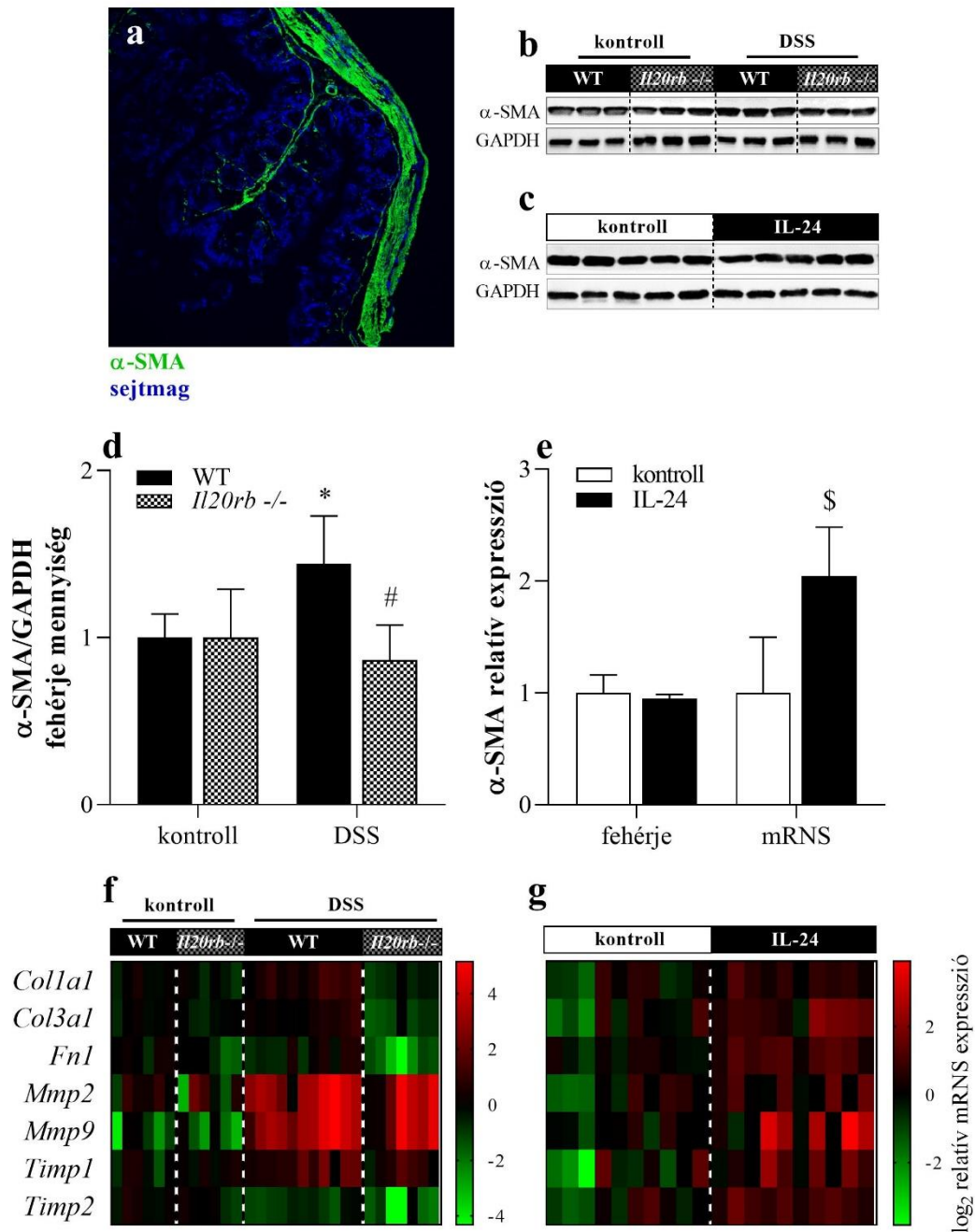
(zöld), fluoreszcens mikroszkóp segítségével vizualizáltuk kontroll (a), illetve unilaterális uréter obstrukción (UUO) átesett (b) egerek vesemetszetén. A sejtmagokat DAPI festéssel (kék) tettük láthatóvá. Az IL-24 vese szöveti átrendeződésére gyakorolt hatását vad típusú (WT), illetve IL-24 receptorának egyik alegységét nem expresszáló, génkiütött (*Il20rb* *-/-*) állatokon 7, illetve 14 napos UUO-t követően vizsgáltuk. A veseszövet α -SMA fehérje mennyiségét (c, d) Western blot segítségével, az *Acta2* mRNS expresszióját (e) valós idejű PCR módszerrel határoztuk meg. A relatív értékeket a GAPDH fehérje, illetve *Rn18s* mRNS referenciák hányadosaként ábrázoltuk, a WT 0 csoport átlagértékére normalizálva. A veseszövet hegesedéssel érintett területének arányát grafikai analízissel határoztuk meg Masson (f), illetve SiriusRed (g) szövettani festéseket követően. A diagramokon átlag + szórás adatok láthatóak (n=6-8/csoport). *p<0,05 vs. WT 0 nap (két-szemponos ANOVA); #p<0,05 WT vs. *Il20rb* *-/-* az adott napon (Mann-Whitney U-teszt)

4.2.3. α -SMA akkumuláció WT és *Il20rb* *-/-* állatok vastagbelében DSS kezelést követően, illetve WT állatokban lokális IL-24 kezelést követően

Az α -SMA intesztinális lokalizációját fluoreszcens mikroszkóp segítségével vizsgáltuk. Az egészséges egerek vastagbél szövetében magas α -SMA immunopozitivitást detektáltunk, mely jelet elsősorban a muscularis externa hosszanti és körkörös izomrostjai, a muscularis mucosae és a szubepitélialis miofibroblasztok eredményezik (19. ábra/a).

Az α -SMA fehérje mennyiségét Western blot módszerrel határoztuk meg WT és *Il20rb* *-/-* állatokban. Bár az egészséges állatok bélszövet homogenizátumában magas α -SMA alapjelet detektáltunk, WT állatok DSS kezelését követően emelkedett a mennyisége, míg *Il20rb* *-/-* állatokban nem változott (19. ábra/b, d). WT egerek vastagbelének lokális, rekombináns IL-24 injekcióval történő kezelése hatására az α -SMA fehérjemennyiségét vizsgálva nem tapasztaltunk változást, azonban az *Acta2* mRNS expressziója kétszeresére emelkedett a kontroll csoporthoz viszonyítva (19. ábra/c, e).

További méréseink alapján az egerek DSS-sel történő kezelése (19. ábra/f), illetve a lokális IL-24 injekció (19. ábra/g) fokozta a fibrózis-asszociált gének mRNS expresszióját. A DSS-indukálta expresszió emelkedés mértéke az *Il20rb* *-/-* állatokban méréskeletbb volt a WT csoporthoz viszonyítva (19. ábra/f).



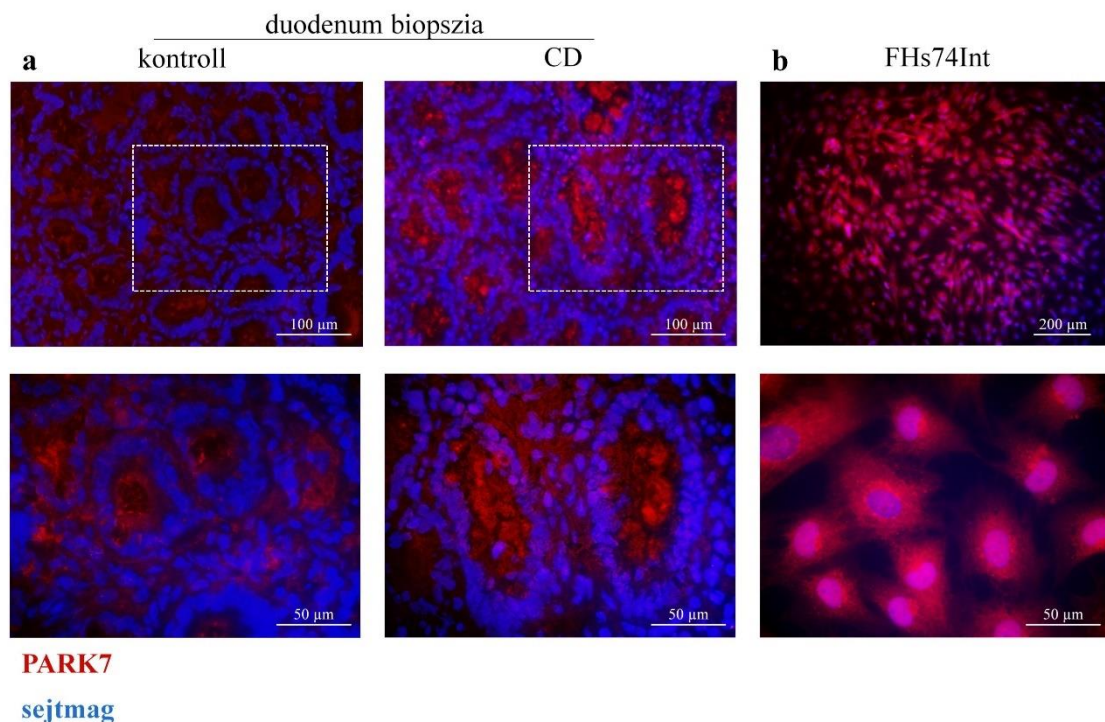
19. ábra. α -SMA akkumuláció WT és *Il20rb*^{-/-} állatok vastagbelében DSS kezelést követően, illetve WT állatokban lokális IL-24 kezelést követően. Az α -SMA lokalizációját immunfluoreszcens festést követően (zöld), fluoreszcens mikroszkóp segítségével vizualizáltuk kontroll egerek vastagbél metszetén (a). A sejtmagokat DAPI festéssel (kék) tettük láthatóvá. Az IL-24 avastagbél szöveti átrendeződésére gyakorolt hatását DSS kezelést követően (b, d, f) vad típusú (WT), illetve IL-24 receptorának egyik alegységét nem expresszáló, génkiütött (*Il20rb*^{-/-}) állatokon, illetve WT állatok

bélszövetének lokális, rekombináns IL-24 kezelését követően (c, e, g) vizsgáltuk. A bélszövet α -SMA fehérje mennyiségét (b-e) Western blot segítségével, az *Acta2* mRNS expresszióját (e) valós idejű PCR módszerrel határoztuk meg. A relatív értékeket a GAPDH fehérje, illetve *Rn18s* mRNS referenciák hányadosaként ábrázoltuk, a WT kontroll csoport átlagértékére normalizálva. A hőértképeken (f, g) a fibrózis asszociált gének relatív mRNS expresszió változásainak mértékét logaritmikus skála alapján ábrázoltuk. A piros szín a kontroll csoport átlagához képest az emelkedést, a zöld szín a csökkenést jelzi. A diagramokon átlag + szórás adatok láthatóak (n=6-8/csoport). *p<0,05 vs. WT kontroll; #p<0,05 vs. WT DSS; \$p<0,05 vs. kontroll (Mann-Whitney U-teszt)

4.3. PARK7 szerepe a bélmukóza oxidatív károsodásában cöliákia során

4.3.1. *PARK7 jelenléte duodenális epítél sejtekben*

A fluoreszcens mikroszkóppal készült képek alapján a bélhamban a kripták epítél sejtjei, illetve a lamina propria sejtjei expresszálják a PARK7 fehérjét. A beteg minták epítél sejtjeiben fokozott PARK7 jelenléte tapasztaltunk (20. ábra/a). Hasonlóképp, erőteljes PARK7 immunopozitivitást detektáltunk a duodenális eredetű, FHs74Int sejtvonalon is (20. ábra/b).

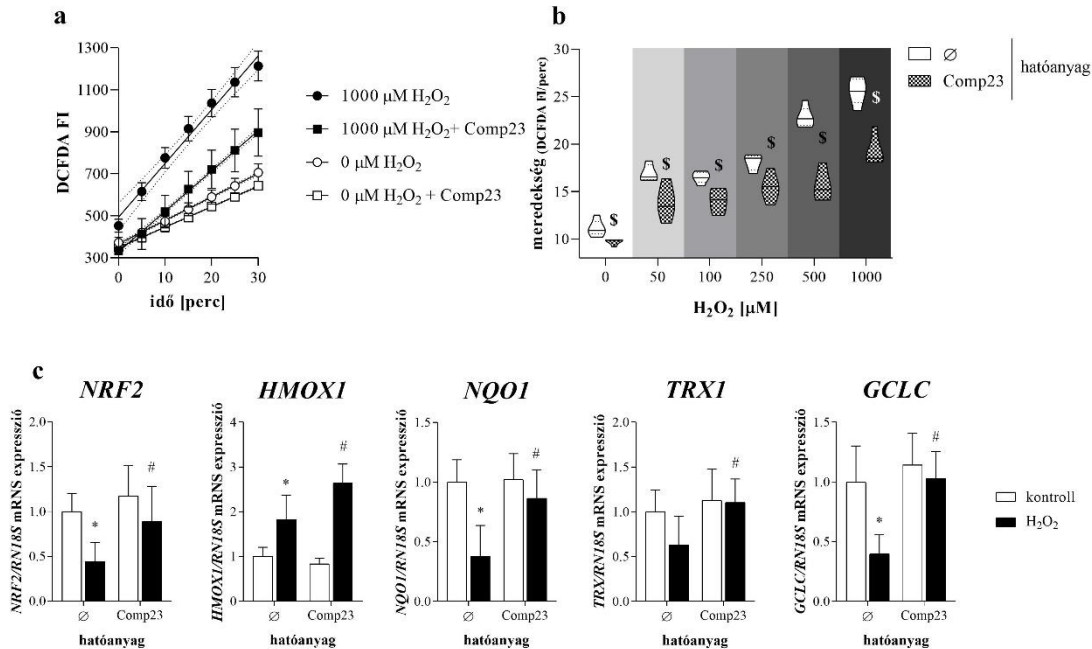


20. ábra. PARK7 jelenléte duodenális epítél sejtekben. A PARK7 (piros) lokalizációját immunfluoreszcens festés segítségével vizsgáltuk kontroll és cöliákiában szenvedő gyerekek (CD) vékonybél biopsziamintáin (a), illetve FHs74Int sejtekben (b). A sejtmagokat DAPI festéssel (kék) tettük láthatóvá.

