

Új molekulák és jelátviteli folyamatok fibrotikus elváltozásokban

Doktori értekezés

Dr. Péterfi Zalán

Semmelweis Egyetem
Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola



- Témavezető: Dr. Geiszt Miklós egyetemi docens
- Hivatalos bírálók: Dr. Kiss András egyetemi docens, PhD
Dr. Bácsi Attila, egyetemi docens, PhD
- Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Falus András, egyetemi tanár, az MTA rendes tagja
- Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Arányi Tamás, tudományos főmunkatárs, PhD
Dr. Bánhegyi Gábor, egyetemi tanár, az MTA doktora

Budapest
2012

1. Tartalomjegyzék

| | |
|---|-----------|
| 1. Tartalomjegyzék..... | 2 |
| 2. Rövidítések jegyzéke | 5 |
| 3. Bevezetés | 8 |
| 3.1. Fibrózis | 8 |
| 3.1.1. Sebgyógyulás és fibrózis | 8 |
| 3.1.2. A myofibroblasztok eredete | 10 |
| 3.1.3. A myofibroblasztok kialakulásának szabályozása | 11 |
| 3.1.4. Az ECM átalakulás fibrózisban reverzibilis? | 14 |
| 3.1.5. Szöveti remodeling szívbetegségekben | 15 |
| 3.2. Az EMT és tubulointersticiális fibrózis | 16 |
| 3.2.1. Epitheliális mesenchymális átalakulás LLC-PK1/AT1 sejtekben..... | 19 |
| 3.2.2. Az MRTF és SRF transzkripciós faktorok | 20 |
| 3.3. Peroxidáz enzimek..... | 22 |
| 3.3.1. A peroxidázok általános jellemzése | 22 |
| 3.3.2. A NOX fehérjék és peroxidázok kapcsolata..... | 24 |
| 3.3.2.1. A NOX2 | 25 |
| 3.3.2.2. A Duox enzimek..... | 26 |
| 3.3.3. A myeloperoxidáz..... | 30 |
| 3.3.4. Az eozinofil peroxidáz..... | 33 |
| 3.3.5. A laktoperoxidáz..... | 34 |
| 3.3.6. A thyroperoxidáz | 36 |
| 3.3.7. A ciklooxygenáz enzimek | 38 |
| 3.3.8. A peroxidazin fehérjék | 39 |
| 3.3.8.1. A peroxidazin fehérjék szerkezete | 39 |
| 3.3.8.2. A peroxidazin expressziója különböző speciesekben | 43 |
| 3.3.8.3. A peroxidazin fehérjék funkciói..... | 46 |
| 4. Célkitűzések | 48 |
| 5. Anyagok és módszerek..... | 49 |
| 5.1. Munkánk során használt anyagok:..... | 49 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 5.2. | Anti-PXDN és PXDNL ellenanyag | 49 |
| 5.3. | Sejtkultúra | 50 |
| 5.4. | PXDN siRNS szekvenciák..... | 51 |
| 5.5. | Western blot kísérletek | 51 |
| 5.6. | Peroxidáz aktivitás mérése..... | 52 |
| 5.7. | H ₂ O ₂ -mérés Amplex Red módszerrel | 52 |
| 5.8. | Immunfluoreszcens jelölés és konfokális lézer mikroszkópia..... | 52 |
| 5.9. | Az MRTF proteinek nukleáris/citoszolikus megoszlásának vizsgálata..... | 53 |
| 5.10. | Northern blot | 53 |
| 5.11. | <i>In situ</i> hibridizáció..... | 54 |
| 5.12. | A PXDNL klónozása - SMART RACE..... | 55 |
| 5.13. | Génexpressziós kísérletek | 56 |
| 5.14. | Állatkísérletek | 57 |
| 5.15. | Statisztikai analízis..... | 58 |
| 6. | Eredmények..... | 59 |
| 6.1. | Az MRTF transzkripciós faktorok szerepe az epitheliális mesenchymális tranzícióban..... | 59 |
| 6.1.1. | Az MRTF transzkripciós faktorok lokalizációja | 59 |
| 6.1.2. | A Rho kis G-fehérje hatása az MRTF-B lokalizációjára..... | 61 |
| 6.1.3. | Az aktin polimerizáció hatása az MRTF-B lokalizációjára..... | 62 |
| 6.1.4. | A kontaktsérülés hatása az MRTF-B sejten belüli elhelyezkedésére | 62 |
| 6.2. | A PXDN fehérje jellemzése..... | 64 |
| 6.2.1. | Az endogénen kifejeződő PXDN vizsgálata | 64 |
| 6.2.2. | A PXDN expressziójának indukciója tüdő- és bőrfibroblasztokban..... | 65 |
| 6.2.3. | A peroxidazin lokalizációja az extracelluláris mátrixban..... | 67 |
| 6.2.4. | A H ₂ O ₂ és a peroxidáz aktivitás szerepe a PXDN szekréciójában és lokalizációjában..... | 70 |
| 6.2.5. | A PXDN expressziója fokozódik egy egér vesefibrózis modellben..... | 71 |
| 6.3. | Egy új szívspecifikus fehérje jellemzése | 73 |
| 6.3.1. | A PXDNL azonosítása | 73 |
| 6.3.2. | A PXDNL expressziós mintázata | 73 |
| 6.3.3. | A PXDNL szerkezete | 74 |
| 6.3.4. | A PXDNL jellemzése transzfektált sejtekben | 75 |

| | | |
|------------|---|------------|
| 6.3.5. | Az endogén módon kifejeződő PXDNL lokalizációja | 77 |
| 6.3.6. | A PXDNL expressziója fokozódik dilatatív cardiomyopathiában | 78 |
| 6.3.7. | A PXDNL oligomerizációjának vizsgálata | 79 |
| 6.3.8. | Fehérjekapcsolat a PXDN és a PXDNL között | 81 |
| 7. | Megbeszélés..... | 82 |
| 7.1. | Új szereplők az epitheliális mesenchymális tranzícióban..... | 82 |
| 7.2. | A myofibroblasztok egy új extracelluláris mátrix képző mechanizmusa | 83 |
| 7.3. | Egy új szívspecifikus fehérje jellemzése | 87 |
| 8. | Következtetések | 90 |
| 9. | Összefoglalás | 92 |
| 10. | Summary | 93 |
| 11. | Irodalomjegyzék | 94 |
| 12. | Saját közlemények jegyzéke | 112 |
| 13. | Köszönetnyilvánítás | 113 |

2. Rövidítések jegyzéke

- ASD: elülső szegmentum diszgenezis
BSA: szarvasmarha szérum albumin
CHO: kínai hörcsög ovárium sejtvonal
COS-7: CV-1 (simian) in Origin carrying the SV40 genetic material
C-terminális: karboxi-terminális
CTGF: kötőszöveti növekedés faktor
CYBA: p22phox-ot kódoló gén
CYBB: gp91phox-ot kódoló gén
DNS: dezoxiribonukleinsav
DPI: difenil-jodónium
Duox: dual oxidase, kettős oxidáz
Duoxa: Duox activator, Duox aktivátor
ECM: extracelluláris mátrix
EF-hand: kalcium-kötő motívum
EMT: epithelial-mesenchymal transition, epitheliális mesenchymális tranzíció
EPO: eosinophil peroxidase, eozinofil peroxidáz
ER: endoplazmatikus retikulum
FAD: flavin-adenin-dinukleotid
FBS: fetalis borjú szérum
fMLP: N-formil-L-metionil-L-leucil-L-fenilalanin
GAP: GTPase activating protein
GDP: guanozin-difoszfát
GTP: guanozin-trifoszfát
HEK 293: human embrionic kidney, humán embrionális vese sejtvonal
HOCl: hipoklórossav
HPLC: high performance liquid chromatography
HRP: horse reddish peroxidase, tormaperoxidáz
IFN γ : interferon-gamma
IL: interleukin

LAP: latency associated protein
LPO: laktoperoxidáz
LPS: lipopoliszacharid
LRR: leucin rich repeats, leucin-gazdag régió
MLC: myosin könnyű lánc
MLCK: miozin könnyű lánc kináz
MMP: mátrix metalloproteáz
MPO: myeloperoxidáz
mRNS: messenger RNA, hírvivő RNS
MRTF: myocardin szerű transzkripciós faktor
NADH: redukált nikotinamid-adenin-dinukleotid
NADPH: redukált nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát
NF- κ B: nukleáris faktor κ B
NIS: nátrium jodid szinporter
Nox: NADPH-oxidáz
N-terminális: amino-terminális
 $O_2^{\cdot-}$: szuperoxid
OSCN $^-$: hipotiocianát
PAMP: patogénhez asszociált molekuláris mintázat
PBS: foszfát-pufferelt sóoldat
PDGF: trombocyta eredetű növekedési faktor
PDI: protein diszulfid izomeráz
PRR: pattern recognition receptor, minázat felismerő receptor
PVQ: posterior ventral neuron Q
PXDN/VPO1: peroxidasin, peroxidazin
PXDNL/VPO2: peroxidasin-like
RAAS: renin-angiotensin-aldosteron-system
Rho: Ras homológ protein
RhoGDI: Rho GDP-dissociation inhibitor, Rho GDP-disszociáció inhibitor
RNS: ribonukleinsav
RNSi: RNS interferencia
ROK: Rho kináz

ROS: reactive oxygen species, reaktív oxigén származékok

SCN⁻: tiocianát-ion

SDS: sodium-dodecyl-sulfate, nátrium dodecil-szulfát

Sf9: Spodoptera frugiperda rovar bélhámsejt

SH3: Src homológia 3 domén

siRNS: kis interferáló RNS

SMA: smooth muscle actin, sima izom aktin

Smad: Sma-MAD fehérje

SOD: szuperoxid-dizmutáz

SRE: serum response element, szérum válasz elem

SRF: serum response factor, szérum válasz faktor

T3: trijód-tironin

T4: tiroxin

TGF-β1: transforming growth factor beta 1, transzformáló növekedési faktor-β1

TIF: tubulointersticiális fibrózis

TIMP: szöveti mátrix metalloproteáz inhibitor

TLR: toll-like receptor

TM: transzmembrán domén

TPO: thyroperoxidase, tireoperoxidáz

TSH: pajzsmirigy-stimuláló hormon

Udx1: urchin duox 1, tengerisün Duox1

VEGF: vaszkuláris endotheliális növekedési faktor

VPO1/PXDN: vaszkuláris peroxidáz 1

VPO2/PXDNL: vaszkuláris peroxidáz 2

WB: Western blot

ZO-1: zonula occludens-1

3. Bevezetés

3.1. Fibrózis

A fibrózist gyakran határozzák meg úgy, mint egy olyan sebgyógyulási folyamatot, amely kikerül a normális szöveti kontroll alól ¹. A sérült szövetek regenerációja esszenciális az élő többsejtes szervezetek túlélése szempontjából, amely során a sérült vagy elhalt sejtek egy szigorúan szabályozott folyamatban épekre cserélődnek ki. A sérülésnek számtalan akut és krónikus forrása lehet, mint például fertőzések, autoimmun folyamatok, sugárzás, kémiai noxák és mechanikai stressz okozta károsodások. A helyreállítási folyamat alapvetően két úton mehet végbe: Az első típus az úgynevezett regeneratív út, amikor a sérült sejteket a szervezet ugyanolyan sejtekkel pótolja. A második típust, amely akkor jön létre, ha az első út elégtelen vagy valamiért nem lehetséges, és az eredeti szövet kötőszövetes átalakulásával jön létre, fibropláziának vagy fibrotikus sebgyógyulásnak nevezik. Ez a második út kezdetben előnyös a szervezet számára, azonban ha a szabályozása nem megfelelő, az ép szövet irreverzibilisen lecserélődik egy extracelluláris mátrixban (ECM) gazdag, a szövet eredeti funkcióival nem vagy csak részlegesen rendelkező hegyszövetre ². Sok betegségben, például az idiopathiás tüdőfibrózisban, májcirrhosisban, kardiovaszkuláris fibrózisban, és a vese tubulointersticiális fibrózisában ez az extenzív szövet remodeling végül a szerv elégtelenségéhez és halálhoz vezethet. Egyes adatok szerint a fejlett országok összhalálzásának mintegy 45%-áért valamilyen szövet vagy szerv fibrotikus elváltozása tehető felelőssé ¹.

3.1.1. Sebgyógyulás és fibrózis

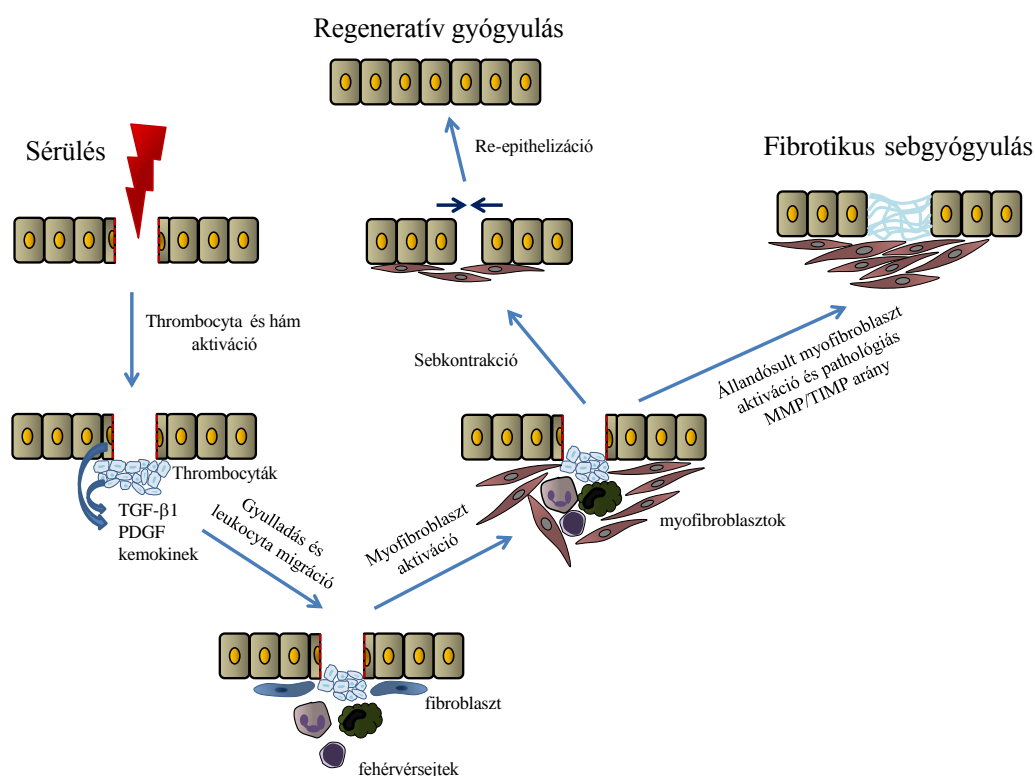
Szöveti sérülés esetén a károsodott epithel és/vagy endothel sejtek gyulladással mediátorokat szekretálnak, és így beindítanak egy koagulációs kaszkádot, melynek eredményeként egy ideiglenes extracelluláris mátrix képződik. A trombocyták kapcsolatba kerülnek extracelluláris mátrix komponensekkel, melyek hatására aktiválódnak, megkezdődik aggregációjuk, és végül thrombust hoznak létre. A trombocyták degranulációja lokális vasodilatációt és megnövekedett érfal-

permeabilitást okoz. Az aktiválódott fibroblasztok az epithel és endothel sejtekkel együtt mátrix metalloproteázokat (MMP) termelnek, melyek hatására lebomlik a bazális membrán, és így nagy mennyiségben jelennek meg a sérülés helyén gyulladásosejtek³. Az epithel és endothel sejtek olyan növekedési faktorokat és citokineket is szekretálnak, melyek segítik lokálisan a fehérvérsejtek proliferációját és migrációját az ideiglenes extracelluláris mátrixban. A sebgyógyulás korai fázisában először neutrofil granulocyták vándorolnak a sérülés helyszínére, majd degranulálódnak. Ezzel párhuzamosan a szöveti makrofágok is aktiválódnak. Ez a két sejttípus távolítja el a szövettörmeléket, az elhalt sejteket, valamint az esetlegesen jelen lévő patogéneket. A fagocytózison túl, ezek a sejtek különböző parakrin mediátorok termelésén keresztül befolyásolni képesek a sebgyógyulási folyamatot. Serkentik a környező endothel sejtek sebkörnyéki proliferációját és migrációját, mely aztán végül új erek képződéséhez vezet. Ezzel párhuzamosan T-sejtek aktiválódnak és profibrotikus citokineket kezdenek el szekretálni, mint például az interleukin 13 (IL-13) és a transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1), amelyek képesek tovább aktiválni a jelenlévő fibroblasztokat és makrofágokat^{4, 5}. Ezek az aktivált fibroblasztok hasonlóan a simaizom aktint expresszáló myofibroblasztokká alakulnak, miközben a sérülés helyére vándorolnak. Myofibroblasztok nem csak fibroblasztokból, hanem más sejttípusokból (csontvelő eredetű mesenchymális sejtek, lokális epithel és endothel sejtek) is kialakulhatnak⁶. Aktiválódás után a myofibroblasztok kontraktilitásuk révén fontos szereplői a seb összehúzásának. Fiziológias körülmények között az utolsó lépése a sebgyógyulásnak az eredeti szöveti struktúra regenerációja, mely során a hámsejtek proliferálnak és a seb közepe felé vándorolva befedik azt. Ha azonban az inzultus krónikusan van jelen, az az ECM túlzott depozíciójával járó permanensen megmaradó hegyszövetet eredményezhet.

(1. Ábra)

Az egyik jellegzetes extracelluláris mátrix fehérjét, a kollagént, az aktivált fibroblasztok és myofibroblasztok szintetizálják és szekretálják a sebgyógyulás során. A kollagén nettó mennyiségét azonban nem csak a szintézis, hanem a lebontás is befolyásolja. Az ECM proteinek féléletidejét az extracelluláris térben a myofibroblasztok, granulocyták, makrofágok által termelt MMP-k és ezek inhibitorai, a TIMP-ek (Tissue Inhibitors of MetalloProteases) szabályozzák. Ha az egyensúly megbomlik az MMP-k és a TIMP-ek között, az az extracelluláris mátrix mennyiségének

változásához vezet⁷. Fibrotikus folyamatok pedig akkor jönnek létre, amikor a myofibroblasztokban az új extracelluláris mátrix komponensek képződésének mértéke meghaladja a degradációt.



1. ábra Sebgyógyulás és fibrózis A sebzés és sebgyógyulás korai közös, valamint a regeneratív és a fibrotikus sebgyógyulás elváló útjai¹.

3.1.2. A myofibroblasztok eredete

Ahogy az előző bekezdésekben olvasható, a myofibroblasztok kulcsszereplői a sebgyógyulás és a fibrózis folyamatának, főleg az extracelluláris mátrix szintézise és kontraktilitásuk miatt. Myofibroblasztok egészséges szövetben elvétve találhatóak meg, így a fibrózis kutatásban mindig is fontos kérdés volt, hogy mi a pontos eredete ezeknek a sejteknek. A probléma a mai napig nem teljesen megoldott, de egyre több a bizonyíték, hogy több progenitor sejtől is kialakulhatnak⁸. Ezek a progenitorok lehetnek rezidens vagy külső, a keringéssel odakerülő sejtek. A pontos eredet egy adott elváltozásban azonban nagyban függ attól, hogy milyen szövet vagy szerv érintett, illetve, hogy pontosan milyen pathológiás folyamat talaján alakul a fibrózis⁹. A

lokálisan jelenlévő mesenchymális sejteken kívül¹⁰, pericyták (perivaszkuláris fibroblasztok)^{11, 12}, lokális mesenchymális őssejtek, csontvelői eredetű fibrocyták (CD45 és kollagén-1 pozitív sejtek)¹³, endothel sejtek^{14, 15} és epithel sejtek¹⁶ is forrásai lehetnek a myofibroblasztoknak. Jól jellemzi a folyamat összetettségét, hogy általában több progenitor sejt párhuzamosan van jelen, így a fibrotikus szövetben aztán különböző myofibroblaszt szubpopulációk alakulhatnak ki. A máj fibrotikus elváltozásában például csontvelő eredetű fibrocyták mellett a csillagsejtek is fontos előalakjai a myofibroblasztoknak¹⁷. A vese esetén pedig a rezidens mesenchymális sejteken és a fibrocytákon kívül az epitheliális mesenchymális tranzíció (EMT) is jelentősen hozzájárul a végül megjelenő myofibroblaszt populációhoz⁸. A fibrotikus szövet kialakulásában fontos különböző szubpopulációk pontos jellemzése, az esetleges különbségek azonosítása azonban még mindig várat magára. Az EMT-t, az epitheliális sejtek átalakulását mesenchymális sejtekké, a dolgozatomban egy későbbi fejezetében még részletesen tárgyalom.