4.3.2. *A Comp23 kezelés hatása az intracelluláris ROS akkumulációra*

A Comp23 hatóanyag intracelluláris ROS akkumulációra kifejtett hatását DCFDA, redox-szenzitív fluoreszcens festék alapú sejtes teszt segítségével vizsgáltuk. Az FHs74Int sejtek H₂O₂-dal történő expozíciója dózisdependens ROS akkumulációt eredményezett, melyet a Comp23 kezelés minden vizsgált koncentráció esetén csökkentett (21. ábra/a, b).

Génexpressziós vizsgálataink alapján H_2O_2 hatására csökkent a sejtek *NRF2*, *NQO1* és *GCLC*, illetve fokozódott a *HMOX1* mRNS expressziója, míg az oxidatív körülmények között a Comp23 kezelés fokozta az *NRF2*, *HMOX1*, *NQO1*, *TRX1* és *GCLC* mRNS expressziót (21. ábra/c).

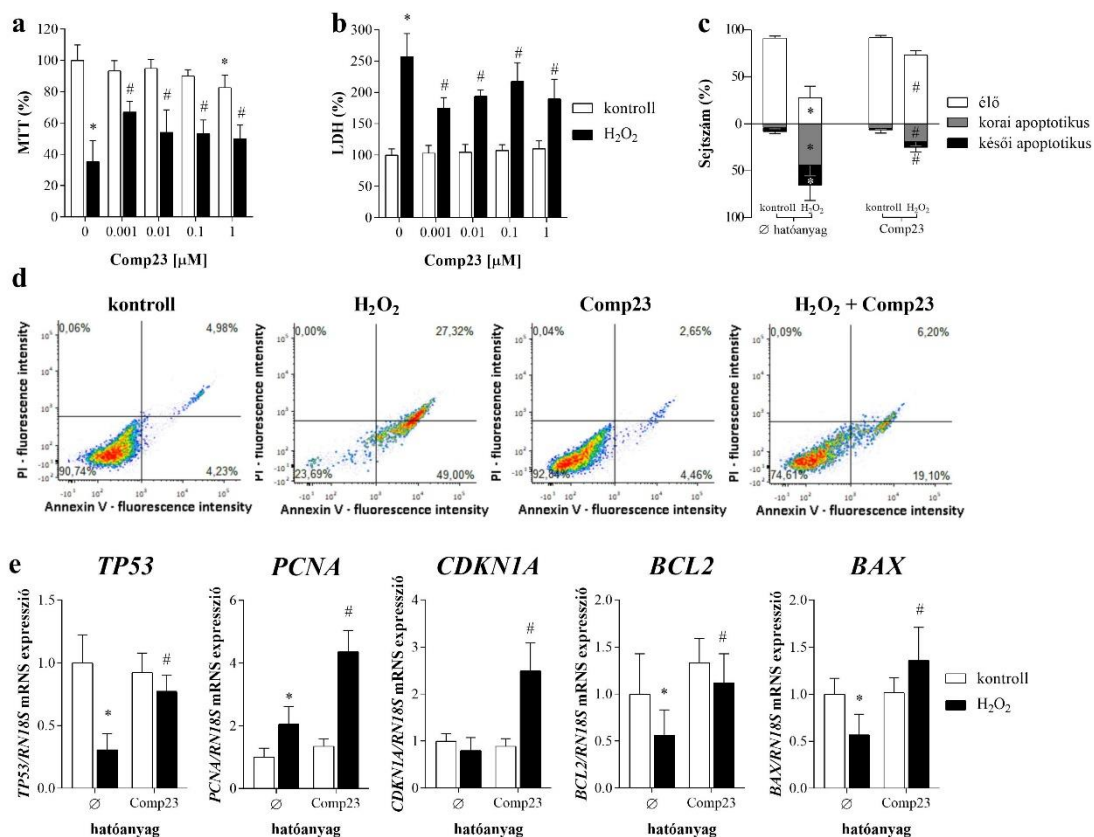


21. ábra. Comp23 hatása az FHs74Int sejtek ROS akkumulációjára. Az FHs74Int sejteket különböző koncentrációjú H_2O_2 -dal kezeltük Comp23 (0,001 μ M) hiányában, illetve jelenlétében. A reprezentatív pontdiagram (a) a DCFDA redox-szenzitív festékkel töltött sejtek fluoreszcenciaintenzitásának (FI) időbeli változását mutatja 1000 μ M-os H_2O_2 expozíciót követően Comp23 hiányában, illetve jelenlétében. A hegedű diagramon (b) a DCFDA FI időbeli változásából eredő görbe meredekségét ábrázoltuk a különböző koncentrációjú kezelési csoportokban. Az 1000 μ M-os H_2O_2 csoport kapcsán végzett génexpressziós vizsgálatokat valós idejű PCR segítségével végeztük el. Az értékeket *Rn18s* hányadosaként ábrázoltuk, a kontroll csoport átlagértékére normalizálva. A pont- és oszlopdiagramon átlag + szórás adatok láthatóak (n=5/csoport). \$p<0,05 vs. ∅ hatóanyag adott H_2O_2 koncentráció mellett (többszörös t-próba); *p<0,05 vs. kontroll + ∅ hatóanyag (Mann-Whitney U-teszt); #p<0,05 vs. H_2O_2 + ∅ hatóanyag (Mann-Whitney U-teszt)

4.3.3. A Comp23 kezelés hatása az oxidatív stressz indukálta sejthalálra

A Comp23 hatóanyag oxidatív stressz indukálta citotoxicitásra kifejtett hatását MTT sejtvitalitás, LDH citotoxicitás, illetve Annexin V apoptózis tesztek segítségével követtük nyomon. Az FHs74Int sejtek H₂O₂-dal történő expozíciója erőteljes sejthalált eredményezett, amelyre a csökkent MTT életképességi szignál (22. ábra/a), a felülúszóba kijutott LDH enzim fokozott aktivitása (22. ábra/b), valamint az Annexin V pozitív apoptotikus sejtek fokozott aránya (22. ábra/c, d) utal. A Comp23 kezelés csökkentette ezen változások mértékét, javította a sejtek oxidatív körülmények közti túlélését.

Génexpressziós vizsgálataink alapján H₂O₂ hatására csökkent a sejtek *TP53*, *BCL2* és *BAX*, illetve fokozódott a *PCNA* mRNS expressziója, míg a Comp23 kezelés fokozta a *TP53*, *PCNA*, *CDKN1A*, *BCL2* és *BAX* oxidatív körülmények közötti mRNS expresszióját (22. ábra/e).



22. ábra. Comp23 hatása az oxidatív stressz indukálta sejthalálra FHs74Int sejteken. Az FHs74Int sejteket különböző koncentrációjú Comp23 hatóanyaggal kezeltük H₂O₂ (1000 μM) hiányában vagy jelenlétében, majd a sejtek életképességét MTT teszt (a), a sejthalál mértékét a LDH teszt (b), az apoptotikus sejtek arányát Annexin

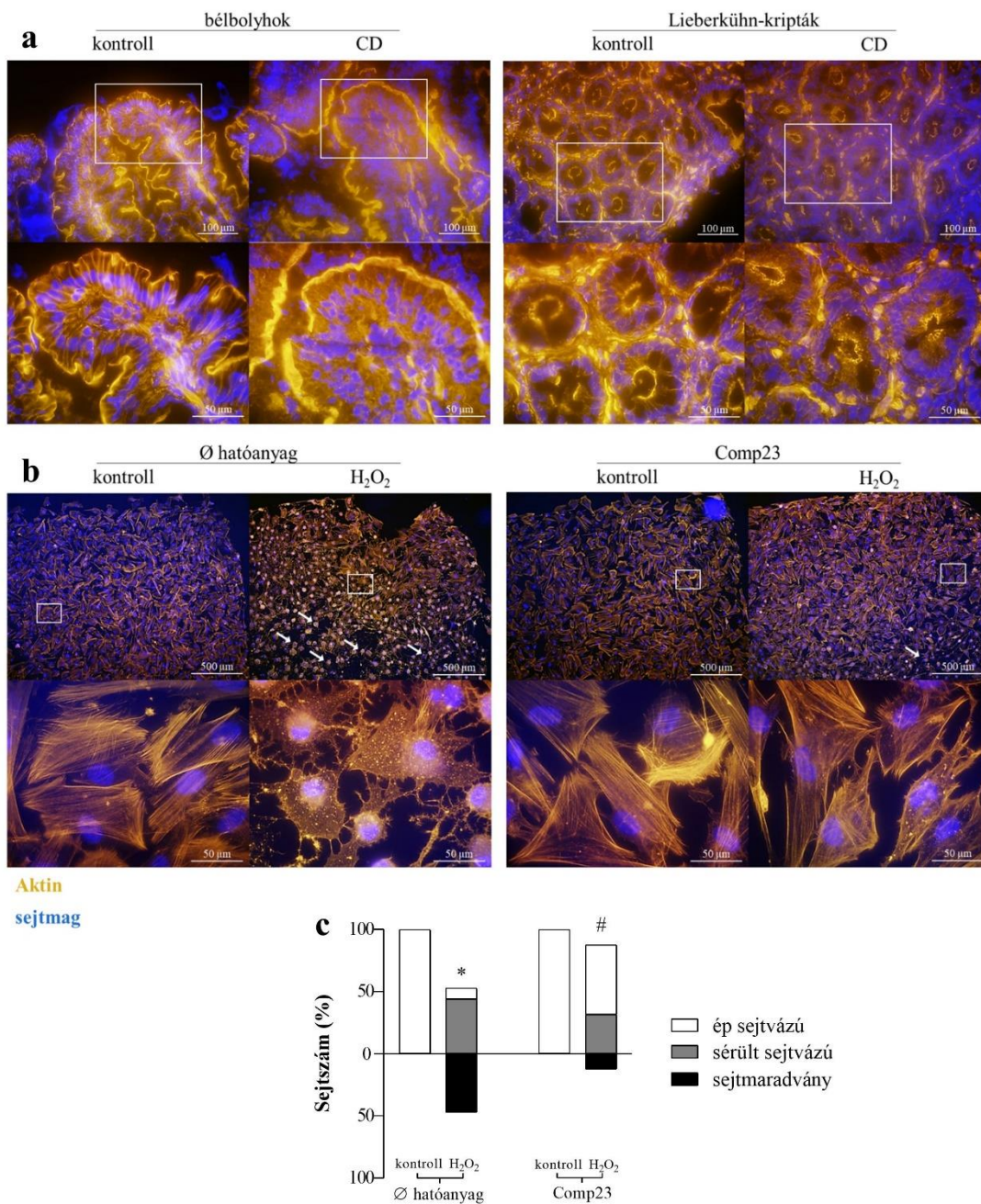
V teszt (c, d) segítségével határoztuk meg. A 0,001 μM -os Comp23 csoport kapcsán végzett géneexpressziós vizsgálatokat valós idejű PCR segítségével végeztük el (e). Az értékeket *Rn18s* hányadosaként ábrázoltuk, a kontroll csoport átlagértékére normalizálva. A diagramokon átlag + szórás adatok láthatóak (a, b, e: n=5/csoport, c: n=9/csoport). * $p < 0,05$ vs. kontroll + \emptyset hatóanyag (a, b, c: két-szemponos ANOVA, e: Mann-Whitney U-teszt); # $p < 0,05$ vs. H_2O_2 + \emptyset hatóanyag (a, b, c: két-szemponos ANOVA, e: Mann-Whitney U-teszt)

4.3.4. A Comp23 kezelés hatása az oxidatív stressz indukálta sejtvezeték károsodásra

A bélmozgás epitél sejtjeinek sejtvezetékrendszerét a metszetek, filamentáris aktinhez kötődő fluorofórral jelölt falloidinnel történő festését követően, fluoreszcens mikroszkóp segítségével vizualizáltuk.

Az egészséges bélmozgás epitél sejtjeit az aktin fluoreszcens szignálja határozottan rajzolja körül, erőteljes, apikális, bazális, illetve laterális festődést láthatunk mind a bélbolyhok, mind a kripták enterocitáinak körvonalának megfelelően. A cöliákias betegekből származó metszetek azonban merőben más festődést mutattak. Az epitél sejtek kontrasztos festődése helyett szemcsés jelet tapasztaltunk a sejtek citoplazmájában, a laterális fluoreszcens szignál szinte teljes egészében eltűnt (23. ábra/a).

Hasonló változást tapasztaltunk az FHs74Int duodenális epitél sejtvezetékrendszerén az oxidatív stressz hatására. Kezeletlen sejtekben az aktin rostos hálózata ép sejtvezetékra utal, míg H_2O_2 kezelés hatására az addig filamentáris aktin pontszerű aggregátumokat képez. Az immunfluoreszcens képeken jól megfigyelhető az oxidatív stressz indukálta citotoxicitás is, erre utalnak a kipukkadt sejtek maradványai, melyeket az ábrán fehér nyilakkal jelöltünk. A Comp23 kezelés mérsékelte az oxidatív stressz által kiváltott károsodást, mérsékeltebb aktin csomósodás, megőrzött sejtvezeték volt megfigyelhető (23. ábra/b, c).



23. ábra. Duodenális epítél sejtek sejtvázkárosodása cöliákiás betegtől (CD) származó biopszia mintán, illetve FHs74Int sejteken oxidatív stressz hatására. Az aktin sejtváz állapotát falloidin festést követően (narancs), fluoreszcens mikroszkóp segítségével vizualizáltuk kontroll, valamint cöliákiás gyermekek vékonybél biopsziáján (a), illetve FHs74Int sejteken 1000 μM H₂O₂ és/vagy 0,001 μM Comp23 kezelést követően (b). A sejtmagokat DAPI festéssel (kék) tettük láthatóvá. A károsodott sejtvázú sejtek arányát (c) grafikai analízis segítségével határoztuk meg. A különböző mértékben

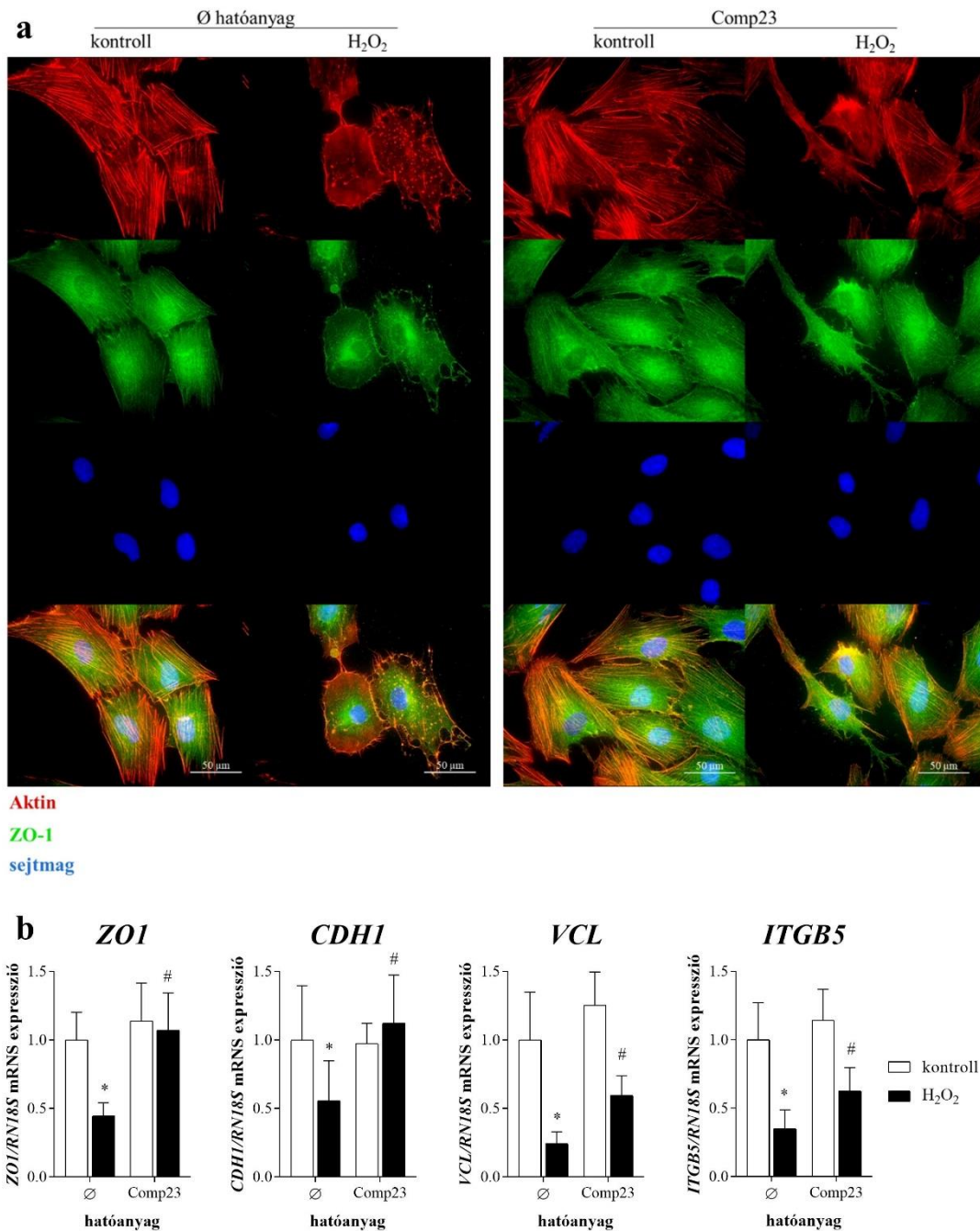
károsodott sejtek arányát a látótérben levő teljes sejtszámra vonatkoztatva adtuk meg (n=400-500/csoport). *p<0,05 vs. kontroll + Ø hatóanyag; #p<0,05 vs. H₂O₂ + Ø hatóanyag (Kí-négyzet próba)

4.3.5. A Comp23 kezelés hatása az oxidatív stressz indukálta sejtadhéziós károsodásra

Az aktin sejtváza, illetve a ZO-1, sejtadhéziós molekulák intracelluláris lokalizációját fluoreszcens mikroszkóp segítségével vizsgáltuk az FHS74Int sejtek falloidin-, illetve immunfluoreszcens festését követően.

Kezeletlen sejtekben, ahol az aktin-festés ép, egészséges sejtváza mutatott, a ZO-1 az aktin filamentumokkal kolokalizált. H₂O₂ kezelést követően azonban azokban a sejtekben, melyekben a károsodás hatására az aktin intracelluláris aggregátumokat képzett, a ZO-1 disszociált az aktinról, és a citoplazmába került. A sejtek Comp23 hatóanyaggal történő kezelése mellett, hogy javította az aktin sejtváza állapotát, normalizálta a ZO-1 sejtadhéziós fehérje lokalizációját (24. ábra/a).

Génexpressziós vizsgálataink alapján a Comp23 kezelés fokozta az FHS74Int sejtek H₂O₂ expozíció hatására csökkent *ZO1*, *CDH1*, *VCL* és *ITGB5* mRNS expresszióját (24. ábra/a).

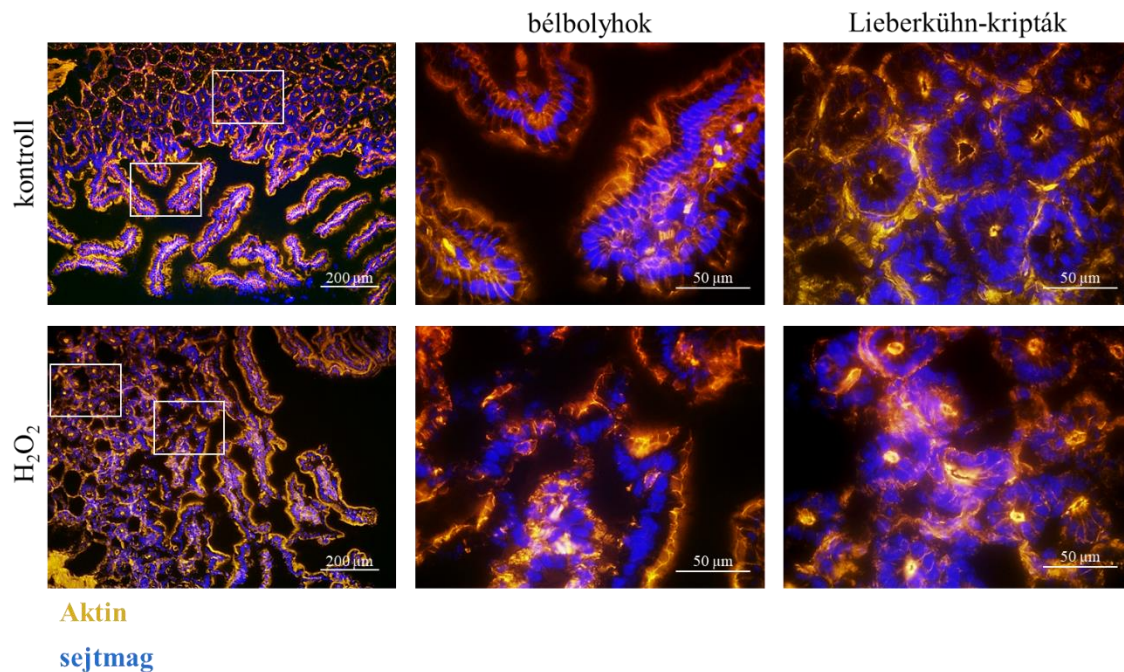


24. ábra. Comp23 hatása az oxidatív stressz indukálta sejtadhéziós károsodásra FHs74Int sejteken. Az aktin sejtvez (piros) és ZO-1 sejtadhéziós molekula (zöld) kolokalizációját immunfluoreszcens festést követően, fluoreszcens mikroszkóp segítségével vizualizáltuk FHs74Int sejteken 1000 µM H₂O₂ és/vagy 0,001 µM Comp23 kezelést követően (a). A sejtmagokat DAPI festéssel (kék) tettük láthatóvá. A génextpressziós vizsgálatokat valós idejű PCR segítségével végeztük el (b). Az értékeket *Rn18s* hányadosaként ábrázoltuk, a kontroll csoport átlagértékére normalizálva. A

diagramokon átlag + szórás adatok láthatóak (n=5/csoport). *p<0,05 vs. kontroll + Ø hatóanyag (Mann-Whitney U-teszt); #p<0,05 vs. H₂O₂ + Ø hatóanyag (Mann-Whitney U-teszt)

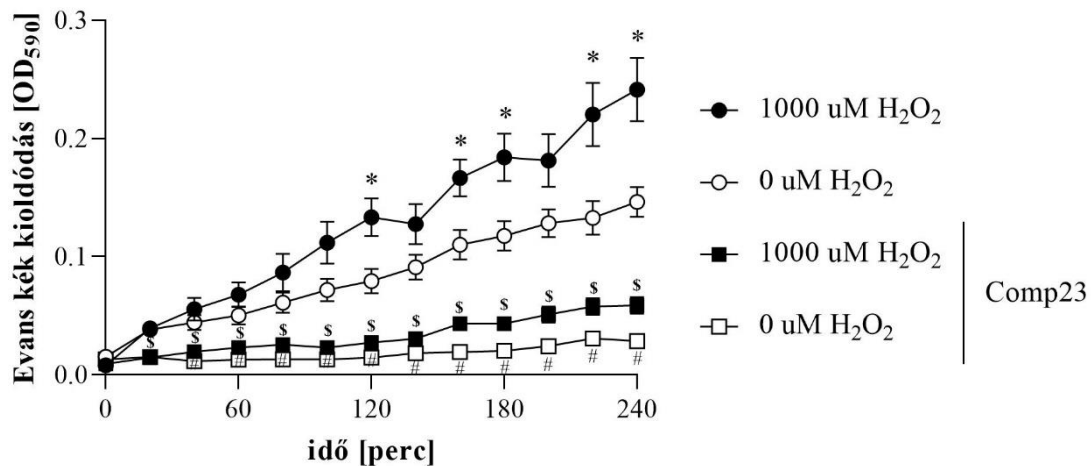
4.3.6. A Comp23 kezelés hatása a bél permeabilitására

Immunfluoreszcens festés segítségével kimutattuk, hogy az egerek vékonybél szövetének H₂O₂-dal történő kezelése jelentős sejt vázkárosodáshoz vezet (25. ábra). Míg az egészséges bél szöveten az aktin fluoreszcens jele körülrajzolja az epitél sejteket, addig H₂O₂ kezelést követően a kontúros festődés helyett szemcsés jelet tapasztaltunk citoplazmájukban, és a laterális fluoreszcens szignál szinte teljes egészében eltűnt.



25. ábra. Duodenális epitél sejtek sejt vázkárosodása egerekből származó vékonybél szövet mintán. Az aktin sejt váz állapotát falloidin festést követően (narancs), fluoreszcens mikroszkóp segítségével vizualizáltuk kontroll, illetve 30 perces, 1000 μM H₂O₂ kezelést követően. A sejtmagokat DAPI festéssel (kék) tettük láthatóvá.

A Comp23 bélhám integritásra gyakorolt hatását kontroll, illetve Comp23 kezelt egerekből származó vékonybél preparátumok permeabilitásvizsgálata segítségével tanulmányoztuk. A kísérlet során intesztinális zsákokat preparáltunk, melyeket festékkel töltöttük fel. H₂O₂-dal történő kezelés hatására fokozódott a zsákokba töltött festék kioldódása. A Comp23 hatóanyaggal előkezelt állatokból származó preparátumok permeabilitása szignifikánsan alacsonyabb volt mind a kezeletlen, mind a H₂O₂ kezelt csoportok tekintetében (26. ábra).



26. ábra. Comp23 hatása a vékonybél preparátumok permeabilitására. A kezeletlen, illetve Comp23 kezelt egerekből származó intesztinális zsákokat 0 μ M vagy 1000 μ M H₂O₂ koncentrációjú, DMEM tápoldatban oldott 0,1% evans kék festékkel töltöttük fel. A festék kioldódásának mértékét 4 órán át, 20 percenkénti mintavétellel határoztuk meg. A diagramokon átlag + szórás adatok láthatóak (n=7-9/csoport). *p<0,05 0 μ M H₂O₂ vs. 1000 μ M H₂O₂; #p<0,05 0 μ M H₂O₂ vs. 0 μ M H₂O₂ + Comp23; \$p<0,05 1000 μ M H₂O₂ vs. 1000 μ M H₂O₂ + Comp23 (két-szemponos ANOVA)

5. Megbeszélés

5.1. α -SMA és β -aktin specifikus PCR primerek

Az aktin fehérjecsaldot 6 különböző izoforma alkotja [31], melyek közül az α -SMA és β -aktin fontossága kiemelendő, különösen a szöveti átrendeződéssel kapcsolatos kutatások kapcsán. A szöveti átrendeződés, sebgyógyulás, hegesezés témájában gyarapodó tanulmányok megkerülhetetlen eleme az α -SMA, mely az említett folyamatokban kulcsfontosságú szereppel bíró miofibroblasztok biomarkere [6]. Még szélesebb körben ismert talán a β -aktin, mely évente tanulmányok ezreiben jelenik meg, mint molekuláris biológiai mérések referenciagénje vagy -fehérjéje [71]. Bár a különböző aktin izoformákat különböző gének kódolják, az aminosav- és nukleotidszekvenciájuk közti homológia megközelíti a 90%-ot (5. ábra) [31]. Az izoformák magas homológiájából adódik, hogy a különböző aktin gének egy-egy, az átlagos primerek hosszának megfelelő 20-25 bázispárnyi szakaszán mindössze 3-4 db véletlenszerűen elhelyezkedő báziseltérés található. Amennyiben ezt tervezéskor nem vesszük figyelembe, a primerek nem lesznek képesek diszkriminálni a különböző aktin izoformák közt, és a PCR-ek során a mérés eredményét torzító aspecifikus termékek keletkezhetnek. Jelen tanulmány célja az alap kutatások során leggyakrabban használt fajok, így egér, human és patkány α -SMA és β -aktin mRNS expresszió meghatározására alkalmas izoforma-specifikus valós idejű PCR módszer kifejlesztése és validálása. Emellett felmérjük, mekkora figyelmet fordít a jelenségre a szakirodalom, illetve az egyik leggyakrabban használt experimentális vesefibrózis modellen szemléltetjük, milyen torzítást okozhat a nem izoforma-specifikus reakciók használata.

A PCR során a DNS polimeráz a bekötődött primer 3' végétől, 5'-3' irányba építi fel az új DNS szálát a templát szál szekvenciája alapján [72]. Ezért a primer 3' végén levő bázisegyezések és -eltérések határozzák meg a legnagyobb mértékben a primerek templát DNS-hez való bekötődését, így a PCR specificitását [73, 74]. Mindezek miatt izoforma-specifikus primereink tervezése során olyan szakaszokat kerestünk, ahol legtöbb a báziseltérés az elkülöníteni kívánt aktin izoformák szekvenciái között, és kiemelt figyelmet fordítottunk arra, hogy ezek főként a primerek 3' végén lokalizálódjanak, így biztosítva specifikus anellációjukat (5. ábra/b, 15. ábra).