3.1.3. A myofibroblasztok kialakulásának szabályozása

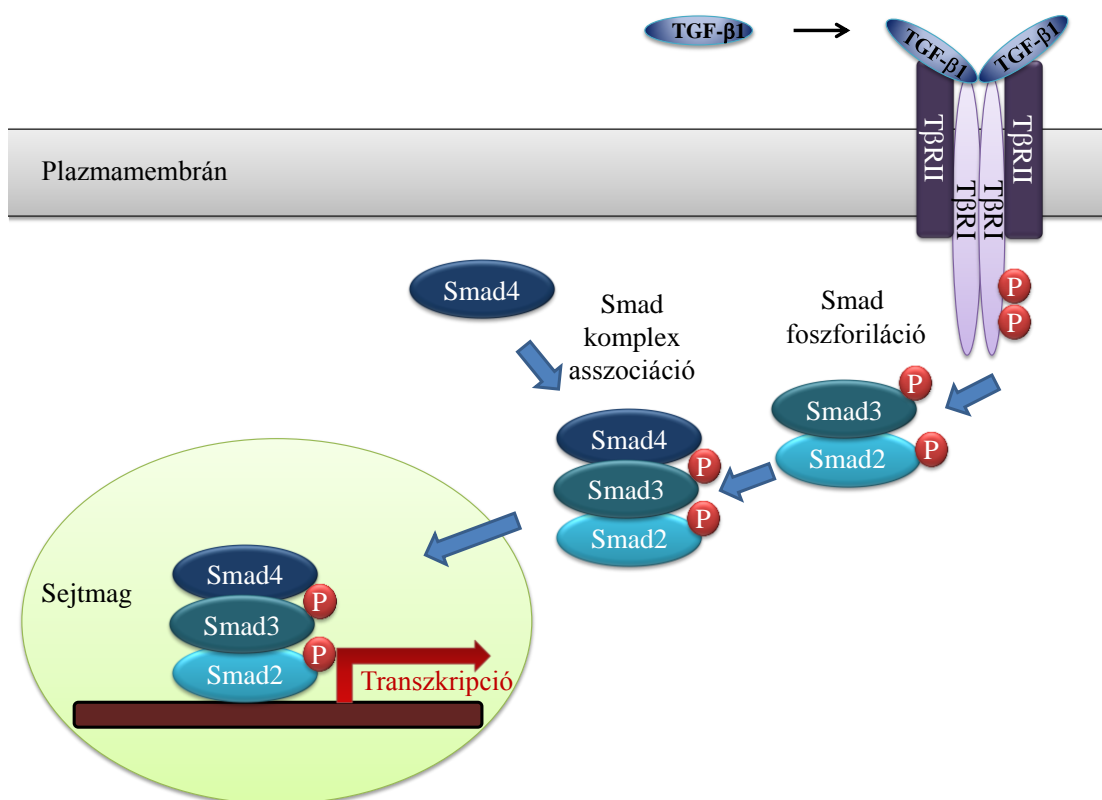
Sok fibrotikus folyamatra jellemző, hogy valamilyen fertőzést követően alakul ki. A fertőzésnek lehet bakteriális, virális, gomba vagy akár többsejtes parazita eredete is, az azonban közös, hogy a kezdeti szakaszt egy krónikus gyulladás, majd fibrózis követi. A krónikus gyulladás során jelentősen megváltozik a rezidens M2 makrofágok és myofibroblasztok aktivitása és kísérletes aktiválhatósága¹⁸. Amennyiben konstansan, viszonylag hosszú ideig vannak a myofibroblasztok és a makrofágok környezetében úgynevezett patogén-asszociált molekuláris mintázatok (pathogen-associated molecular patterns, PAMP), egy magas aktivitású állapotban stabilizálódnak. A PAMP lehet bakteriális lipoprotein, lipopoliszacharid, DNS, dupla-szálú RNS, amelyeket a széles körben expresszáldó, úgynevezett mintázat felismerő receptorok (pattern-recognition receptor, PRR) ismernek fel². A kölcsönhatás a PAMP és a PRR között a szervezet védekező mechanizmusainak első vonalában található, gyors aktivációja azonnali proinflammatorikus citokin és kemokin elválasztást eredményez. A fibroblasztok több PRR-t is expresszálnak, például Toll-like receptorokat (TLR) és ismert, hogy a receptorok aktivációja elősegíti a sejtek átalakulását myofibroblasztokká^{19, 20}.

Természetesen nem minden fibrotikus folyamat háttérében áll fertőzőes etiológia, ezért az előbb tárgyaltaktól független mechanizmusok is szerepelnek a fibroblasztok aktivációjában. Például sclerodermában (szisztémás sclerosis), amely egy ismeretlen etiológiájú szisztémás autoimmun betegség, az érintett bőrterületekről származó fibroblasztok egy fokozott ECM termeléssel, állandó citokin és kemokin termeléssel jellemezhető myofibroblaszt-szerű fenotípust mutattak²¹. A sejtek tulajdonságai nagyon hasonlítanak az *in vitro* TGF- β 1 kezelt fibroblasztokéhoz, ezért valószínűsíthető, hogy az elváltozás háttérében egy folyamatosan aktív autokrin TGF jelátviteli útvonal áll. Azonban fontos megjegyezni, hogy TGF független folyamatokat is feltételeznek a betegség háttérében, mint például autoantitestek képződéséhez vezető virális fertőzések, vagy a kötőszöveti növekedés faktor (connective tissue growth factor, CTGF) rendellenes jelátvitel²². Más közlemények epigenetikai változásokkal hozzák összefüggésbe a betegséget²³, de felvetették már lehetőségét B-sejt eredetű IL-6 szekréciónak és autoantitesteknek²⁴, valamint Th2 típusú citokinek szabályozatlan termelésének is¹⁸. További fontos faktorok a profibrotikus folyamatok beindításában a kemokinek. Ezeket a molekulákat először, mint leukocita kemoattraktánsokat jellemezték, de az utóbbi évek kutatási eredményei azt mutatják, hogy más profibrotikus citokinekkel, például az IL-13-val együttműködve fontos szerepük lehet a myofibroblasztok és makrofágok aktivációjában²⁵. Habár sok kemokinről leírták már, hogy valamilyen mértékben hozzájárulhatnak fibrotikus folyamatok kialakulásához, mégis úgy tűnik, hogy a CC és a CXC kemokin családba tartozó mediátoroknak van a legmeghatározóbb szerepe. Mind a CCL2, mind a CCL3 kemokinekről ismert, hogy blokkoló antitestek jelenlétében vagy receptoraik hiányában jelentősen mérséklődött a fibrózis kialakulása több egér fibrózis modellben²⁶⁻²⁸.

A krónikus gyulladásos folyamatokra jellemző, hogy nem csak a természetes immunitásban fontos granulocyták és makrofágok aktiválódnak, hanem az adaptív immunitás szereplői, főleg T-sejtek és plazmasejtek is nagy mennyiségben jelennek meg a sérülés helyén. Ezek a sejtek nagyban hozzájárulnak az állandósult gyulladásos környezet kialakításához, amelynek talaján aztán a fibrózis kifejlődhet. Több kísérletes modellben igazolták, hogy a megjelenő lokális CD4⁺ Th2 sejtpopuláció bizonyos citokinek termelése által (IL-4, IL-5, IL-13, IL-21) fontos profibrotikus tényező²⁹. Az IL-4 és IL-13 funkciói nagymértékű átfedést mutatnak, ugyanis mind a két mediátor

ugyanazon az IL-4R α /Stat6 jelátviteli útvonalon keresztül fejti ki hatását. Azonban az IL-13 transzgenikus és knock-out modellek rávilágítottak, léteznek nem redundáns funkciói is a két citokinnek. Több kísérlet is azt bizonyítja, hogy az IL-13 a domináns citokin különböző fibrotikus folyamatokban²⁹, de ugyanakkor *in vitro* bizonyított, hogy az IL-4 is nagyon erős stimulátora a fibroblaszt-myofibroblaszt átalakulásnak³⁰. Az IL-5-ről és az IL-21-ről is leírták, hogy a CD4+ Th2 válasz serkentésén keresztül profibrotikus hatásaik lehetnek^{31, 32}. A Th1 asszociált citokinek tovább színezik az adaptív immunrendszer szerepét a fibrotikus folyamatokban. Az IFN γ és az IL-12 parakrin mediátorokról kimutatták, hogy bizonyos fibrózis modellekben antifibrotikus hatásuk lehet. A máj súlyos fibrotikus elváltozásával járó schistosomiasisban kimutatták, hogy IL-12 és IFN γ hatására a krónikus granulómák mennyisége jelentősen csökkent³³, de hasonló hatásokat fedeztek fel különböző tüdő-, vese- és májfibrózis modellekben is².

A fibrotikus folyamatok legintenzívebben kutatott szabályozófaktor, a TGF- β szerepét már számos fibrózis modellben és betegségben részletesen jellemezték. Emlősökben három izotípusa ismert, TGF- β 1, -2 és -3 melyeknek nagyon hasonló a biológiai aktivitása³⁴. Annak ellenére, hogy rengeteg sejttípusról már leírták, hogy képesek TGF- β termelésre vagy reagálnak erre a citokinre, mégis a főleg makrofágok és monocyták által termelt TGF- β 1-nek van központi szerepe a szöveti fibrózis kialakulásában³⁵. A TGF- β 1 szint szabályozása makrofágokban általában nem a gén expressziójának változtatása révén valósul meg, hanem egyrészt a szekréció szabályozása által, másrészt a látens TGF- β 1 aktiválásán keresztül. A sejtekben a TGF- β 1 egy diszulfid híddal stabilizált homodimer formájában van jelen, melyhez a TGF- β 1-et inaktív formában tartó fehérje, a LAP (latency-associated protein) kapcsolódik. Ahhoz, hogy a TGF- β 1 a receptorához tudjon kötődni, disszociálnia kell a LAP-tól. Ezt a lépést több extracelluláris és membránfehérje is képes katalizálni, mint például a katepszin, plazmin, calpain, thrombospondin, integrin molekulák és MMP-k³⁵. Az aktivációt követően a TGF a sejtmembránban található receptorához kötődhet és a Smad proteineken keresztül célgénjei (például simaizom-aktin, prokollagén I és III) expresszióját befolyásolhatja³⁶.