Kísérletünk első lépéseként az egér *Acta2* és *Actb* mRNS expresszió meghatározásához alkalmas saját tervezésű $m\alpha$ -SMA_{SD} és $m\beta$ -actin_{SD} primerek templát-specificitását

ellenőriztük *Acta2*, *Actb*, *Actg1* és *Actg2* izoformák kódoló szakaszainak megfelelő szekvenciájú α -SMA_T, m β -actin_T, γ -cyto-actin_T, illetve γ -smooth-actin_T mesterséges oligonukleotidokat használva templátként. Az α -SMA_{SD} primer a α -SMA_T templáttal, a m β -actin_{SD} primer pedig a m β -actin_T DNS templáttal eredményezett PCR terméket, nem tapasztaltunk keresztreakciót az elsődlegesen elkülöníteni kívánt, nem specifikus izoforma templátjával (6. ábra). Bár a m β -actin_{SD} primert használva a PCR felsokszorozta a γ -cyto-actin_T oligonukleotidot is, úgy véljük, a primer használható a későbbi mérések során. A két szóban forgó, *Actb* és *Actg1* izoforma homológiája még kifejezettebb, és a primer bekötődési szakaszán – ahol biztosítani tudjuk az *Acta2* és *Actb* közti differenciációt, az *Actb* és *Actg1* szekvenciája nem tartalmaz annyi báziseltérést, hogy a keresztreakciót kiküszöbölhessük (5. ábra/a). A szekvenciabeli hasonlóság azonban biológiai azonossággal is jár. A szintén citoplazmatikus *Actg1* állandó expressziós szintet mutató gén, így referenciaként is gyakran alkalmazzák [34], emellett a különböző RNS expressziós adatbázisok alapján szöveti jelenléte az *Actb* töredéke [75-77]. Mindezek alapján az eredményeink azt mutatják, hogy a saját tervezésű primereink alkalmas az egér *Acta2* és *Actb* mRNS expresszió meghatározására.

A validáció következő lépésként meghatároztuk a α -SMA_{SD} és m β -actin_{SD} primerekkel végzett PCR-ek hatásfokát. A kalibrációs görbék meredekségéből számított amplifikációs koefficiensek az elvárt 1,8-2,2 tartományba [78, 79] estek (7. ábra).

Végezetül a α -SMA_{SD} és m β -actin_{SD} primerek specifikusságát experimentális kísérletből származó mintákon ellenőriztük. A kísérlet során egér veseszövetből izolált RNS-ből származó komplementer DNS-t használtunk, melyek esetén tehát a minták kevert, így potenciális keresztreakcióra alkalmas DNS templátokat is tartalmaztak. Az α -SMA_{SD} és m β -actin_{SD} primerek által végzett PCR végeztével kapott termékek szekvenciáit Sanger-szekvenálással határoztuk meg. A kapott nukleotidsorrendet az *Acta2*, *Actb*, *Actg1* és *Actg2* kódoló szakaszára illesztve az tapasztaltuk, hogy a PCR termékek szekvenciája megegyezik a saját referencia génjeik szekvenciájával (8. ábra), tehát a reakciók valódi, experimentális mintából származó templátokon is specifikusak és jól használhatóak. Sőt, megerősítést nyert a sejtésünk, miszerint a mesterséges templátok esetén az m β -actin_{SD} primer γ -cyto-actin_T-nal tapasztalt keresztreakciója valódi, természetes mintán nem okoz mérési hibát.

Folytatásként megvizsgáltuk a hipotézisünk, miszerint az α -SMA és β -aktin expresszió meghatározása az átlagosnál nagyobb körültekintést igényel. Neves szaklapokból véletlenszerűen gyűjtött, egér α -SMA és β -aktin mRNS expresszió meghatározásához használt PCR primerek szekvenciáit az aktin izoformák kódoló szakaszára illetve átlagosan 3 darab, elszórtan elhelyezkedő báziseltérést találtunk (10. ábra). Ez a mintázat arra utal, hogy a primerek tervezésekor nem vették figyelembe a különböző aktin izoformák közti nagyfokú homológiát. Az egér *Acta2* és *Actb* kódoló szakaszokinak megfelelő mesterséges oligonukleotidokkal végzett PCR-ek során bizonyítottuk, hogy ezen irodalmi forrásból származó primerek nem csak a névleges target templátot sokszorozzák fel, hanem a nem-specifikus izoformákat is (10. ábra). Mivel egy PCR során a primer bekötődés specificitása bizonyos mértékig befolyásolható az anellációs hőmérséklet megváltoztatásával, a fent bemutatott, optimális anellációs hőmérsékleten végzett kísérleteinket megismételtük úgy is, hogy ± 2 °C-kal módosítottuk a beállításokat. Méréseink alapján az anellációs hőmérsékletek változtatása nem volt hatással a reakciók specificitására.

A fent ismertetett jelenség biológiai relevanciáját, a nem specifikus primerekkel történő PCR által eredményezett esetleges mérési hibákat UUO-n átesett egerek vesemintáján szemléltettük. Mintapopulációkon elsőként különböző, gyakran használt referenciagének expresszióját határoztuk meg. Méréseink alapján nem volt különbség a kontroll és UUO-s csoportok *Rplp0*, *Hprt*, *Gapdh* és *Rn18s* mRNS expresszió értékeiben (11. ábra). Méréseink alapján a mintapopulációkban az *Rn18S* mutatta a legstabilabb expressziót, illetve legalacsonyabb szórást. Így a további mérések során a génexpressziós adatokat az *Rn18s* hányadosaként határoztuk meg.

Következő lépésként saját tervezésű és irodalmi forrásból származó primerek segítségével meghatároztuk ugyanazon minták α -SMA és β -aktin izoformáinak mRNS expresszióját. A vesehegesedés egyik leggyakrabban használt modelljében, az UUO-n átesett egerek veséjében nagymértékű felszaporodása figyelhető meg az α -SMA pozitív fibroblaszt sejteknek [19]. Ennek megfelelően, méréseink alapján UUO hatására az egér vesék *Acta2* expressziója mind a négy mérés alapján fokozódott, azonban a változás mértéke 3- és 6-szoros között változott, attól függően, melyik primert használtuk (12. ábra). Az eltérések hátterében a PCR-ek többi aktin izoformával történő keresztreakciója áll. Az *Actb* esetén még szembetűnőbb különbségeket tapasztaltunk. Míg a saját

tervezésű, bizonyítottan specifikus m β -actin_{SD} primerrel mérve (ugyanúgy, mint a többi referenciagén, az *Rplp0*, *Hprt*, *Gapdh* és *Rn18s* esetén) nem tapasztaltunk különbséget a kontroll és UUO-s csoportok mintái között, addig az irodalmi primereket használva 1,5-2-szeres emelkedés volt megfigyelhető (13. ábra). Feltételezésünket, miszerint a fenti PCR mérések során tapasztalt *Actb* álpozitív emelkedése háttérben a nem-specifikus primerek többi izoformával, különösen a fibrotikus szövetben többszörösére emelkedő *Acta2*-val történő keresztreakció állhat, korrelációs vizsgálataink eredményei is alátámasztották. Adataink alapján közepes, illetve szoros pozitív összefüggés van az egyes mintákban mért álpozitív *Actb* emelkedés mértéke és a minta *Acta2* expressziója között (14. ábra). Mindez azt jelenti, hogy amennyiben az UUO-s modellünkben az irodalmi β -aktin primereket használnánk referenciaként – ahogy a forrástanulmányokban ezt tették, akkor minden célgén esetén a valódi expresszió 50-75%-át határoznánk meg az UUO-s csoportban, hibásan. Ez nem csupán torzítaná egy-egy gén kontroll csoporthoz viszonyított expresszióváltozásának mértékét, de akár a változás irányát is módosíthatja. Miután felmértük problémafelvetésünk relevanciáját, illetve validáltuk az egér minták *Acta2*, illetve *Actb* mRNS expressziójának meghatározására fejlesztett PCR-einket, tapasztalataink függvényében másik két, az alap kutatásban leggyakrabban használt mintaforrás, a humán, illetve a patkány mintákra alkalmas primereket is megterveztük (15. ábra). Mesterséges DNS templáttal végzett méréseink alapján ezen reakciók is izoforma-specifikusak, nem detektáltunk keresztreakciót a differenciálni kívánt aktin oligonukleotidjával (16. ábra).

5.2. IL-24 szerepe a szöveti átépülésben

Az elmúlt években az IL-24 sebgyógyulás, illetve krónikus gyulladás folyamatában játszott szerepét számos tanulmány felvetette [42]. Kutatócsoportunk kimutatta az IL-24 fokozott expresszióját cöliákiában [80], IBD-ben (nem publikált adat), valamint CKD-ban [81] szenvedő betegek szövetszövetmintáin. Az IL-24 pontos biológiai funkcióját különböző *in vitro* és *in vivo* modellekben vizsgáltuk.

A bélszövet fiziológiai struktúrája egy kényes egyensúly eredménye, hiszen a bélhám felszínén elhelyezkedő sejtek folyamatos „erózióknak” vannak kitéve. A lumennel határos, gyorsabban pusztuló epitél sejteket a Lieberkühn kripták védett mélységében szaporodó, majd a felszíni régióba migráló sejtek pótolják [24]. Az epitél sejtek vándorlását támogató szilárd felszín a szubepiteliális miofibroblasztok által termelt bazális membrán biztosítja [82]. Cöliákia során fellépő krónikus gyulladás megzavarja az epitél sejtek és fibroblasztok összehangolt működését, jellegzetes szövettani eltérést eredményezve, mint amilyen a kripta hiperplázia és a boholyatrófia. Roncoroni és munkatársai korábban kimutatták, hogy míg az egészséges szövetszövetmintákból izolált fibroblasztok hosszúkás, elnyúlt alakúak, addig a cöliákias mintákból származó sejtek inkább lepedőszerűek, a sejtfelszíni fehérjék kör alakban rendeződnek, s a megváltozott morfológiához csökkent motilitás társul [24, 25].

Az IL-24 – cöliákia kapcsolatát célzó vizsgálataink során egészséges bélszövetből izolált primer fibroblasztok sejtalakját vizsgáltuk rekombináns IL-24 fehérjével való kezelést követően. A kísérletben pozitív kontrollként TGF- β kezelést alkalmaztunk, mely az egyik legismertebb fibroblaszt stimuláló növekedési faktor, fokozva a sejtek motilitását és ECM-termelését [12, 83]. Az alapvetően hosszúkás alakú sejtekben az α -SMA stresszrostok TGF- β hatására még inkább a sejtek hossz tengelyével párhuzamosan rendeződtek, míg IL-24 kezelés hatására a sejtek lepedőszerű alakot vettek fel, és az intracelluláris rosthálózatuk kör-szerűen rendeződött át (17. ábra/a, b). Génexpressziós vizsgálataink alapján a morfológiai jelenség hátterében az sejtvezeték struktúrális komponenseinek változása állhat, IL-24 kezelt sejtekben ugyanis fokozódott az α -SMA (*ACTA2*), β -aktin (*ACTB*) és vimentin (*VIM*) struktúrelemek, illetve a sejtadhézió szabályzásában résztvevő cinkujj fehérje transzkripciós faktorok (*SNAI1*, *SNAI2*) mRNS expressziója (17. ábra/c). Mivel a fibroblasztok fontos szerepet játszanak a sérült bélnyálkahártya reepitelizációs folyamataiban, feltételezhető, hogy e megváltozott

fenotípus befolyásolhatja a szöveti átrendeződéssel járó betegségek, így a cöliákia progresszióját. Az IL-24 szöveti gyógyulásra, hegesedésre gyakorolt hatásának tisztázása azonban jóval komplexebb feladat.

A fibroblasztokra gyakorolt direkt hatása mellett eredményeink arra utalnak, hogy az IL-24 közvetett módon is fibroblaszt aktivációhoz vezethet. Vese [81] és a bél (nem publikált adat) epitél sejteken kimutattuk, hogy az IL-24 kezelés fokozza a TGF- β , illetve PDGF-B profibrotikus citokinek termelését. A citokin *in vitro* tapasztalt hatásainak eredőjét különböző állatmodelleken vizsgáltuk.

Az *Il20rb* *-/-* egereken végzett vizsgálataink segítenek az IL-24 szerepének megértésében, segítségükkel választ kaphatunk arra, mi történik a szöveti átrendeződés során akkor, ha a citokin receptora nem funkcióképes, így az nem tudja ellátni feladatát.

Az IL-24 vesefibrózisra gyakorolt hatását UUO-n átesett egereken vizsgáltuk. Egy korábban megjelent tanulmányunkban [84] kimutattuk, hogy újszülött patkányok veséjében UUO hatására a szöveti átrendeződés folyamatában kiemelt szerepet játszó mátrix metalloproteázok mellett az IL-24 expressziója emelkedett meg a legnagyobb mértékben.

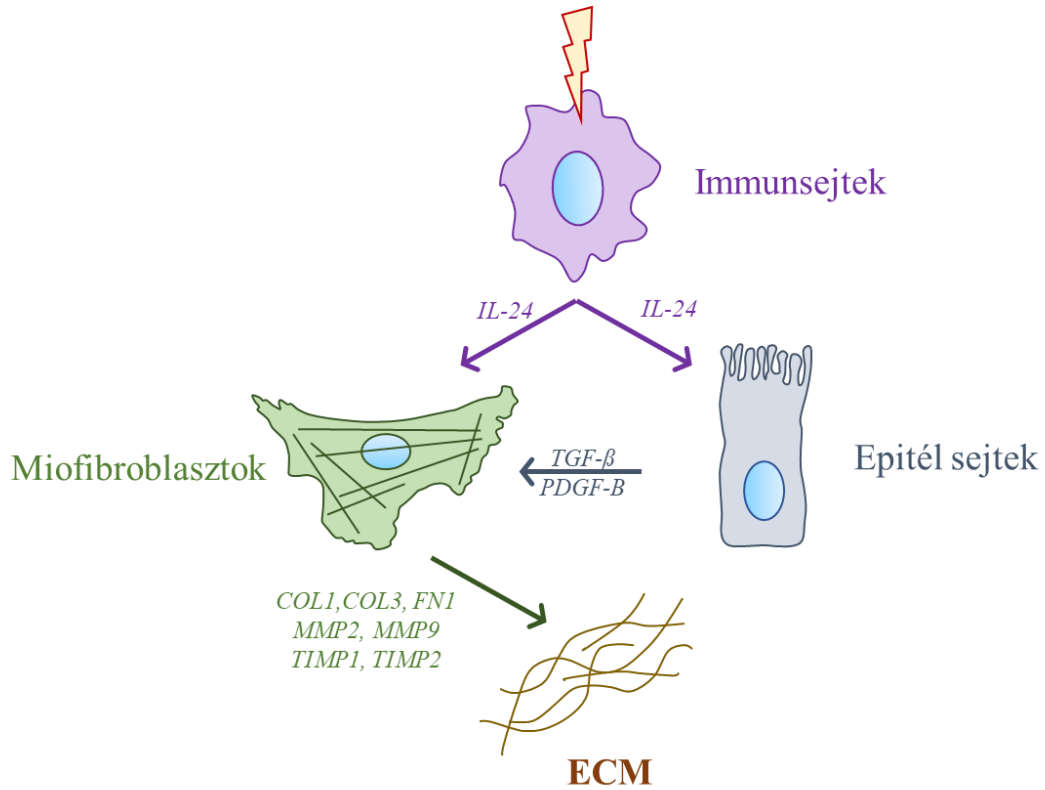
Elsődleges markerként az α -SMA mennyiségét határoztuk meg a veseszövetben. Modellünkben e marker használhatóságát és érzékenységét jól jelzi, hogy egészséges veseszövetben szinte detektálhatatlan az α -SMA fehérje jelenléte (18. ábra/a, c), csupán az erek simaizomrétege expresszálja azt [19], azonban UUO hatására erőteljes miofibroblaszt akkumuláció figyelhető meg (18. ábra/b, c), melyet a fokozott intersticiális α -SMA immunopozitivitás is bizonyít. Irodalmi adatok alapján az intersticiális α -SMA expresszió mértéke előre jelezheti a krónikus veseelégtelenség progresszióját, a vesefunkció romlását [85, 86]. Az *Il20rb* *-/-* állatok veseszövetében kevésbé emelkedett α -SMA fehérje (18. ábra/c,d) és *Acta2* (18. ábra/e) mRNS szintet detektáltunk a 14 napos WT csoporthoz viszonyítva, ami mérsékeltabb miofibroblaszt aktivációra utal. Ezzel összhangban, a szövettani festések alapján a hegesedés mértéke enyhébb volt a 14. napon az *Il20rb* *-/-* állatokban a WT csoporthoz képest (18. ábra/f, g).

Az IL-24 citokinnek a bélmukóza szöveti átrendeződésére gyakorolt hatását DSS-indukálta kólitisz modellen, illetve lokális, rekombináns IL-24 injekcióval történő kezelést követően vizsgáltuk. Ahogy az fluoreszcens mikroszkóppal készült képen jól látszik, a kontroll egerekből kioperált vastagbéliszövet (a veseszövettől eltérően) erős α -

SMA pozitivitást mutat, főként a körkörös és hosszanti simaizomrétegének köszönhetően (19. ábra/a). Ennek megfelelően Western blot analízis során az egészséges bélszövetben esetén is erős jelet detektálunk (19. ábra/b, c). A robosztusnak számító, 19 napos DSS-es modell esetén fehérjeszinten egy (a veseszövet esetén tapasztalható képest) kismértékű α -SMA növekedést tapasztaltunk a WT állatokban, mely az *Il20rb* $-/-$ állatokon nem volt megfigyelhető (19. ábra/b, d). Ez az eredmény összhangban van az UUO-s modellen tapasztalattal, miszerint az *Il20rb* $-/-$ fenotípus antifibrotikus tulajdonsággal bír. Mindezt az is alátámasztja, hogy a bélszövet alacsonyabb α -SMA fehérjeszintje mérsékelt profibrotikus génexpressziós profillal társult (19. ábra/f).

Az *Il20rb* $-/-$ állatokon végzett kísérletek kiegészítéseként WT egerek bélszövetét lokális, rekombináns IL-24 injekcióval kezeltük. Western blot mérésünk alapján az α -SMA fehérje mennyisége nem változott a kezelés hatására, azonban génexpressziós szinten kétszeres *Acta2* mRNS mennyiséget detektáltunk (19. ábra/e). Ezzel egybevételesen, az IL-24 kezelt egerek bélszövetében fokozott expressziót tapasztaltunk az ECM strukturális elemeket (*Colla1*, *Col3a1*, *Fnl1*), illetve a szilárd kötőszöveti struktúra kialakításában részt vevő enzimeket (*Mmp2*, *Mmp9*, *Timp1*, *Timp2*) kódoló gének esetén, ami megnövekedett szöveti fibroblaszt mennyiségre, és/vagy aktivitásra utal (19. ábra/g). Úgy gondoljuk, hogy fehérjeszinten a bélszövet muscularis externa és muscularis mucosae rétegéből adódó erős α -SMA alapjel elfedheti a kisebb mértékű emelkedést a kevésbé robosztus modellek esetén. Egy specifikus, jól beállított PCR segítségével azonban meghatározhatjuk az *Acta2* mRNS expressziót, amely az irodalmi ismereteink szerint (egy stabil, hosszú életidejű fehérje esetén, mint amilyen a simaizomszövetben található α -SMA) az újonnan termelődő fehérjemennyiséggel, esetünkben az felszaporodó fibroblasztok mennyiségével és aktivációjával jól korrelál [6, 10, 11, 87]. Így az *Acta2* mRNS expresszió meghatározása fontos és érzékeny eszköztára a szöveti átrendeződés, illetve hegesedés vizsgálatának.

Összefoglalva tehát a fejezetben ismertetett eredményeink arra utalnak, hogy a IL-24 citokin felelős a fibroblasztok fokozott szaporodásáért, azok aktivációjáért a sérült szövetben (27. ábra). A modellek mindegyike esetén fontos szerepet kapott az α -SMA, mint biomarker, mely expressziós, lokalizációs, vagy épp orientációs jellemzőivel járult hozzá a vizsgált citokin szerepének megértéséhez.



27. ábra. Az IL-24 citokin szöveti átrendeződésben betöltött szerepének általunk feltételezett mechanizmusa. Eredményeink alapján a gyulladás, illetve sérülés hatására aktiválódó immunsejtek által termelt IL-24 közvetlenül a miofibroblasztok aktivációját serkentve, illetve közvetlenül, az epitél sejteken profibrotikus faktorok termelésén keresztül fokozza a kollagénben dús extracelluláris mátrix (ECM) lerakódását.

5.3. PARK7 szerepe a bélmukóza oxidatív károsodásában cöliákia során

Az oxidatív stressz, illetve az annak következtében károsodó makromolekulák intracelluláris felhalmozódása fontos szerepet játszik a cöliákiában szenvedő betegek bélnyálkahártyájának romló funkciójában, permeabilitásának fokozódásában [88-90]. Moretti és munkatársai korábban kimutatták, hogy a cöliákiás betegek plazmájának ROS-szintje szoros korrelációt mutat az intesztinális gyulladás mértékével [27]. Tanulmányukban a betegek szérum antioxidáns kapacitásának rutinszerű monitorizálását javasolják a gluténmentes diéta sikerességének nyomonkövetése céljából.

Kutatócsoportunk 2014-ben megjelent közleményében fokozott PARK7 expressziót mutatott ki cöliákiában szenvedő gyermekek vékonybél nyálkahártyájában [91]. A PARK7 egy közel minden sejtben megtalálható antioxidáns fehérje, melynek fontos szerepe főként neurodegeneratív megbetegedések kapcsán ismert [51]. A gyulladásos folyamatok során károsodó bélhám integritásának fenntartásában, az epitel sejteinek oxidatív károsodásának kivédésében játszott szerepe azonban ezidáig nem tisztázott.

Vizsgálataink során - korábbi eredményeinkkel összhangban [47], erőteljes PARK7 jelenlétet mutattunk ki cöliákiás betegek vékonybelének epitel sejtjein, illetve a vékonybél eredetű FHs74Int sejtvonalon (20. ábra). Ennek megfelelően kísérleteink során FHs74Int sejteken oxidatív stressz indukciót követően vizsgáltuk a PARK7 szerepét a mukózális integritás fenntartásában. Tanulmányunk során Comp23-mal, egy a PARK7-hez kötődő hatóanyaggal fokoztuk a fehérje aktivitását, melyet Kitamura és munkatársai fejlesztettek [92, 93]. Az általuk feltárt hatásmechanizmus alapján a hatóanyag a PARK7 C106 cisztein oldalláncához kötődve óvja a fehérjét az irreverzibilis oxidatív károsodástól, megőrizve ezáltal annak antioxidáns funkcióját.

Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy a Comp23 kezelés mérsékelte a H₂O₂ által kiváltott intracelluláris ROS akkumulációt az epitel sejteken (21. ábra/a, b). Eredményeink összhangban állnak korábbi tanulmányokkal, melyek szerint a rekombináns PARK7 fehérjével történő kezelés mérsékelte az oxidatív stressz indukálta ROS felhalmozódást idegsejteken [94, 95]. Emellett az is ismert, hogy a PARK7 hiánya számos sejttypusban fokozott ROS akkumulációt eredményez [96-98]. Mindezek alapján a PARK7 fontos szerepet játszhat a sejtek oxidatív stressz elleni védekezésében. Génexpressziós vizsgálataink alapján a Comp23 antioxidáns hatásának hátterében az áll, hogy a hatóanyag fokozta az eritroid eredetű 2-es típusú nukleáris faktor 2-szerű faktor 2

(*NRF2*) expresszióját, mely az antioxidáns védelem egyik központi regulátora [99]. A Comp23 kezelés fokozta a H₂O₂ kezelt FHs74Int sejten az NRF2 transzkripciós faktor targetjeinek, mint amilyen a hem-oxigenáz (*HMOX1*), NAD(P)H:kinon oxidoreduktáz 1 (*NQO1*), tioredoxin (*TRX1*), illetve gamma-glutamil cisztein szintetáz (*GCLC*) antioxidáns fehérjéket kódoló gének expresszióját is (21. ábra/c). Eredményeinket tehát irodalmi adatokkal kiegészítve, miszerint a PARK7 transzkripciós faktor (köztük NRK2) stabilizáló hatással bír [100], arra következtethetünk, hogy a Comp23 antioxidáns hatása háttérben a PARK7-NRF2 útvonal aktivációja állhat.

A sejtek redox állapotában tapasztalt javulásával párhuzamosan a Comp23 kezelés javította azok oxidatív körülmények közti életképességét (22. ábra/a, b). Hasonló eredményről számolt be Kitamura munkacsoportja neuronsejtek kapcsán, amikor is elsőként mutatták ki a PARK7-kötő hatóanyag protektív hatását H₂O₂-indukálta sejthalállal szemben [92, 93]. Génexpressziós vizsgálataink a Comp23 citoprotektív hatása háttérben - a redox státusz javítása mellett, a hatóanyag által fokozott tumor antigén p53 (*TP53*) mRNS expressziója állhat. A p53 az NRF2-höz hasonlóan a celluláris stresszválaszban fontos szerepet játszó, központi transzkripciós faktor, mely a sejtosztódás, illetve programozott sejthalál szabályzásában, a károsodott DNS javításában vesz részt [101, 102]. Ezzel összhangban méréseink azt mutatták, hogy az epitél sejtek Comp23 kezelése fokozta az ismert p53-targetek [103], így a proliferáló sejt nukleáris antigén (*PCNA*), p21 ciklindependens kináz (*CDKN1A*), valamint a B-sejt limfóma protein 2 (*BCL2*) és BCL2-asszociált X protein (*BAX*) apoptózis regulátorok elemeket kódoló gének expresszióját (22. ábra/c). Eredményeink jól illeszkednek azon irodalmi ismeretek közé, miszerint a PARK7 oxidációs állapotától függően képes szabályozni a p53-p21 útvonalat [104].

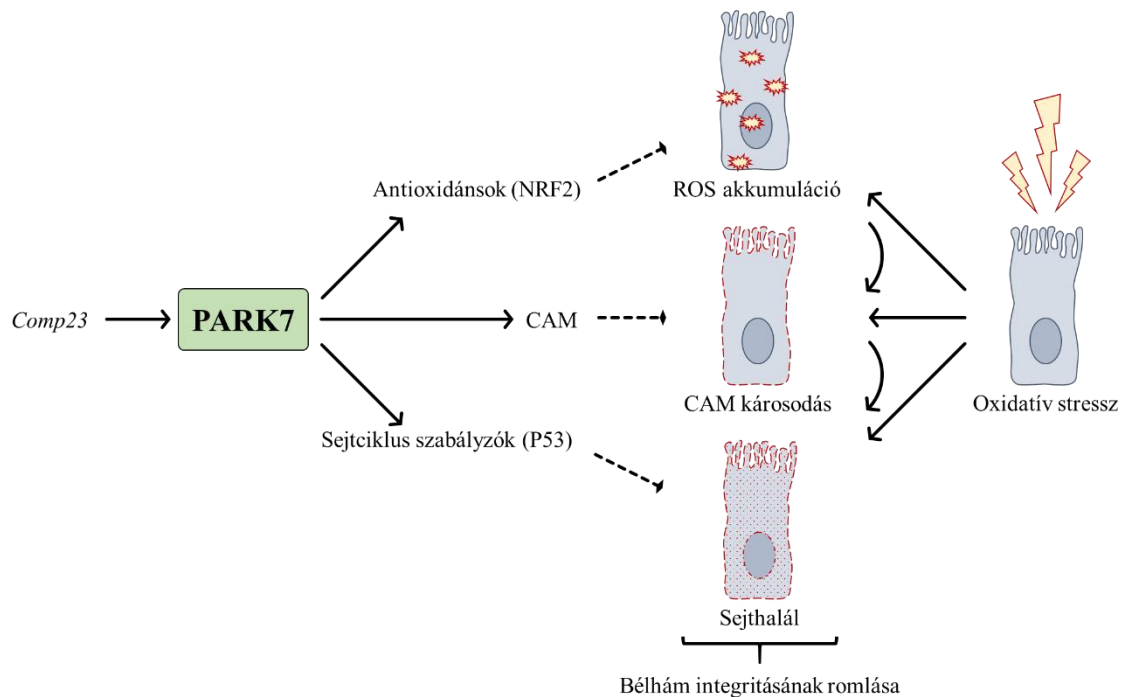
Következő kísérleteink során arra kerestük a választ, hogy a PARK7 miképp játszhat szerepet a cöliákiás betegek bélnyálkahártya integritásának fenntartásában. A duodenális biopsziákból készült metszeteket vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a betegekből származó minták epitél sejtjeinek komoly mértékben károsodott a sejtvezük. Míg az egészséges mintákon az aktin festés megtarott struktúrát mutatott az epitél sejtek felszínén, kontúrszerűen jelölve azok határait, addig a gyulladt szövetből származó minták diffúz, szemcsés festődést mutattak (23. ábra/a).