2. ábra A TGF-β1 jelátviteli útvonala Miután a TGF-β1 bekötődik, két heterodimerből álló receptora autofoszforilálódik és foszforilálja a Smad 2, 3 fehérjéket. Ezek a Smad4-gyel komplexet alkotva jutnak a nukleuszba, ahol célgénjeik transzkripcióját szabályozzák.

Az eddigi eredmények azt mutatják, hogy a TGF-β1 egy központi és általános mediátora a fibrotikus folyamatoknak, azonban fontos megjegyezni, hogy több TGF független mechanizmust is azonosították már ³⁷.

3.1.4. Az ECM átalakulás fibrózisban reverzibilis?

A máj fibrotikus elváltozása és ennek végső állapota a májcirrhosis, amely aztán portális hipertenzióhoz, májelégtelenséghez és májkarcinómához vezethet, súlyos egészségügyi probléma világszerte ³⁸. Habár ezt a folyamatot sokáig irreverzibilisnek tartották, egyre több állatkísérlet és betegvizsgálati anyag mond ennek ellent. Ebbe az irányba mutatnak például azok a megfigyelések, hogy krónikusan fertőzött betegekből a hepatitis B és hepatitis C vírusok eliminálását gyakran követi a májcirrhosis regressziója ³⁹.

Ahogy ezt a bevezetőben már említettem, fibrózis, az extracelluláris mátrix túlzott depozíciója akkor történik, ha a dinamikus egyensúly eltolódik a mátrix degradációjáért felelős MMP-k és inhibitoraik, a TIMP-ek között az utóbbiak javára. Érdekes megfigyelés, hogy előrehaladott fibrózisban a szövetben viszonylag alacsony a sejtes elemek száma, így kézenfekvő azt feltételezni, hogy a csökkent mátrix degradáció oka az MMP-k forrásának, a sejtes elemeknek (főleg a makrofágoknak) a hiánya⁴⁰. Ezért feltételezik, hogy szükségesek lehetnek a fibrotikus szövet eltávolításához bizonyos gyulladásos folyamatok, melyek új MMP-termelő sejtek megjelenését stimulálják. Ezt az elméletet támasztják alá azok a kutatási eredmények, melyek szerint, ha a fibrotikus májszövetből eltávolítják a makrofágokat, az jelentősen csökkenti az ECM degradáció mértékét⁴¹.

3.1.5. Szöveti remodeling szívbetegségekben

Korunk egyik népbetegségének, a szívelégtelenségnek három leggyakoribb oka a hipertóniás szívbetegség, az ischaemiás szívbetegség és a dilatatív cardiomyopathia. Jellemző ezekre a betegségekre, hogy minden esetben szisztolés és/vagy diasztolés diszfunkcióval járnak, melynek háttérében a szívizomszövet átalakulása szerepel. Nyilvánvalóan az etiológia függvényében a remodeling más és más utakat jár be és az eredménye is sok tekintetben különböző lesz, néhány vonásban azonban mégis egyeznek ezek a folyamatok. Az egyik ilyen közös tulajdonság, hogy az átalakulás két központi mediátora a TGF- β 1 és az angiotenzin II (ANG II)⁴². Az alábbiakban a hipertrófiás szívelégtelenség háttérében álló folyamatokat foglalom össze.

Magasvérnyomás-betegség esetén a szívnek megnövekedett utóterheléssel szemben kell dolgoznia, mely aztán egy kompenzatórikus bal kamra hipertrófiához vezet. A kamrafalak szövettani analízise azonban megmutatta, hogy a cardiomyocyták hipertrófiáján kívül ki lehet mutatni fokozott apoptózisukat is, valamint fibrotikus elváltozásokat és hegeket is. Így a betegségben megnövekedett nagyságú kamrafal, a nyilvánvaló fizikai különbségen kívül, több biológiai funkcióban is eltér az egészséges kamrafaltól. A hipertrófiás kamraizomzatról ismert, hogy merevebb lesz az elváltozás során, amely először a diasztolé elégtelenségében nyilvánul meg⁴³. A fibrotikus átalakulás negatívan befolyásolja a szívizomzat akciós potenciál vezetőképességét is, mivel megbontja az elektromechanikailag precízen csatolt izomszövet struktúráját. A

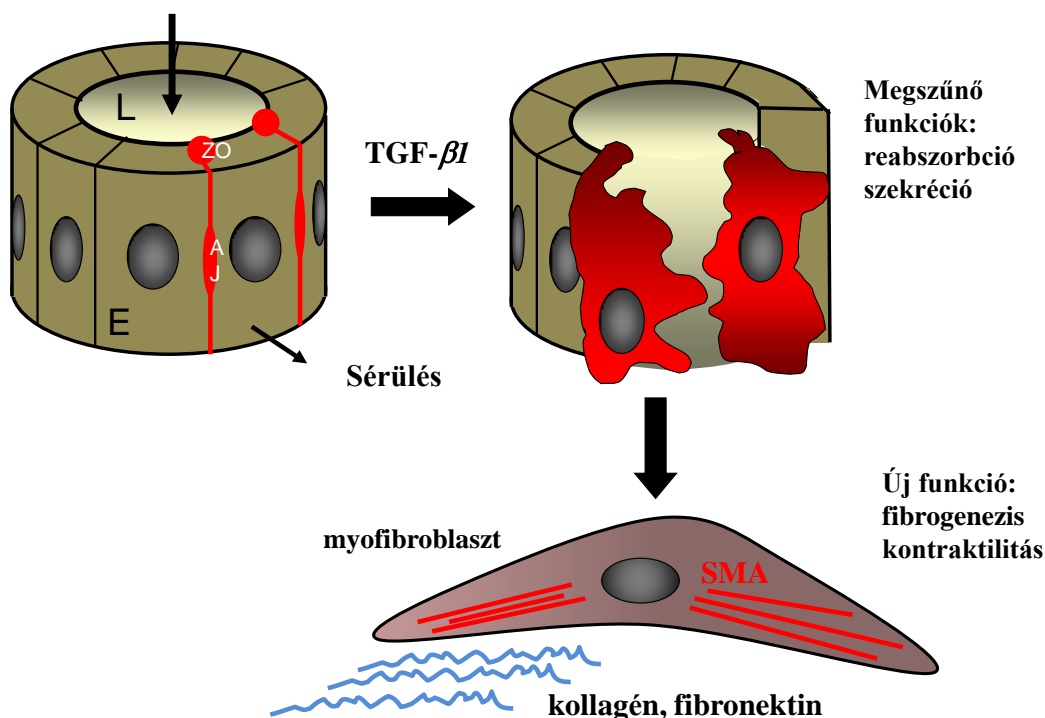
folyamat háttérében valószínűleg a szövetbe nagy mennyiségben beépülő, igen nagy szakítószilárdsággal és alacsony elaszticitással jellemezhető kollagén I és III állhat⁴³. Habár a renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer (RAAS) több komponenséről is ismertek olyan adatok, melyek szerint profibrotikus hatásuk lenne, mégis úgy tűnik, hogy a szívizomszövet átalakításában legfontosabb szerepe az ANG II-nek van. Több kísérleti eredmény is alátámasztotta, hogy serkenti a fibroblasztok proliferációját és differenciációját kollagén-termelő myofibroblasztokká⁴⁴. A részben lokálisan a makrofágok által termelt ANG II fokozza a TGF- β 1 expresszióját, amely aztán perivaszkuláris fibrózist és hegesedést indíthat el⁴⁵. Ezen túl a TGF szignalizációt is képes befolyásolni, ugyanis növeli a SMAD2 szintjét a sejtekben és fokozza a foszforilált SMAD3 nukleáris transzlokációját⁴⁶. A TGF- β 1 aztán tovább fokozza a kardiális myofibroblasztok kialakulását, valamint ECM fehérjék termelését, mint például a kollagén, fibronektin és különböző proteoglikánok³. A TGF ezen kívül képes saját termelését is fokozni, így egy pozitív feedback körön keresztül a myofibroblasztok aktivációját és proliferációját jelentősen növelni. Egerekben a TGF- β 1 overexpressziója intersticiális fibrózissal járó kardiális hipertrófiát okozott⁴⁴. A szív átépülésében a TGF szerepének általánosságára utal, az az eredmény, hogy hasonlóan a hipertrófiás cardiomyopathiához, a dilatatív cardiomyopathiákban is megemelkedett a szintje^{47, 48}.

3.2. Az EMT és tubulointersticiális fibrózis

A krónikus vesebetegségekre jellemző, hogy függetlenül a kialakító noxáktól véglegesen károsítják a vese struktúráját és veseelégtelenséget okoznak. A különböző vesebetegségek veseelégtelenséghez vezető útjainak utolsó, minden kórfolyamat esetén azonos részét képezi az úgynevezett progresszív vese fibrózis. A progresszív vese fibrózis molekuláris mechanizmusai és hisztológiai megjelenése nagyban hasonló a más szervekben megfigyelhető szöveti fibrózisokhoz. Erre a kórfolyamatra a működő hámszövet atrófiája, ezzel együtt az eredeti interstícium lebomlása, illetve átépülése jellemző. A tubulointersticiális fibrózis (TIF) során a tubulus hám ellapul, a kefeszegély eltűnik, a peritubuláris intersticiális tér mérete megnő. Az extracelluláris mátrix fehérjék szintézise fokozódik, minőségi összetételük megváltozik a fibrilláris típusú kollagén izoformák javára. Az addig kis mennyiségben kimutatható I-es és III-as típusú kollagén szintézise jelentősen megnő, és az ECM bontását végző MMP-k és inhibitoraik a TIMP-

ek közötti egyensúly a mátrix akkumulációjának irányába tolódik el. Emellett a mátrix fehérjék szintéziséért felelős mesenchymális sejtek, fibroblasztok és myofibroblasztok jelennek meg nagy mennyiségben ^{49, 50}.