Hasonló jelenséget tapasztaltunk doudenális epitél sejteken oxidatív stressz indukciót követően. A kétdimenziós sejt kultúrán az egészséges sejt vázat a jellegzetes, szálas festődésű aktin rosthálózat jelzi, azonban H_2O_2 kezelés hatására a rostok szétesnek, és intracelluláris aggregátumokat képeznek (23. ábra/b). Ezzel párhuzamosan oxidatív stressz hatására sejtadhéziós károsodás is megfigyelhető, amit jól jelez a zonula occludens (ZO-1) sejt kapcsoló struktúra sejt vázól történő disszociációja (24. ábra/a). Emellett csökkent a sejtadhéziós molekulákat kódoló gének, így a zonula occludens (ZO1), e-cadherin (CDH1), vinculin (VCL) és β -integrin 5 (ITGB5) mRNS expressziója (24. ábra/b). Irodalmi adatok alapján az intracelluláris makromolekulák oxidatív stressz hatására strukturális, illetve funkcionális változásokon mennek át, a fiziológiásan filamentáris, a sejt vázat alkotó aktin depolimerizálódik, s ez a rosthálózat összeeséséhez vezet [105]. Az aktin mellett, hogy jelentős szerepe van a sejtalak, illetve -szerkezet kialakításában, a sejtadhéziós molekulákat intracelluláris részükhöz kapcsolódva a sejt membránjához rögzíti, így cadherineket, tight junction és fokális adhéziós fehérjéket [106, 107]. Ez a rendszer biztosítja a sejtek egymáshoz, illetve kötőszöveti felszínhez történő szoros adhézióját, így a bélhám barrier funkcióját [108, 109]. Ismereteink szerint az előbbieken ismertetett sejt váz és -adhéziós károsodás áll a cöliákia során fellépő szövettani változások, s így a bélhám megváltozott barrier funkciójának hátterében is [110].

Eredményeink alapján a Comp23 kezelés normalizálta a sejtadhéziós molekulák expresszióját (24. ábra/b), sőt, megőrizte az aktin sejt váz-sejtadhéziós komplex egészségeshez közeli állapotát az oxidatív károsodásnak kitett epitél sejteken (24. ábra/a). A következőkben arra kerestük a választ, hogy a Comp23 sejt körülmények közt tapasztalt protektív funkciója valóban befolyásolja-e a bélhám integritását. *Ex vivo* kísérletünk során vékonybél preparátumokat vizsgáltunk H_2O_2 kezelést követően. Az egér bélszövet immunfluoreszcens festése alapján az oxidatív kezelés a cöliákias betegek mintájához hasonló sejt váz károsodást eredményezett (25. ábra). Az intesztinális zsákok barrier funkcióját Evans kék, egy membrán impermeabilis festék segítségével követtük nyomon (26. ábra). Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy a kontroll egerekből származó preparátumok permeabilitása H_2O_2 hatására fokozódott, felgyorsult a festék kioldódása. A Comp23 hatóanyaggal kezelt állatokból származó szövet átteresztőképessége azonban még órák elteltével is jelentősen alacsonyabb maradt, mind

a kezeletlen, mind a H₂O₂-kezelt csoportokban. Eredményeink alátámasztották *in vitro* tapasztalatainkat, a Comp23 kezelés nagymértékben javította a vékonybél zsákok integritását.

Mindezek alapján arra következtethetünk, hogy a PARK7 fontos szerepet játszik a bélhám oxidatív stressz elleni védekezésében, integritásának fenntartásában (28. ábra). Mivel a bélhám barrierfunkciójának együtt jár a bél lumenben található immunogén anyagok, így a gliadin vagy a bélbaktériumok lamina propriába történő fokozott penetrációjával, tovább súlyosbítja a cöliákiában szenvedők mukózális gyulladását [106, 110]. Az intesztinális barrier funkció megőrzése tehát potenciális terápiás célpontként szolgálhat a cöliákiás betegek gyulladásgátló kezelése során.



28. ábra. A PARK7 bél epitél sejtek antioxidáns védelmében betöltött szerepének általunk feltételezett mechanizmusa. Eredményeink alapján a PARK7 fehérjéhez kötődő Comp23 hatóanyag az NRF2 útvonalon keresztül fokozta antioxidáns molekulák expresszióját, normalizálta a sejtadhéziós molekulák (CAM) állapotát, illetve aktiválta a P53-hoz köthető sejtciklusszabályzók termelését. Ezáltal mérséklődött az epitél sejtekben az oxidatív stressz hatására megfigyelhető a reaktív oxigéngyökök (ROS) akkumulációja, a sejtadhéziós molekulák és a sejtvez károsodása, illetve sejthalál, mely folyamatok a bélhám barrierfunkciójának drasztikus csökkenéséhez vezetnek.

6. Következtetések

PhD munkám során a szöveti átrendeződés sejtes és molekuláris mechanizmusait vizsgáltam. A megfogalmazott kérdések megválaszolásában kiemelt szerepet kaptak az aktin molekulával kapcsolatos kísérletek. Eredményeink alapján elmondható:

- Sikerült bizonyítottan specifikus, az alap- és preklinikai kutatások során leggyakrabban használt, human, egér és patkány eredetű minták aktin expressziójának analízisére alkalmas PCR primereket tervezni, illetve reakciókat optimalizálni.
- Gyakran alkalmazott experimentális modellen szemléltettük, hogy az - irodalomban is gyakran alkalmazott - aspecifikus aktin primerek használata szignifikánsan torzítja a génexpressziós mérések eredményeit.
- *In vitro* eredményeink alapján az IL-24 az aktin stresszrostok átrendeződéséhez, a miofibroblaszt sejtek morfológiai változásához vezet.
- *In vivo* eredményeink alapján az IL-24 szerepet játszik a vese- és bélszövet szöveti átrendeződésében, hozzájárulva a miofibroblasztok túlzott mértékű akkumulációjához, ezáltal a kollagénben dús kötőszövet feldúsulásához.
- *In vitro* eredményeink alapján a PARK7 szerepet játszik a bél epitél sejteinek oxidatív stresszel szembeni védekezésében, miközben fokozza az antioxidáns elemek expresszióját, gátolja az aktin sejtvázt, illetve a sejtkapcsoló struktúrák károsodását, valamint mérsékli a sejthalált.
- *Ex vivo* eredményeink alapján a cöliákias betegek bélszövetében a PARK7 a bélhám integritásának fenntartásában, barrierfunkciójának megőrzésében fontos szerepet játszik.

7. Összefoglalás

Szöveti átrendeződés során egy meghatározott funkcióval rendelkező szövet valamilyen behatás, például gyulladás vagy más károsodás hatására ideiglenesen vagy tartósan strukturális és funkcionális változáson megy keresztül. A folyamat kulcsszereplői az epitél sejtek, valamint az extracelluláris mátrixot termelő miofibroblasztok, amelyek α -SMA stresszrostjuknak köszönhetően erőteljes kontrakcióra képesek.

PhD munkám során a szöveti átrendeződés pontosabb molekuláris és sejtes mechanizmusának megértését tűztem ki célul. A krónikus gyulladással járó betegségek kapcsán leírt IL-24, illetve a kutatócsoportunk által korábban cöliákiás mintákon kimutatott PARK7 molekulák biológiai szerepét *in vitro*, *ex vivo* és *in vivo* kísérletekben vizsgáltam. Az alkalmazott molekuláris biológiai módszerek sorában kiemelt szerepet kapott az aktin, mint a témában megkerülhetetlen marker.

Elsőként kimutattuk, hogy a különböző aktin, így a miofibroblaszt sejtek markereként használt α -SMA és a referenciagénként alkalmazott β -aktin izoformák génexpresszióinak kimutatása kiemelt figyelemmel tervezett PCR méréseket igényel a keresztreakciók, s így a mérési torzítás elkerülése érdekében. Mivel tapasztalataink szerint a szakirodalom nem fordít kellő hangsúlyt a problémára, experimentális modelleken szemléltettük a potenciális hibaforrás relevanciáit. Emellett az alap kutatásokban leggyakrabban alkalmazott, human, egér, valamint patkány eredetű minták aktin expresszióinak meghatározására alkalmas PCR módszereket állítottunk be és validáltunk.

Vese- és bélhegyesedés experimentális modelljein kimutattuk, hogy az IL-24 szerepet játszhat a szöveti átrendeződés mechanizmusában. Sejtes körülmények között az IL-24 a miofibroblaszt sejtek morfológiai átalakulását eredményezte, szöveti szinten megemelkedett mennyisége pedig miofibroblaszt akkumulációhoz és fokozott ECM termeléshez vezetett. Ezzel párhuzamosan az IL-24 receptorára vonatkozóan génkiűtött állatokban mérsékeltebb a miofibroblasztok, illetve a kollagénben dús kötőszövet feldúsulása indukciót követően.

Egy, a PARK7 fehérjéhez kötődő hatóanyag segítségével bebizonyítottuk, hogy a PARK7 szerepet játszik a bél epitél sejtjeinek oxidatív stresszel szembeni védekezésében, miközben fokozza az antioxidáns elemek expresszióját, gátolja az aktin sejtvez károsodását, valamint mérsékli a sejthalált, ezáltal hozzájárulva a bélhám integritásának fenntartásában, barrierfunkciójának megőrzésében.

8. Summary

During tissue remodeling, the injured tissue undergoes temporary or permanent structural and consequently functional changes. In this process beside epithelial cells, myofibroblasts are key players due their ability to produce ECM and to contract via α -SMA stress fibers.

In this dissertation I aimed to investigate the cellular and molecular mechanism of tissue remodeling. The biological role of IL-24, described in connection with chronic inflammatory diseases and PARK7 molecules, previously detected by our research group in celiac samples was investigated in *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* experiments. In our experiments, the determinant role of actin involved in several cell functions was demonstrated.

We developed a set of carefully designed PCR primer pairs to determine the expression of mouse, human and rat α -SMA and β -actin without cross reactions with other actin isoforms. Our study also gives an experimental explanation, how the improper primer design can alter the results of related measurements due their unspecific binding of to the various actin isoforms.

Our results on the experimental models of renal and intestinal fibrosis showed, that IL-24 plays a determinant role in the pathomechanism of tissue remodeling. IL-24 caused significant alteration in myofibroblast morphology *in vitro*, moreover its increased presence led to increased myofibroblast accumulation and ECM production *in vivo*. Similarly, the absence of the functional receptor of IL-24 resulted in moderated tissue fibrosis in KO mice.

Using a PARK7-binding compound we demonstrated that PARK7 plays a role in the defense of intestinal epithelial cells against oxidative stress via increasing the expression of antioxidant elements, moderating the disruption of actin cytoskeleton and suppressing cell death. All these processes contribute to the maintenance of mucosal integrity and the barrier function in the small intestine, suggesting the importance of PARK as a possible drug target in the future.

9. Irodalomjegyzék

1. Pinet K, McLaughlin KA. (2019) Mechanisms of physiological tissue remodeling in animals: Manipulating tissue, organ, and organism morphology. *Developmental biology*,
2. Wynn TA. (2008) Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol*, 214: 199-210
3. Wynn TA. (2007) Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *J Clin Invest*, 117: 524-529
4. LeBleu VS, Taduri G, O'Connell J, Teng Y, Cooke VG, Woda C, Sugimoto H, Kalluri R. (2013) Origin and function of myofibroblasts in kidney fibrosis. *Nat Med*, 19: 1047-1053
5. Lemoine S, Cadoret A, El Mourabit H, Thabut D, Housset C. (2013) Origins and functions of liver myofibroblasts. *Biochim Biophys Acta*, 1832: 948-954
6. Hinz B. (2007) Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *J Invest Dermatol*, 127: 526-537
7. Jun J-I, Lau LF. (2018) Resolution of organ fibrosis. *J Clin Invest*, 128: 97-107
8. Moore-Morris T, Guimarães-Camboa N, Banerjee I, Zambon AC, Kisseleva T, Velayoudon A, Stallcup WB, Gu Y, Dalton ND, Cedenilla M. (2014) Resident fibroblast lineages mediate pressure overload–induced cardiac fibrosis. *J Clin Invest*, 124: 2921-2934
9. Sato Y, Yanagita M. (2017) Resident fibroblasts in the kidney: a major driver of fibrosis and inflammation. *Inflammation and regeneration*, 37: 17
10. Hinz B, Celetta G, Tomasek JJ, Gabbiani G, Chaponnier C. (2001) Alpha-smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity. *Mol Biol Cell*, 12: 2730-2741
11. Hinz B, Dugina V, Ballestrem C, Wehrle-Haller B, Chaponnier C. (2003) Alpha-smooth muscle actin is crucial for focal adhesion maturation in myofibroblasts. *Mol Biol Cell*, 14: 2508-2519
12. McDougall S, Dallon J, Sherratt J, Maini P. (2006) Fibroblast migration and collagen deposition during dermal wound healing: mathematical modelling and clinical implications. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 364: 1385-1405

13. Sziksz E, Veres-Székely A, Pap D, Fekete A, Veres G, Tulassay T, Szabó A, Vannay Á. (2014) Mucosal architectural rearrangement in coeliac disease. *International Journal of Celiac Disease*, 2: 89-92
14. Freitas-Rodriguez S, Folgueras AR, Lopez-Otin C. (2017) The role of matrix metalloproteinases in aging: Tissue remodeling and beyond. Elsevier
15. Cox TR, Erler JT. (2011) Remodeling and homeostasis of the extracellular matrix: implications for fibrotic diseases and cancer. *Dis Model Mech*, 4: 165-178
16. D NIOHNo, KD. (2018) 2018 USRDS Annual Data Report: Epidemiology of Kidney Disease in the United States.
17. Webster AC, Nagler EV, Morton RL, Masson P. (2017) Chronic kidney disease. *The lancet*, 389: 1238-1252
18. Duffield JS. (2014) Cellular and molecular mechanisms in kidney fibrosis. *J Clin Invest*, 124: 2299-2306
19. Liu Y. (2011) Cellular and molecular mechanisms of renal fibrosis. *Nat Rev Nephrol*, 7: 684-696
20. Djudjaj S, Boor P. (2019) Cellular and molecular mechanisms of kidney fibrosis. *Molecular aspects of medicine*, 65: 16-36
21. Genovese F, Manresa AA, Leeming DJ, Karsdal MA, Boor P. (2014) The extracellular matrix in the kidney: a source of novel non-invasive biomarkers of kidney fibrosis? *Fibrogenesis & tissue repair*, 7: 4
22. Rieder F, Brenmoehl J, Leeb S, Scholmerich J, Rogler G. (2007) Wound healing and fibrosis in intestinal disease. *Gut*, 56: 130-139
23. Lawrance IC, Rogler G, Bamias G, Breynaert C, Florholmen J, Pellino G, Reif S, Specca S, Latella G. (2017) Cellular and Molecular Mediators of Intestinal Fibrosis. *J Crohns Colitis*, 11: 1491-1503
24. Roncoroni L, Elli L, Bardella MT, Perrucci G, Ciulla M, Lombardo V, Tomba C, Conte D, Doneda L. (2013) Extracellular matrix proteins and displacement of cultured fibroblasts from duodenal biopsies in celiac patients and controls. In *J Transl Med* Vol. 11 p. 91
25. Roncoroni L, Elli L, Doneda L, Piodi L, Ciulla MM, Paliotti R, Bardella MT. (2009) Isolation and culture of fibroblasts from endoscopic duodenal biopsies of celiac patients. *J Transl Med*, 7: 40

26. Ferretti G, Bacchetti T, Masciangelo S, Saturni L. (2012) Celiac Disease, Inflammation and Oxidative Damage: A Nutrigenetic Approach. In *Nutrients* Vol. 4 pp. 243-257
27. Moretti S, Mrakic-Sposta S, Roncoroni L, Vezzoli A, Dellanoce C, Monguzzi E, Branchi F, Ferretti F, Lombardo V, Doneda L. (2018) Oxidative stress as a biomarker for monitoring treated celiac disease. *Clinical and translational gastroenterology*, 9:
28. Guan G, Lan S. (2018) Implications of antioxidant systems in inflammatory bowel disease. *BioMed research international*, 2018:
29. Koutroubakis IE, Malliaraki N, Dimoulios PD, Karmiris K, Castanas E, Kouroumalis EA. (2004) Decreased total and corrected antioxidant capacity in patients with inflammatory bowel disease. *Digestive diseases and sciences*, 49: 1433-1437
30. Alatab S, Sepanlou SG, Ikuta K, Vahedi H, Bisignano C, Safiri S, Sadeghi A, Nixon MR, Abdoli A, Abolhassani H. (2020) The global, regional, and national burden of inflammatory bowel disease in 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology*, 5: 17-30
31. Perrin BJ, Ervasti JM. (2010) The actin gene family: function follows isoform. *Cytoskeleton (Hoboken)*, 67: 630-634
32. Khaitlina SY. (2001) Functional specificity of actin isoforms.
33. Skrubber K, Read T-A, Vitriol EA. (2018) Reconsidering an active role for G-actin in cytoskeletal regulation. *Journal of cell science*, 131:
34. Axtner J, Sommer S. (2009) Validation of internal reference genes for quantitative real-time PCR in a non-model organism, the yellow-necked mouse, *Apodemus flavicollis*. *BMC Res Notes*, 2: 264-264
35. Kotenko SV. (2002) The family of IL-10-related cytokines and their receptors: related, but to what extent? *Cytokine Growth Factor Rev*, 13: 223-240
36. Wolk K, Kunz S, Asadullah K, Sabat R. (2002) Cutting edge: immune cells as sources and targets of the IL-10 family members? *J Immunol*, 168: 5397-5402
37. Andoh A, Shioya M, Nishida A, Bamba S, Tsujikawa T, Kim-Mitsuyama S, Fujiyama Y. (2009) Expression of IL-24, an activator of the

- JAK1/STAT3/SOCS3 cascade, is enhanced in inflammatory bowel disease. *J Immunol*, 183: 687-695
38. Kunz S, Wolk K, Witte E, Witte K, Doecke WD, Volk HD, Sterry W, Asadullah K, Sabat R. (2006) Interleukin (IL)-19, IL-20 and IL-24 are produced by and act on keratinocytes and are distinct from classical ILs. *Exp Dermatol*, 15: 991-1004
 39. Logsdon NJ, Deshpande A, Harris BD, Rajashankar KR, Walter MR. (2012) Structural basis for receptor sharing and activation by interleukin-20 receptor-2 (IL-20R2) binding cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109: 12704-12709
 40. Parrish-Novak J, Xu W, Brender T, Yao L, Jones C, West J, Brandt C, Jelinek L, Madden K, McKernan PA, Foster DC, Jaspers S, Chandrasekher YA. (2002) Interleukins 19, 20, and 24 signal through two distinct receptor complexes. Differences in receptor-ligand interactions mediate unique biological functions. *J Biol Chem*, 277: 47517-47523
 41. Persaud L, De Jesus D, Brannigan O, Richiez-Paredes M, Huaman J, Alvarado G, Riker L, Mendez G, Dejoie J, Sauane M. (2016) Mechanism of action and applications of interleukin 24 in immunotherapy. *International journal of molecular sciences*, 17: 869
 42. Rutz S, Wang X, Ouyang W. (2014) The IL-20 subfamily of cytokines--from host defence to tissue homeostasis. *Nat Rev Immunol*, 14: 783-795
 43. Pap D, Sziksz E, Kiss Z, Rokonay R, Veres-Szekely A, Lippai R, Takacs IM, Kis E, Fekete A, Reusz G, Szabo AJ, Vannay A. (2017) Microarray Analysis Reveals Increased Expression of Matrix Metalloproteases and Cytokines of Interleukin-20 Subfamily in the Kidneys of Neonate Rats Underwent Unilateral Ureteral Obstruction: A Potential Role of IL-24 in the Regulation of Inflammation and Tissue Remodeling. *Kidney Blood Press Res*, 42: 16-32
 44. Bonifati V, Rizzu P, Van Baren MJ, Schaap O, Breedveld GJ, Krieger E, Dekker MC, Squitieri F, Ibanez P, Joosse M. (2003) Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science*, 299: 256-259
 45. Kahle PJ, Waak J, Gasser T. (2009) DJ-1 and prevention of oxidative stress in Parkinson's disease and other age-related disorders. *Free Radical Biology and Medicine*, 47: 1354-1361

46. Ariga H, Iguchi-Ariga SM. (2017) *DJ-1/PARK7 Protein: Parkinson's Disease, Cancer and Oxidative Stress-Induced Diseases* Vol. 1037, Springer
47. Vörös P, Sziksz E, Himer L, Ónody A, Pap D, Frivolt K, Szebeni B, Lippai R, Gyórfy H, Fekete A. (2013) Expression of PARK7 is increased in celiac disease. *Virchows Archiv*, 463: 401-408
48. Dubois PC, Trynka G, Franke L, Hunt KA, Romanos J, Curtotti A, Zhernakova A, Heap GA, Ádány R, Aromaa A. (2010) Multiple common variants for celiac disease influencing immune gene expression. *Nature genetics*, 42: 295
49. Anderson CA, Boucher G, Lees CW, Franke A, D'Amato M, Taylor KD, Lee JC, Goyette P, Imielinski M, Latiano A. (2011) Meta-analysis identifies 29 additional ulcerative colitis risk loci, increasing the number of confirmed associations to 47. *Nature genetics*, 43: 246
50. Saito Y. (2014) Oxidized DJ-1 as a possible biomarker of Parkinson's disease. *Journal of clinical biochemistry and nutrition*, 13-108
51. Hijioka M, Inden M, Yanagisawa D, Kitamura Y. (2017) DJ-1/PARK7: a new therapeutic target for neurodegenerative disorders. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 40: 548-552
52. Nagakubo D, Taira T, Kitaura H, Ikeda M, Tamai K, Iguchi-Ariga SM, Ariga H. (1997) DJ-1, a novel oncogene which transforms mouse NIH3T3 cells in cooperation withras. *Biochemical and biophysical research communications*, 231: 509-513
53. Cooper HS, Murthy SN, Shah RS, Sedergran DJ. (1993) Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab Invest*, 69: 238-249
54. Mateer SW, Cardona J, Marks E, Goggin BJ, Hua S, Keely S. (2016) Ex vivo intestinal sacs to assess mucosal permeability in models of gastrointestinal disease. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, e53250
55. Lange S, Delbro D, Jennische E. (1994) Evans blue permeation of intestinal mucosa in the rat. *Scand J Gastroenterol*, 29: 38-46
56. Fasano A, Araya M, Bhatnagar S, Cameron D, Catassi C, Dirks M, Mearin ML, Ortigosa L, Phillips A. (2008) Federation of International Societies of Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition consensus report on celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 47: 214-219

57. Korzeniewski C, Callewaert DM. (1983) An enzyme-release assay for natural cytotoxicity. *J Immunol Methods*, 64: 313-320
58. Gonzalez A, Santofimia-Castaño P, Rivera-Barreno R, Salido GM. (2012) Cinnamtannin B-1, a natural antioxidant that reduces the effects of H₂O₂ on CCK-8-evoked responses in mouse pancreatic acinar cells. *J Physiol Biochem*, 68: 181-191
59. ImageJ - Image Processing and Analysis in Java. <http://rsb.info.nih.gov/ij/>.
60. NCBI Reference Sequence Database. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>.
61. Bechtel W, McGoohan S, Zeisberg EM, Müller GA, Kalbacher H, Salant DJ, Müller CA, Kalluri R, Zeisberg M. (2010) Methylation determines fibroblast activation and fibrogenesis in the kidney. *Nat Med*, 16: 544-550
62. Zeisberg EM, Tarnavski O, Zeisberg M, Dorfman AL, McMullen JR, Gustafsson E, Chandraker A, Yuan X, Pu WT, Roberts AB, Neilson EG, Sayegh MH, Izumo S, Kalluri R. (2007) Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nat Med*, 13: 952-961
63. Hecker L, Vittal R, Jones T, Jagirdar R, Luckhardt TR, Horowitz JC, Pennathur S, Martinez FJ, Thannickal VJ. (2009) NADPH oxidase-4 mediates myofibroblast activation and fibrogenic responses to lung injury. *Nat Med*, 15: 1077-1081
64. Henderson NC, Arnold TD, Katamura Y, Giacomini MM, Rodriguez JD, McCarty JH, Pellicoro A, Raschperger E, Betsholtz C, Ruminski PG, Griggs DW, Prinsen MJ, Maher JJ, Iredale JP, Lacy-Hulbert A, Adams RH, Sheppard D. (2013) Targeting of α v integrin identifies a core molecular pathway that regulates fibrosis in several organs. *Nat Med*, 19: 1617-1624
65. Hao S, He W, Li Y, Ding H, Hou Y, Nie J, Hou FF, Kahn M, Liu Y. (2011) Targeted inhibition of β -catenin/CBP signaling ameliorates renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol*, 22: 1642-1653
66. LeBleu VS, Teng Y, O'Connell JT, Charytan D, Müller GA, Müller CA, Sugimoto H, Kalluri R. (2013) Identification of human epididymis protein-4 as a fibroblast-derived mediator of fibrosis. *Nat Med*, 19: 227-231
67. Zeybel M, Hardy T, Wong YK, Mathers JC, Fox CR, Gackowska A, Oakley F, Burt AD, Wilson CL, Anstee QM, Barter MJ, Masson S, Elsharkawy AM, Mann

- DA, Mann J. (2012) Multigenerational epigenetic adaptation of the hepatic wound-healing response. *Nat Med*, 18: 1369-1377
68. Livak KJ, Schmittgen TD. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods*, 25: 402-408
69. Mukaka MM. (2012) Statistics corner: A guide to appropriate use of correlation coefficient in medical research. *Malawi Med J*, 24: 69-71
70. Akoglu H. (2018) User's guide to correlation coefficients. *Turkish journal of emergency medicine*, 18: 91-93
71. Ruan W, Lai M. (2007) Actin, a reliable marker of internal control? *Clinica Chimica Acta*, 385: 1-5
72. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 51 Pt 1: 263-273
73. Dieffenbach CW, Lowe TM, Dveksler GS. (1993) General concepts for PCR primer design. *PCR Methods Appl*, 3: S30-S37
74. Nolan T, Hands RE, Bustin SA. (2006) Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc*, 1: 1559-1582
75. The Human Protein Atlas - ACTB - <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000075624-ACTB/summary/rna>.
76. The Human Protein Atlas - ACTG1 - <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000184009-ACTG1/summary/rna>.
77. Kashina AS. (2020) Regulation of actin isoforms in cellular and developmental processes. In *Seminars in Cell & Developmental Biology*, Elsevier
78. Zhang Q, Wang J, Deng F, Yan Z, Xia Y, Wang Z, Ye J, Deng Y, Zhang Z, Qiao M, Li R, Denduluri SK, Wei Q, Zhao L, Lu S, Wang X, Tang S, Liu H, Luu HH, Haydon RC, He T-C, Jiang L. (2015) TqPCR: A Touchdown qPCR Assay with Significantly Improved Detection Sensitivity and Amplification Efficiency of SYBR Green qPCR. *PloS one*, 10: e0132666-e0132666
79. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT. (2009) The

- MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*, 55: 611-622
80. Rokonay R, Veres-Székely A, Szebeni B, Pap D, Lippai R, Béres NJ, Veres G, Szabó AJ, Vannay Á. (2020) Role of IL-24 in the mucosal remodeling of children with coeliac disease. *J Transl Med*, 18: 36-36
 81. Pap D, Veres-Székely A, Szebeni B, Rokonay R, Ónody A, Lippai R, Takács IM, Tislér A, Kardos M, Oswald F, Fekete A, Szabó AJ, Vannay Á. (2020) Characterization of IL-19, -20, and -24 in acute and chronic kidney diseases reveals a pro-fibrotic role of IL-24. *J Transl Med*, 18: 172
 82. Verbeke S, Gotteland M, Fernandez M, Bremer J, Rios G, Brunser O. (2002) Basement membrane and connective tissue proteins in intestinal mucosa of patients with coeliac disease. *J Clin Pathol*, 55: 440-445
 83. Kottler UB, Jünemann AG, Aigner T, Zenkel M, Rummelt C, Schlötzer-Schrehardt U. (2005) Comparative effects of TGF- β 1 and TGF- β 2 on extracellular matrix production, proliferation, migration, and collagen contraction of human Tenon's capsule fibroblasts in pseudoexfoliation and primary open-angle glaucoma. *Experimental eye research*, 80: 121-134
 84. Pap D, Sziksz E, Kiss Z, Rokonay R, Veres-Székely A, Lippai R, Takács IM, Kis É, Fekete A, Reusz G, Szabó AJ, Vannay A. (2017) Microarray Analysis Reveals Increased Expression of Matrix Metalloproteases and Cytokines of Interleukin-20 Subfamily in the Kidneys of Neonate Rats Underwent Unilateral Ureteral Obstruction: A Potential Role of IL-24 in the Regulation of Inflammation and Tissue Remodeling. *Kidney Blood Press Res*, 42: 16-32
 85. Geleilate TJM, Costa RS, Dantas M, Coimbra TM. (2001) Alpha-smooth muscle actin and proliferating cell nuclear antigen expression in focal segmental glomerulosclerosis: functional and structural parameters of renal disease progression. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 34: 985-991
 86. Novakovic ZS, Durdov MG, Puljak L, Saraga M, Ljutic D, Filipovic T, Pastar Z, Bendic A, Vukojevic K. (2012) The interstitial expression of alpha-smooth muscle actin in glomerulonephritis is associated with renal function. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*, 18: CR235