Az egészséges vesében csak minimális mennyiségben vannak jelen fibroblasztok, SMA (simaizom-aktin) pozitív myofibroblasztok pedig egyáltalán nem mutathatóak ki az interstíciumban ⁵¹. A fibrózis során kialakuló myofibroblasztok több forrásból is származhatnak, például a lokális fibroblasztok, érfal simaizmok és pericyták differenciációjával jöhetnek létre. Egyre több közlemény veti fel a lehetőségét, hogy a myofibroblasztok egy része epitheliális eredetű, a tubulussejtek transzdifferentiációja során jön létre. Ezt a sejtek polaritásának és adhézióinak elvesztésével járó folyamatot nevezik epitheliális mesenchymális tranzíciónak (EMT). A sejtek motilitása megnő az átalakulás során és az interstíciumba vándorolnak, ahol extracelluláris mátrixot szintetizáló, mesenchymális markereket expresszáló myofibroblasztokká differenciálódnak ⁵².



3. ábra EMT vesetubulus-hámsejtekben. A sérült epithelium sejtjei átalakulnak myofibroblasztokká. A folyamat során bizonyos funkciók elvesznek (reabszorpció, szekréció), de megjelennek újak, mint például az ECM szintézis és a kontraktilitás. (ZO-zonula occludens, AJ- adherens junkció, L-lumen, E-epithelium, SMA-simaiizom-aktin)

Az EMT-nak alapvető fejlődésbiológiai funkciója van az embrionális élet korai szakaszától a szervek kifejlődéséig. A harmadik embrionális héten a kezdetleges ektoderma sejtjei, az úgynevezett epiblasztok elveszítik poligonális jellegüket, és a két meglévő csíralemez közé vándorolnak, hogy létrehozzák a középső csíralemezt, a mezoderlát ⁵³. Nagyon hasonló folyamat zajlik le a szívfejlődés során, az atrioventricularis átmenet kialakulásakor ⁵⁴, a velőcsövet alkotó neuroepitheliumban az idegrendszer kialakulásakor ⁵⁵, vagy a szájpapnyúlványok összenövésakor ⁵⁶. Az embriogenezis lezárulását követően az EMT-nak többek között tumorbiológiai jelentősége is előtérbe kerülhet epitheliális eredetű daganatok kialakulása vagy a metasztázis-képzés során ⁵⁷.

3.2.1. Epitheliális mesenchymális átalakulás LLC-PK1/AT1 sejtekben

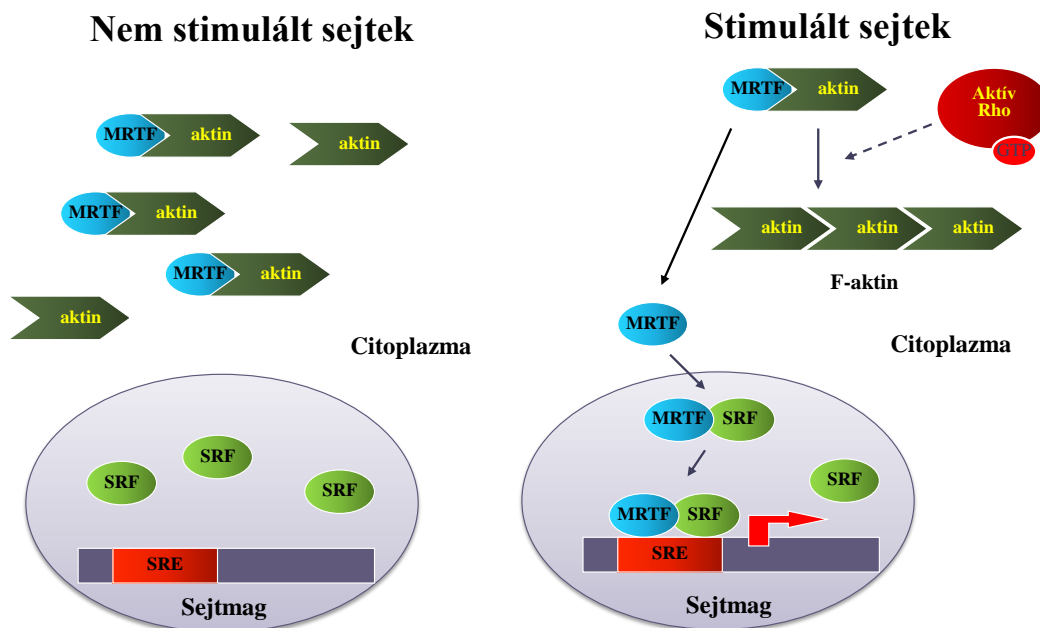
Laborunk LLC-PK1 sejtek felhasználásával korábban már létrehozott egy *in vitro* modellt az EMT tanulmányozására⁵⁸. Az LLC-PK1 egy sertésvese proximális tubulus eredetű, az EMT tanulmányozására gyakran használt sejtvonal. Nyugalmi állapotban az LLC-PK1 sejteknek poligonális alakja van és egymáshoz szorosan kapcsolódnak. 4 ng/ml TGF- β 1 kezelés hatására ez a morfológia azonban már 24 óra után jelentősen megváltozik. 3 nap után a sejtek 80%-a hosszúkás alakot vesz fel és elveszti a kapcsolatát a szomszédos sejtekkel. Ezek a változások még szembetűnőbbek immunfestéseken, a sejtekben megváltozik a sejt-sejt adhézióban fontos fehérjék, mint a β -catenin, E-cadherin vagy a ZO-1 festődése⁵⁹. A citoszkeleton is jelentősen átalakul a kezelés hatására. A perifériás F-aktin festődés csökken, a foszforilált miozin könnyű lánc pedig vastag citoszolikus filamentumokba rendeződik, melynek hátterében a Rho kis G-fehérje és effektora a Rho-kináz aktivációja áll. Mindezek az új tulajdonságok fokozott sejtmotilitásra utalnak, amelyet lamellipodiumok megjelenése is megerősített. Az átalakulás során megnő a fibronectin expressziója, valamint megjelent a sejtekben az EMT egyik markere a simaizom aktin⁵⁸. A modell további vizsgálata azt is megmutatta, hogy a TGF- β 1 mellett a sejt-sejt kapcsolatoknak esszenciális szerepe van a folyamat szabályozásában. Ha a sejteket Ca^{2+} -mentes médiumba helyezik, a kalcium dependens sejt-sejt kapcsolatok (például a cadherin fehérjék kapcsolatai) felbomlanak. Ez aztán más sejt-sejt kapcsolatok megszűnését fogja indukálni, így végül a szomszédos sejtek szeparálódnak egymástól. Míg konfluens monolayer esetén a TGF kezelés alig indukálta az SMA promotert, a Ca^{2+} megvonást követően a TGF hatása sokkal kifejezettebb volt. Szemben a Ca^{2+} jelenlétében végzett kísérletekkel, az SMA promotor fokozott aktivitásán túl itt megjelent a simaizom-aktin fehérje is. Ugyanilyen eredményekre vezettek más az intercelluláris junkciók hiányát vagy sérülését modellező kísérletek, mint például a szubkonfluencia vagy a monolayer megsértése. A jelenség hátterében a cadherinekhöz (itt E-cadherin) intracellulárisan kapcsolódó β -catenin degradációjának gátlása áll. Így a molekula felszabadul, és sejtmagba jutva ott az SMA promotor aktivációjában permisszív szereplőként tud működni. Ez a munka elsőként mutatta, hogy a sejt-sejt kapcsolatok elvesztése nemcsak a TGF- β 1 hatására, az EMT

részeként következhet be ⁶⁰, hanem bizonyos körülmények között mindkét hatásra, kontaktsérülésre és a TGF-re is szükség van a myofibroblasztok kialakulásához.

Későbbi munkákban sikerült tovább feltérképezni a kontaktsérülés dependens folyamatokat. Az intercelluláris kapcsolatok elvesztése Rho, ROK (Rho kinase) mediálta miozin könnyűlánc (MLC) foszforilációhoz és SMA promoter aktivációhoz vezet. A miozin könnyű lánc foszforiláció (MLC-P) esszenciálisnak bizonyult a promoter hatás kialakításához, ugyanis mind a miozin ATP-áz inhibitor blebbistatin, mind pedig egy domináns negatív MLC konstrukt jelentősen csökkentette a promoterválaszt. Az ebben a bekezdésben eddig felsorolt eredmények a csatolt közlemények egyikében olvashatóak, a jelátviteli útvonal következő, az MLC foszforiláció és a promoter közötti lépéseit vizsgáló munkáról pedig a dolgozat saját eredményeimet bemutató részében lesz szó.

3.2.2. Az MRTF és SRF transzkripciós faktorok

Izomsejtekben és fibroblasztokban több a kontraktilitás és a differenciáció szempontjából esszenciális gén, mint például a simaizom aktin a Serum Response Factor (SRF) nevű transzkripciós faktor és kofaktorai, a myocardin-related-transcription-factor 1 és 2 (MRTF1, 2, más néven MAL (megakaryocytic acute leukemia), BSAC (N-terminal basic, SAP and coiled-coil domains) vagy MKL (megakaryoblastic leukemia)) szabályozása alatt áll ⁶¹⁻⁶³. Több közlemény felhívta már figyelmet arra, hogy az SRF szabályozásában fontos szerepe van a citoszkeleton Rho dependens átrendeződésének ^{64, 65}, majd arra is fény derült, hogy a kis G fehérje az MRTF transzlokációján keresztül szabályozza az SRF aktivitást ^{66, 67}. A jelenlegi elképzelések szerint nyugalmi körülmények között a citoszolban az MRTF G-aktinhoz kötődik, és ez a komplex nem képes belépni a sejtmagba. Ha azonban valamilyen stimulus hatására megnő a sejtekben a Rho aktivitása, az aktin polimerizációhoz vezet, így csökken a sejtekben a G-aktin mennyisége, felszabadul az MRTF és a nukleuszba transzlokálódik ⁶⁶.