87. Maier T, Güell M, Serrano L. (2009) Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. *FEBS letters*, 583: 3966-3973
88. Odetti P, Valentini S, Aragno I, Garibaldi S, Pronzato MA, Rolandi E, Barreca T. (1998) Oxidative stress in subjects affected by celiac disease. *Free radical research*, 29: 17-24
89. Szaflarska-Popławska A, Siomek A, Czerwionka-Szaflarska M, Gackowski D, Różalski R, Guz J, Szpila A, Zarakowska E, Oliński R. (2010) Oxidatively damaged DNA/oxidative stress in children with celiac disease. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 19: 1960-1965
90. Diosdado B, van Oort E, Wijmenga C. (2005) "Coelionomics": towards understanding the molecular pathology of coeliac disease. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, 43: 685-695
91. Sziksz E, Molnár K, Lippai R, Pap D, Onody A, Veres-Székely A, Vörös P, Szabó D, Györffy H, Veres G, Tulassay T, Vannay A, Arató A. (2014) Peroxisome proliferator-activated receptor- γ and thymic stromal lymphopoietin are involved in the pathophysiology of childhood coeliac disease. *Virchows Arch*, 465: 385-393
92. Kitamura Y, Watanabe S, Taguchi M, Takagi K, Kawata T, Takahashi-Niki K, Yasui H, Maita H, Iguchi-Ariga SM, Ariga H. (2011) Neuroprotective effect of a new DJ-1-binding compound against neurodegeneration in Parkinson's disease and stroke model rats. *Molecular neurodegeneration*, 6: 48
93. Takahashi-Niki K, Inafune A, Michitani N, Hatakeyama Y, Suzuki K, Sasaki M, Kitamura Y, Niki T, Iguchi-Ariga SM, Ariga H. (2015) DJ-1-dependent protective activity of DJ-1-binding compound no. 23 against neuronal cell death in MPTP-treated mouse model of Parkinson's disease. *Journal of pharmacological Sciences*, 127: 305-310
94. Yanagisawa D, Kitamura Y, Inden M, Takata K, Taniguchi T, Morikawa S, Morita M, Inubushi T, Tooyama I, Taira T. (2008) DJ-1 protects against neurodegeneration caused by focal cerebral ischemia and reperfusion in rats. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 28: 563-578
95. Inden M, Taira T, Kitamura Y, Yanagida T, Tsuchiya D, Takata K, Yanagisawa D, Nishimura K, Taniguchi T, Kiso Y. (2006) PARK7 DJ-1 protects against

- degeneration of nigral dopaminergic neurons in Parkinson's disease rat model. *Neurobiology of disease*, 24: 144-158
96. Singh Y, Chen H, Zhou Y, Föllner M, Mak TW, Salker MS, Lang F. (2015) Differential effect of DJ-1/PARK7 on development of natural and induced regulatory T cells. *Scientific reports*, 5: 1-14
 97. Yang J, Kim MJ, Yoon W, Kim EY, Kim H, Lee Y, Min B, Kang KS, Son JH, Park HT. (2017) Isocitrate protects DJ-1 null dopaminergic cells from oxidative stress through NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase (IDH). *PLoS genetics*, 13: e1006975
 98. Shi SY, Lu S-Y, Sivasubramaniyam T, Revelo XS, Cai EP, Luk CT, Schroer SA, Patel P, Kim RH, Bombardier E. (2015) DJ-1 links muscle ROS production with metabolic reprogramming and systemic energy homeostasis in mice. *Nature communications*, 6: 1-12
 99. Ma Q. (2013) Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 53: 401-426
 100. Raninga PV, Di Trapani G, Tonissen KF. (2017) The multifaceted roles of DJ-1 as an antioxidant. In *DJ-1/PARK7 Protein* pp. 67-87, Springer
 101. Bensaad K, Vousden KH. (2007) p53: new roles in metabolism. *Trends in cell biology*, 17: 286-291
 102. Liu D, Xu Y. (2011) p53, oxidative stress, and aging. *Antioxidants & redox signaling*, 15: 1669-1678
 103. Wei C-L, Wu Q, Vega VB, Chiu KP, Ng P, Zhang T, Shahab A, Yong HC, Fu Y, Weng Z. (2006) A global map of p53 transcription-factor binding sites in the human genome. *Cell*, 124: 207-219
 104. Kato I, Maita H, Takahashi-Niki K, Saito Y, Noguchi N, Iguchi-Ariga SM, Ariga H. (2013) Oxidized DJ-1 inhibits p53 by sequestering p53 from promoters in a DNA-binding affinity-dependent manner. *Molecular and cellular biology*, 33: 340-359
 105. Rao R. (2008) Oxidative stress-induced disruption of epithelial and endothelial tight junctions. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, 13: 7210

106. Ivanov AI, Parkos CA, Nusrat A. (2010) Cytoskeletal regulation of epithelial barrier function during inflammation. *The American journal of pathology*, 177: 512-524
107. Wang D, Naydenov NG, Feygin A, Baranwal S, Kuemmerle JF, Ivanov AI. (2016) Actin-depolymerizing factor and cofilin-1 have unique and overlapping functions in regulating intestinal epithelial junctions and mucosal inflammation. *The American journal of pathology*, 186: 844-858
108. Lee SH. (2015) Intestinal permeability regulation by tight junction: implication on inflammatory bowel diseases. *Intestinal research*, 13: 11
109. Higashiyama T, Katsuyama A, Otori H, Kamimura T, Uehara A, Kainuma M, Takumi R, Kudo Y, Ebina M, Mochitate K. (2014) Detection of cellular damage by hydrogen peroxide using SV40-T2 cells on shear horizontal surface acoustic wave (SH-SAW) sensor. *Ultrasonics*, 54: 1430-1438
110. Schumann M, Siegmund B, Schulzke JD, Fromm M. (2017) Celiac disease: role of the epithelial barrier. *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology*, 3: 150-162

10. Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés témájában megjelent eredeti közlemények:

- **Veres-Szekely A**, Pap D, Sziksz E, Javorszky E, Rokonay R, Lippai R, Tory K, Fekete A, Tulassay T, Szabo AJ, Vannay A. (2017) Selective measurement of alpha smooth muscle actin: why beta-actin can not be used as a housekeeping gene when tissue fibrosis occurs. *BMC Mol Biol*, 18: 12 (*IF: 2,795*)
- Pap D, Sziksz E, Kiss Z, Rokonay R, **Veres-Szekely A**, Lippai R, Takacs IM, Kis E, Fekete A, Reusz G, Szabo AJ, Vannay A. (2017) Microarray Analysis Reveals Increased Expression of Matrix Metalloproteases and Cytokines of Interleukin-20 Subfamily in the Kidneys of Neonate Rats Underwent Unilateral Uréteral Obstruction: A Potential Role of IL-24 in the Regulation of Inflammation and Tissue Remodeling. *Kidney & Blood Pressure Research*, 42: 16-32 (*IF: 3,000*)
- Rokonay R, **Veres-Székely A**, Szebeni B, Pap D, Lippai R, Béres NJ, Veres G, Szabó AJ, Vannay Á. (2020) Role of IL-24 in the mucosal remodeling of children with coeliac disease. *J Transl Med*, 18: 36-36 (*IF: 4,124*)
- Pap D, **Veres-Székely A**, Szebeni B, Rokonay R, Ónody A, Lippai R, Takács IM, Tislér A, Kardos M, Oswald F, Fekete A, Szabó AJ, Vannay Á. (2020) Characterization of IL-19, -20, and -24 in acute and chronic kidney diseases reveals a pro-fibrotic role of IL-24. *J Transl Med*, 18: 172 (*IF: 4,124*)
- **Veres-Székely A**, Bernáth M, Pap D, Rokonay R, Szebeni B, Takács I M, Lippai R, Cseh Á, Szabó A J, Vannay Á. (2020). PARK7 diminishes oxidative stress-induced mucosal damage in celiac disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020: 4787202 (*IF: 5,076*)

Az értekezés témájában benyújtott szabadalom:

- Vannay Á, Pap D, Szebeni B, **Veres-Székely A**. (2020) Gyulladásgátló Vegyületek És Alkalmazásaik/Anti- Inflammatory Compounds And Uses Thereof - COMP23-analógok és rokon vegyületek gyulladás ellenes hatása, Európai szabadalom

Az értekezés témájában megjelent összefoglaló közlemények:

- Pap D, **Veres-Székely A**, Szebeni B, Sziksz E, Kiss Z, Takács IM, Reusz G, Szabó JA, Vannay Á. (2019) Az IL-10 citokin család szerepe a vesefibrózisban. *Hypertonia és Nephrologia*, 23: 167-170.
- **Veres-Székely A**, Sziksz E, Takács IM, Veres G, Szabó JA, Vannay Á. (2016) A gyulladáscsökkentő bélbetegségek kísérletes állatmodelljei. *Gyermekgyógyászat*, 67: 136-138.
- **Veres-Székely A**, Pap D, Sziksz E, Ádám V. (2014) Immunhisztokémiai eljárások a klinikai és az alapkutatásban. *Gyermekgyógyászat*, 65: 301-364.
- Rokony R, Sziksz E, Lippai R, Pap D, **Veres-Székely A**, Reusz G, Szabó A, Vannay Á. (2014) A vesefibrózisban szerepet játszó szignalizációs útvonalak. *Hypertonia és Nephrologia*, 18: 72-57.
- Sziksz E, **Veres-Székely A**, Pap D, Fekete A, Veres G, Tulassay T, Szabó A, Vannay Á. (2014) Mucosal architectural rearrangement in coeliac disease. *International Journal of Celiac Disease*, 2: 89-92.

Egyéb – nem az értekezés témájában megjelent közlemények:

- Hosszu A, Antal Z, **Veres-Szekely A**, Lenart L, Balogh DB, Szkibinszkij E, Illesy L, Hodrea J, Banki NF, Wagner L, Vannay A, Szabo AJ, Fekete A. (2018) The role of Sigma-1 receptor in sex-specific heat shock response in an experimental rat model of renal ischaemia/reperfusion injury. *Transpl Int*, 31: 1268-1278 (*IF: 3,526*)
- Judit Béres N, Kiss Z, Müller KE, Cseh Á, **Veres-Székely A**, Lippai R, Benkő R, Bartha Á, Heininger S, Vannay Á, Sziksz E, Veres G, Horváth EM. (2018) Role of microRNA-223 in the regulation of poly(ADP-ribose) polymerase in pediatric patients with Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol*, 53: 1066-1073 (*IF: 2,152*)
- Lenart L, Hodrea J, Hosszu A, Koszegi S, Zelena D, Balogh D, Szkibinszkij E, **Veres-Szekely A**, Wagner L, Vannay A, Szabo AJ, Fekete A. (2016) The role of sigma-1 receptor and brain-derived neurotrophic factor in the development of diabetes and comorbid depression in streptozotocin-induced diabetic rats. *Psychopharmacology*, 233: 1269-1278 (*IF: 3,308*)

- Sziksz E, Molnar K, Lippai R, Pap D, Onody A, **Veres-Szekely A**, Voeroes P, Szabo D, Gyorffy H, Veres G, Tulassay T, Vannay A, Arato A. (2014) Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and thymic stromal lymphopoietin are involved in the pathophysiology of childhood coeliac disease. *Virchows Archiv*, 465: 385-393 (*IF*: 2,651)
- Béres N, Sziksz E, Vannay Á, Szabó D, Pap D, **Veres-Székely A**, Arató A, Szabó A, Veres G. (2014) Role of the microbiome in celiac disease. *International Journal of Celiac Disease*, 2: 150-153.
- Lippai R, **Veres-Székely A**, Sziksz E, Szebeni B, Ónody A, Pap D, Veres G, Arató A, Tulassay T, Vannay Á. (2013) A hősokk fehérjék szerepe coeliakiában. *Orvoskepzés*, 88: 286-291.

11. Köszönetnyilvánítás

Az elmúlt évek során számos ember támogatása segített abban, hogy eljussak a disszertációm megírásához, a doktori fokozatszerzéshez. Legnagyobb köszönettel témavezetőmnek, Dr. Vannay Ádámnak tartozom, aki egy évtizeddel ezelőtt szárnyai alá vett. Hálás vagyok a rengeteg hasznos szakmai segítségért, tanácsért, iránymutatásért és szemléletformálásért.

Köszönöm Dr. Szabó Attila és Dr. Tulassay Tivadar professzor uraknak, hogy munkámat az I. számú Gyermekgyógyászati Klinika Kutatólaboratóriumában végezhettem.

Hálás vagyok az elmúlt évekért kollégáimnak, barátaimnak, Pap Domonkosnak és Bernáth Máriának. Köszönöm a támogatást az I. számú Gyermekgyógyászati Klinika Kutatólaboratóriumának egykori és jelenlegi munkatársainak, hallgatótársaimnak: Dr. Lippai Ritának, Dr. Sziksz Ernának, Dr. Ónody Annának, Kiss Zoltánnak, Dr. Pajtók Csengének, Dr. Lévai Eszternek, Takács István Mártonnak, Dr. Szebeni Beátának, Kőszegi Sándornak, Dr. Hosszú Ádámnak, Dr. Lénárt Lillának, Balogh Dórának, Dr. Fekete Andreának, Dr. Béres Nórának, Dr. Cseh Áronnak, Dr. Jávorszky Eszternek, Dr. Tory Kálmánnak.

Végül, de nem utolsó sorban köszönetemet szeretném kifejezni családomnak a támogatásért. Külön köszönöm feleségemnek, Rokonay Rékának végtelen türelmét, a közös munkát, hogy meghallgatta a leghetlenebb időben eszembe jutó ötleteket, hogy folyamatosan partnerem a szakmai kérdések megvitatásában, s mindemellett biztosította a kutatómunkám végzéséhez és disszertációm létrejöttéhez a nyugodt háttérrel.