4. ábra MRTF és SRF transzkripciós faktorok szabályozása Az aktin polimerizáció hatására az MRTF felszabadul és a magba jut, majd az SRF-ral komplexet alkot és az SRE-n (Serum Response Element) keresztül a célgének átírását szabályozza.

Két Rho effektor mechanizmust neveztek meg, amely mediálhatja a folyamatot: az aktin polimerizáció serkentése formin fehérjéken keresztül⁶⁸, és csökkent F-aktin hasítás a LIM-kináz-cofilin útvonal befolyásolása által⁶⁹. Az is elképzelhető, hogy a Rho az SRF transzlokációját befolyásolja, azonban ezzel kapcsolatban az irodalom ellentmondásos és a pontos mechanizmusok sem feltártak⁷⁰⁻⁷².

3.3. Peroxidáz enzimek

A doktori munkám jelentős részében két peroxidáz fehérje, a PXDN és a PXDNL vizsgálatával foglalkoztam, így a bevezetés következő részében szeretném bemutatni ezt a széles körben expresszálandó, változatos biológiai szerepekben feltűnő fehérjecsaládot.

3.3.1. A peroxidázok általános jellemzése

A peroxidáz enzimek szupercsaládjának tagjai gyakorlatilag minden élőlényben kimutathatóak, és alapvetően két nagy csoportra oszthatóak: hemet nem tartalmazó enzimekre, mint például glutation vagy a tioredoxin peroxidáz, és hem prosztetikus csoporttal rendelkező peroxidázokra ^{73, 74}. A hem peroxidázok is tovább osztályozhatóak két családra. Az első, valószínűleg egy ősgénből többszörös duplikációval létrejött csoportba tartoznak a gomba, növényi és bakteriális hem peroxidázok ⁷⁵. A szekvencia analízis és nagyfelbontású röntgen-krisztallográfiás vizsgálatok alapján ezek a fehérjék nagyon hasonló helikális szerkezeti elemekkel rendelkeznek és így a háromdimenziós struktúrájuk is gyakorlatilag azonos ⁷⁶. Ezek a peroxidázok, mint pl. a tormaperoxidáz és a gomba peroxidázok közül az élesztő citokróm c peroxidáza kb. 300 aminosavból állnak és nem kovalensen kötött hemet tartalmaznak ⁷⁷. A növényi peroxidázok a lignin bioszintézisében és lebontásában, az auxin (növekedést és fejlődést szabályozó növényi hormon) termelődésében, a kórokozók elleni védekezésben, a hidrogén-peroxid intracelluláris degradációjában és toxikus vegyületek oxidálásában vesznek részt. Ezek az enzimek indukálódnak bizonyos stressz faktorok jelenlétében, mint például a kórokozók vagy különböző fizikai és kémiai behatások ^{78, 79}.

Már régóta ismert azonban, hogy myeloperoxidáz és más emlős peroxidázok egy ettől eltérő enzimesaládot alkotnak. A másodlagos és harmadlagos szerkezetük, valamint a prosztetikus csoportjuk elhelyezkedése is jelentősen különbözik a növényi és gomba peroxidázoktól ⁸⁰. Mivel az enzimesalád tagjait, a myeloperoxidázt (MPO), az eozinofil peroxidázt (EPO), a laktoperoxidázt (LPO) először emlősökben azonosították

ezért az enzimes családot emlős hem peroxidázoknak nevezték el. Később újabb tagokkal bővült a fehérjecs család, mint a prosztaglandin H szintáz vagy éppen a dolgozatban részletesen tárgyalásra kerülő peroxidazin (PXDN), valamint az is világossá vált, hogy az enzimek homológjai alacsonyabb rendűekben is kifejeződnek mint például fonalas férgek, tüskésbőrűek, ízeltlábúak⁸¹. Ennek ellenére az irodalomban továbbra is többnyire emlős peroxidáz névvel illetik az enzimes csoportot, habár vannak kezdeményezések, az állat(i) peroxidázok név használatára^{75, 81}. Az állati hem peroxidázok a növényi peroxidázoktól függetlenül jöttek létre, azonban nagyon hasonló kémiai reakciókat katalizálnak, így kialakulásuk kiváló példája a konvergens evolúciós folyamatoknak.

A peroxidázokban a katalitikus helyet konzervált disztális és proximális aminosavak fogják közre. Ezek az emlős peroxidázokban meghatározott helyzetű hisztidinek. Egy emberi peroxidázal, a COX1-gyel végzett kísérletekben az enzim peroxidáz és ciklooxygenáz aktivitását a proximális vagy a disztális hisztidin mutációja megszüntette⁸². A disztális hisztidin sav-bázis katalizátorként működik minden peroxidázban, amely először a H₂O₂-ről egy protont vesz fel, majd a HO₂-ből az oxigénkötés (O-O) elhasításával majd azt követően a felvett proton donálásával vizet képez^{83, 84}. Ez a folyamat a peroxidázok által katalizált reakció első lépése, mely általánosan jellemző ezek működésére, míg a további lépéseket illetően adódnak eltérések az egyes enzimek között.

Mivel a reakció ezen első, általánosan jellemző lépését közel azonos fehérjestruktúra végzi, e fehérjeresz aminosav szekvenciájának konzerváltsága alapján minden peroxidáz egy nagy peroxidáz szupercsaládba tartozik⁷³. Állatokban a proximális hisztidin hidrogénkötéssel kapcsolódik egy szintén konzervált aszparagin aminosavhoz, ezzel szemben növényekben, gombákban és baktériumokban a proximális hisztidin aszpartán-savhoz kapcsolódik. Ez arra utal, hogy az állati peroxidázok és a nem állati peroxidázok a fent említett szupercsaládon belüli, különböző géncsaládokhoz tartoznak^{75, 77, 78}.

A dolgozatban tárgyalt kísérletes munka egy jelentős része a peroxidazin fehérjéről szól, mely az emlős peroxidázok családjának legújabb, legkevésbé tanulmányozott és jellemzett tagja. Az enzimes család már jól ismert tagjai, a szerkezeti és alapvető működésbeli hasonlóságokon túl változatos, egymástól sok esetben

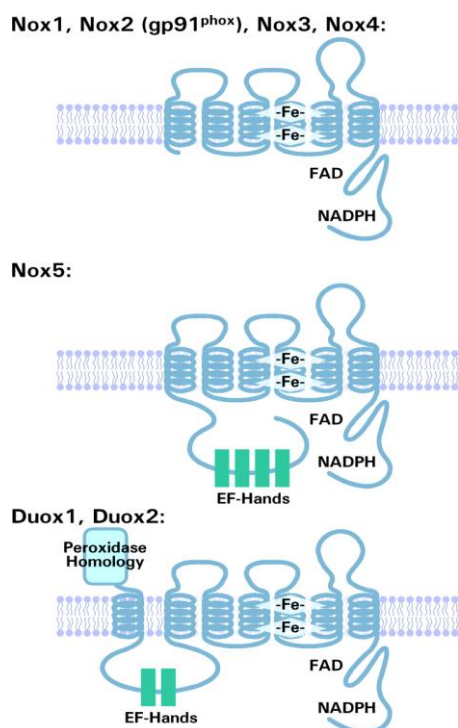
nagymértékben eltérő funkciókkal rendelkező enzimek, melyeket itt a bevezetőben fogok ismertetni. Az emberi szervezetben megtalálható emlős hem peroxidázok a laktoperoxidáz (LPO), myeloperoxidáz (MPO), eozinofil peroxidáz (EPO), thyroperoxidáz (TPO), a ciklooxygenáz 1, 2 (COX1,2) és PXDN. Az LPO, MPO és EPO az immunvédekezésben, a TPO a pajzsmirigy-hormon szintézisben, ciklooxygenázok jelátviteli anyagok metabolizmusában, a PXDN pedig az extracelluláris mátrix fehérjehálózatának kialakításában vesz részt. Fontos azonban megjegyezni, hogy ezeken kívül több olyan emberi fehérje is létezik, melyek hasonló peroxidáz-szerű doménnel rendelkeznek, de néhány a peroxidáz enzimaktivitáshoz elengedhetetlen konzervált aminosavat nem tartalmaznak. Ilyen molekulák például a Duox1 és Duox2 proteinek valamint peroxidazin-szerű (peroxidasin-like, PXDNL) fehérje. A későbbiekben a fehérjecsalád emberben előforduló tagjait fogom részletesen bemutatni.

3.3.2. A NOX fehérjék és peroxidázok kapcsolata

A peroxidáz fehérjékre jellemző, hogy hidrogén-peroxidot használnak fel biológiai funkciójuk betöltéséhez. A H_2O_2 -nak sok forrása ismert az emberi szervezetben, képződhet például a mitokondriumban a sejtlégzés során⁸⁵, de kialakulhat a peroxisómák tevékenysége⁸⁶ vagy különböző citokróm P450 katalizálta reakciók során is⁸⁷. A tudomány mai állása szerint szabályozott ROS (reaktív oxigén származék) termelést a NOX (NADPH OXidase) enzimes család tagjai végeznek a szervezetben. Mivel a képződött H_2O_2 igen gyakran peroxidáz enzimek katalizálta reakciókhoz használandó fel, ezért szeretném bemutatni röviden ezt az enzimes családot.

A NADPH-oxidázok családjába tartozó enzimek elektronok membránon keresztüli transzportját valósítják meg. A folyamatban a NADPH az elektron donor, az akceptor pedig egy, a membrán túloldalán elhelyezkedő oxigén molekula (O_2), amely így szuperoxid anionná alakul. A család összes tagja tartalmaz a citoszolba benyúló C-terminális részén egy NADPH kötő domént és egy flavin-adenin-dinukleotid (FAD) kötő fehérjerészt. Ezek után az N-terminus felé haladva következik a fehérjék 6 transzmembrán domént tartalmazó régiója. A transzmembrán régióban található az a négy konzervált hisztidin, melyek segítségével a fehérjék két hemet kötnek. Ezek a hemek alapvető fontosságúak a membránon keresztüli elektron transzportban. A NOX

1-4 szerkezetében alapvetően ezek a komponensek szerepelnek, azonban a NOX5 és a Duox1, 2 további jellegzetes doméneket tartalmaz. A NOX5 N-terminálisan tartalmaz négy darab úgynevezett EF-hand motívumot, ami a fehérje kalcium ionok általi szabályozásában játszhat szerepet. A Duox enzimekben is található a transzmembrán régiótól N-terminálisan két EF-hand motívum, azonban ezek a fehérjék még egy transzmembrán régiót és egy extracellulárisan elhelyezkedő peroxidáz-szerű fehérjerészt is tartalmaznak az N-terminusukon ⁸⁸.

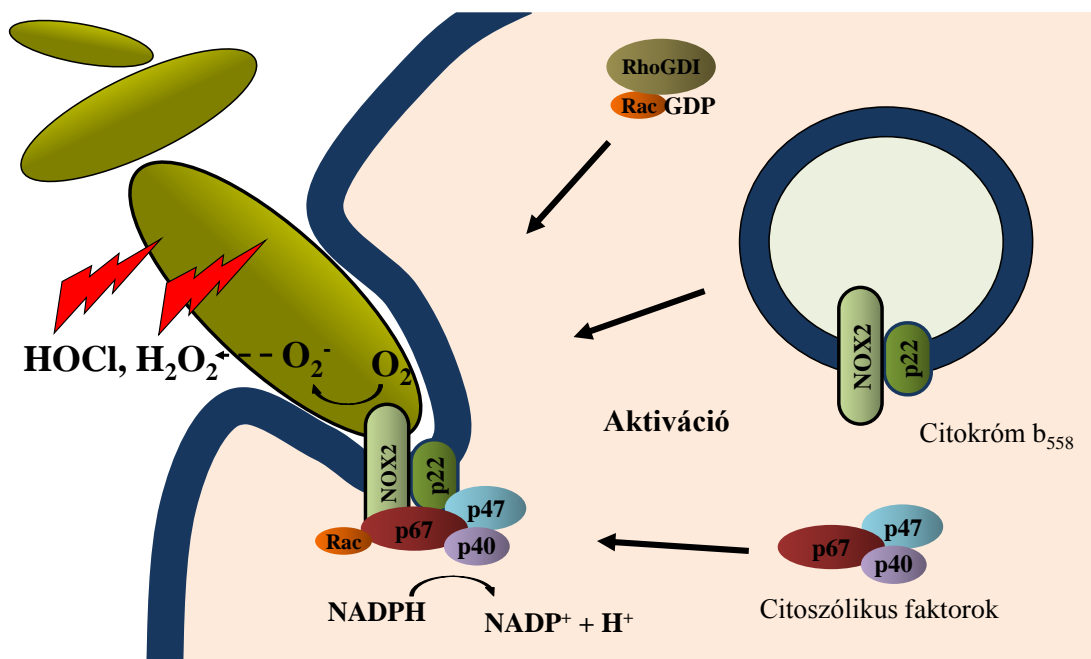


5. ábra A NOX fehérjék szerkezete A NOX1,2,3,4 fehérjék a C-terminustól az N-terminus felé haladva tartalmaznak egy NADPH-kötő domént, egy FAD-kötő domént és hat transzmembrán régiót. A NOX5-ben ezeken a doméneken kívül még N-terminálisan található négy EF-hand motívum. A Duox-okban a két EF-hand motívumot tartalmazó intracelluláris hurokhoz, egy transzmembrán régióon keresztül kapcsolódik egy peroxidáz-szerű domén.

3.3.2.1. A NOX2

Az elsőként megismert NADPH-oxidáz-peroxidáz együttműködést myeloid sejtekben azonosították, ahol a NOX2 a myeloperoxidáz számára szolgáltat szubsztrátot. A NOX2 egy enzimkomplex tagjaként végzi szabályozott körülmények között a ROS termelést. Az enzimkomplex másik membránban található tagja a p22^{phox}, amellyel együtt alkotják a flavocitokróm b₅₅₈ nevű membránfehérjét. Aktiválódása

során az első lépés a $p47^{\text{phox}}$ nevű citoszolikus kofaktor konformáció-változása és membrán-transzlokációja. A $p47^{\text{phox}}$ a fagocyták citoszolijában két másik, $p67^{\text{phox}}$ és $p40^{\text{phox}}$ nevű proteinhez kötődik, így a $p47^{\text{phox}}$ transzlokációjával ezek a proteinek is a membránhoz asszociálódnak ⁸⁹. Végül egy Rac fehérjecsaldába tartozó kis GTP-kötő fehérje aktív formája kapcsolódik a komplexhez, és így alakul ki az aktív enzim ⁹⁰. A folyamat során először szuperoxid képződik, ami spontán és enzimatisz dizmutációval hidrogén-peroxiddá alakul.



6. ábra A NOX2 aktivációja fagocytákban A membránban található citokrom b_{558} -hoz az aktiváció során hozzákötődnek a citoszolikus szabályzó faktorok $p47^{\text{phox}}$, a $p67^{\text{phox}}$, a $p40^{\text{phox}}$ és egy Rac kis GTP-kötő fehérje, így kialakítva az aktív enzimkomplexet.

3.3.2.2. A Duox enzimek

Az emberi genomban két *Duox* gén található. Az enzimeket eredetileg thyroid-oxidázoknak (Thox1, 2) nevezték, ugyanis a pajzsmirigyben azonosították először ezeket a NADPH-oxidázokat ^{91, 92}. Röviddel ezután egy másik munkacsoport a *Caenorhabditis elegans* nevű hengeres féregfajból klónoztta meg a humán proteinek homológjait. A fehérjeszekvencia elemzése alapján kapták a DUal OXidase (Duox) elnevezést, ugyanis a fehérjéknek a NADPH-oxidáz doménjük mellett egy peroxidáz-szerű doménjük is van. Az emberi szervezetben a Duox enzimek széles körben expresszálódnak, a Duox1-et kódoló mRNS-t már kimutatták pajzsmirigyben,

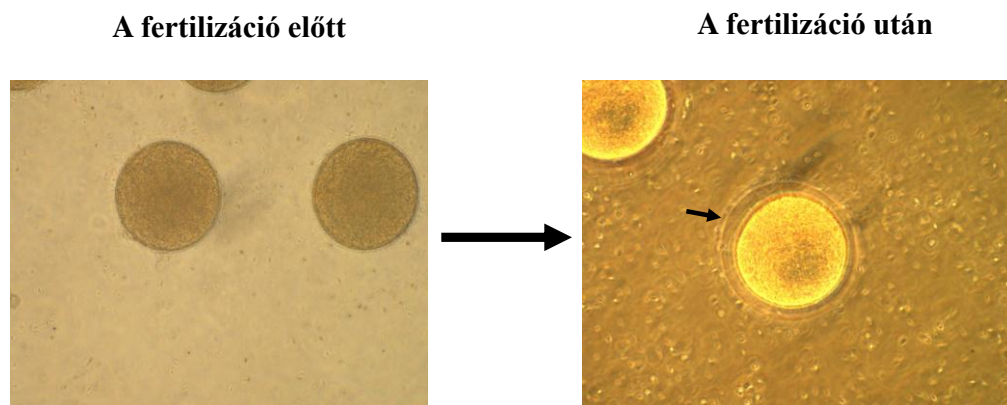
placentában, prosztatában, tüdőben, hasnyálmirigyben, herében, a légutakat és húgyhólyagot bélelő epithelsejtekben^{93, 94}. A Duox2 a pajzsmirigyen kívül jellemzően légutak hámsejtjeiben, a nyálmirigyek kivezető csöveiben, a gyomorban, a duodenumban, a vastagbélben és a végbélben található meg⁹³.

Jellemző a Duox fehérjékre, hogy érési faktoraik a Duoxa1 és a Duoxa2 nélkül az endoplazmás retikulumban maradnak. A Duox1-nek Duoxa1-re a Duox2-nek pedig Duoxa2-re van szüksége, hogy plazmamembránba jutva ott betölthesse funkcióját^{95, 96}.

A Duox2 a thyreocyták apikális membránjában helyezkedik el a thyroperoxidázhoz hasonlóan, és pajzsmirigyhormon szintéziséhez szolgáltat hidrogén peroxidot (ld. thyroperoxidáz fejezet). Duox2 hiányában hypothyreózis lép fel⁹⁷.

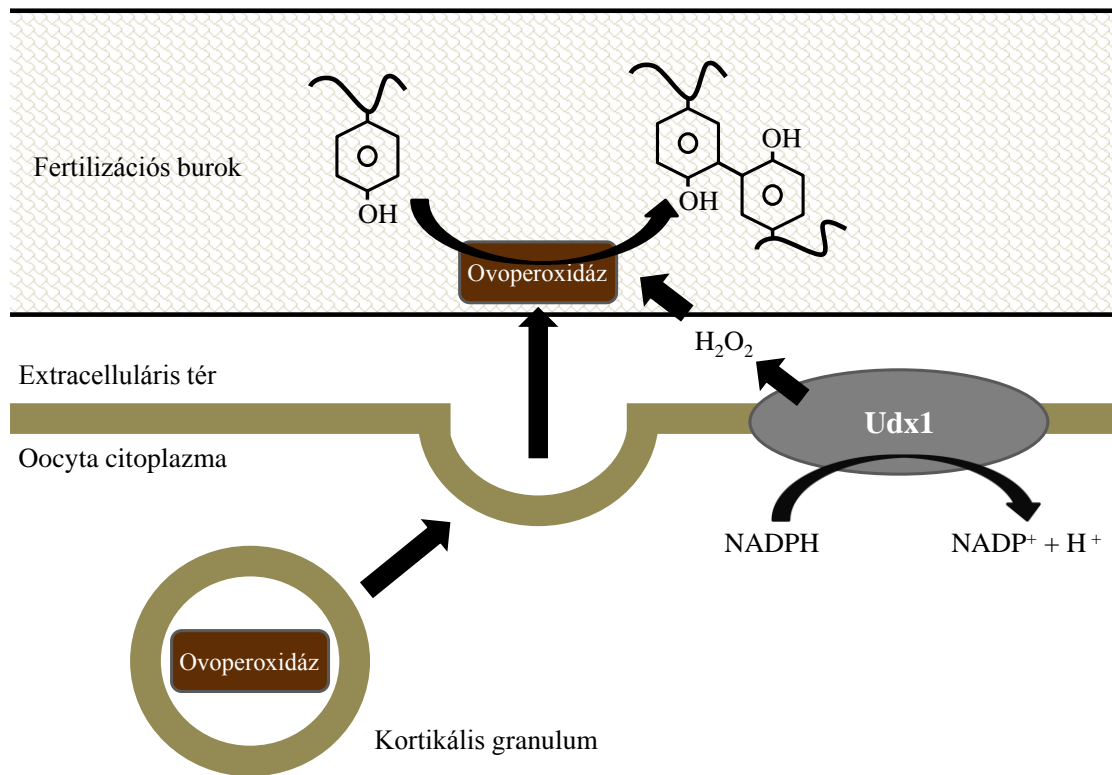
A nyálmirigyekben a Duox2 a laktoperoxidázzal működik együtt és valószínűleg immunfunkciója van. (ld. laktoperoxidáz fejezet)

Filogenetikailag alacsonyabb rendű élőlényekben a Duox enzimek több esetben olyan peroxidázoknak szolgáltatnak szubsztrátot, melyek az extracelluláris mátrix stabilizálásban vesznek részt. A fertilizáció során a tengeri sün petesejt sejt felszíne és extracelluláris mátrixa gyors átalakuláson megy keresztül. Néhány másodperc alatt egy kémiai és mechanikai behatásokkal szemben igen ellenálló fehérjeburok jön létre, melynek funkciója egyrészt a letális polispermia megakadályozása, másrészt az embrió védelme a korai embriogenezis alatt⁹⁸.



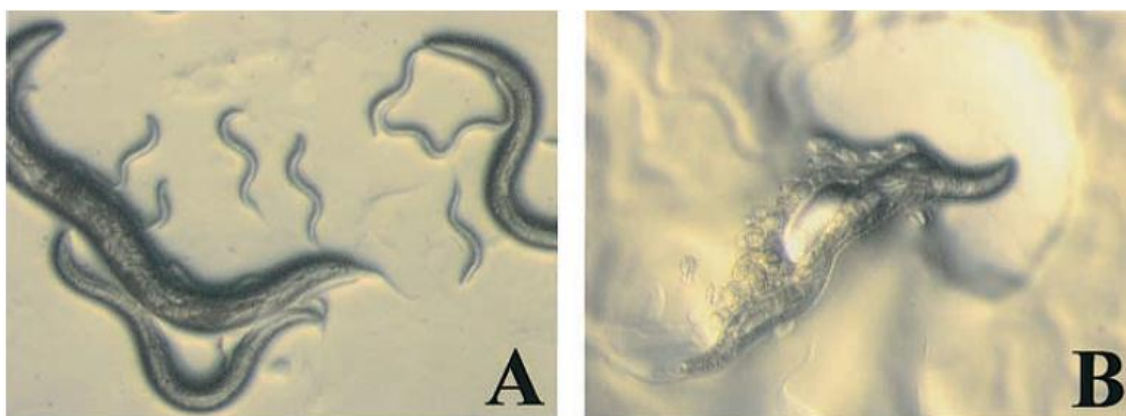
7.A tengeri sünn petesejt extracelluláris mátrixának átrendeződése. *A fertilizáció során létrejön a kémia és fizikai behatásokkal szemben ellenálló fertilizációs burok.*

A spermium bejutását követően intracelluláris kalcium szignál jön létre, majd a membránhoz transzlokálódnak és kiürülnek a kortikális granulumok. Szerin-proteázok aktiválódnak, ezek a membrana vitellinea és a plazmamembrán közötti protein hidakat hasítják, így biztosítják, hogy ez a réteg eltávolodhasson a sejt felszínétől. Strukturális komponensek is ürülnek az exocitosis során, melyek a vitellin membrán fehérjéivel kapcsolódva egy proteinhálózatot alakítanak ki. A szintén a kortikális granulumokból származó ovoperoxidáz végzi a fehérjeréteg stabilizációját^{99, 100}. Az enzim egy H₂O₂-t igénylő reakcióban a fehérjeszálak között ditirozin hidakat alakít ki. A hidrogén-peroxid forrása az Udx1 nevű, ebben az élőlényben megtalálható Duox homológ⁹⁹.



8. ábra Az ovoperoxidáz működése A fertilizációt követően az ovoperoxidáz a fertilizációs burokban dityrozin keresztkötéseket hoz létre, melyhez a H_2O_2 -t az Udx1 nevű Duox homológ szolgáltatja ⁹³.

Egy másik közlemény szerint *C. elegans*ban a Duox egy homológja szükséges a féreg kutikulájának stabilizációjához. Ce-Duox1 hiányában a férgek kültakarója hólyagos morfológiát vesz fel, melyet a kutikula rétegeinek szeparációja okoz ¹⁰¹. Az elváltozás hátterében a dityrozin kötések kialakulásának hiánya áll, azonban az még nem teljesen tisztázott, hogy a Duox ehhez csak a H_2O_2 -t szolgáltatja, vagy a peroxidáz doménjén keresztül magát keresztkötését is katalizálni tudja ^{93, 101}.



9. ábra: *A Ce-Duox1 mutáns és vad típusú C. elegans fonalas férgek* A vad típusú állathoz (A) képest a mutáns egyedek (B) kutikulája hólyagosná válik és a mozgása is sérült ¹⁰¹.

3.3.3. A myeloperoxidáz

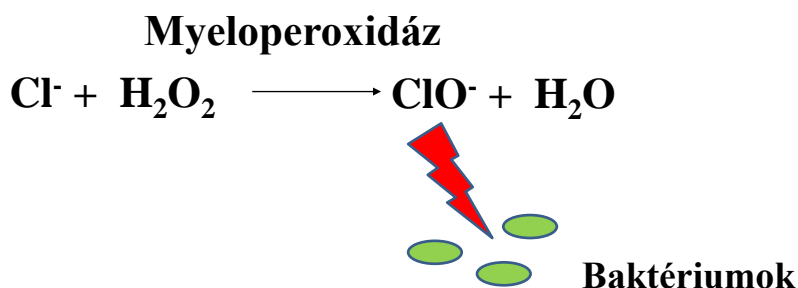
A humán myeloperoxidáz génje a 17. kromoszómán található, közel az LPO-t és az EPO-t kódoló génekhez ⁷⁴. Az LPO-tól mindössze 2,5 kilobázis távolságra található, farok-farok orientációban. Ezek a génlokalisációs adatok arra utalnak, hogy a fent említett peroxidázok génjei egy ősi génből jöttek létre génduplikációs mechanizmussal. A fehérjét először tuberkulózos betegek empiémájából tisztították, és mint egy vasat tartalmazó, peroxidáz aktivitással rendelkező enzimet jellemezték. A fehérjét először a hem intenzív zöld színe miatt verdoperoxidáznak nevezték ¹⁰². Ezt követően megállapították, hogy myeloid sejtekben expresszálódik, és hogy fagocita sejtek oxigén-függő baktériumölésében játszik fontos szerepet, amivel hozzájárul a szervezet természetes immunitásához ¹⁰³.

A myeloperoxidáz egy kationos, 146 kDa molekulatömegű dimer fehérje, amely szimmetrikus fehérjeláncait egy diszulfid híd kapcsolja össze. Mind a két monomer egy 14,5 és 58,5 kDa tömegű, glikozilált polipeptid láncból áll. A kisebbik polipeptid 106, a nagyobb 467 aminosavat tartalmaz. A dimer mindkét fele tartalmaz a hemhez asszociált formában egy vas-iont valamint egy kalcium iont ⁷⁵. Az MPO volt az első peroxidáz, amelynek a pontos háromdimenziós struktúrája ismertté vált ⁸³.



10. ábra A myeloperoxidáz szerkezete A fehérje két láncból áll (zöld, kék) és hemet tartalmaz (narancs).

A myeloperoxidázt a neutrofil granulocyták és a makrofágok termelik, azok citoplazmatikus granulumában találhatóak meg. A neutrofil granulocyták azurofil granulumainak, szerin-proteázok és lizoszóma-hidrolázok mellett az MPO a fő alkotója, ami a sejt száraz tömegének kb. 5 %-át teszi ki. Aktivációkor az azurofil granulumok tartalma a bekebelezett baktériumot tartalmazó fagoszómába kerül, ahol az MPO a fagocytá-oxidáz által termelt szuperoxidból ($O_2^{\cdot-}$) képződött H_2O_2 -ot felhasználva antimikrobiális hatású hipoklórsavat (HOCl) képez.



11. ábra A myeloperoxidáz által katalizált reakció A reakciótermék hipoklorit-ion baktericid hatású.

Az enzim más halogének és a tiocianát-ion oxidálására is képes, szubsztrátjai átalakításuk sebességének sorrendjében a következők: tiocianát > jodid > bromid >> klorid.^{104, 105} A plazma ionkoncentrációinak alakulása (klorid: 140 mM, bromid: 20-100 µM, tiocianát: 20-120 µM, jodid: 100-500 nM) magyarázza, hogy mégis a felszabaduló hidrogén-peroxid ~50%-a hipoklorit képzésére fordítódik¹⁰⁵. A hipoklorit klorid-ionnal reagálva molekuláris klórt képez, mely a sejtmembránban lévő zsírsavak és koleszterin telítetlen kötéseiben szereplő szénatomokat klórozza. Ezáltal a plazmamebrán károsodik, amely végül a sejtek líziséhez és halálához vezethet¹⁰⁶.

A myeloperoxidáz által kiváltott károsító hatás aspecifikus, a kórokozókön kívül a gazdaszervezetet is érintheti. Ennek egyik fontos oka, hogy fent említett HOCl képző reakció, nemcsak izoláltan a fagoszómában játszódik le, hanem a sejtek degranulációja során az MPO az extracelluláris térbe is kerül. Szerepet tulajdonítanak az aktivált fehérvérsejtekből (neutrofil granulocyták és makrofágok) származó myeloperoxidáznak az alacsony sűrűségű lipoprotein (low-density lipoprotein, LDL) oxidációján keresztül, az atherosclerosis folyamatának beindításában¹⁰⁶. A myeloperoxidáz képes a plazmában lévő tirozin oxidálására reaktív tirozil-gyökké, amely az LDL lipidkomponensének lipidperoxidációját okozhatja. Valamint az enzim képes átalakítani a tirozint p-hidroxifenilacetaldehiddé, a plazmában jelen lévő szerint glikolaldehiddé, treonint pedig acroleáttá^{107, 108}. Ezek az aldehidek kovalens kötést létrehozva reagálnak az LDL proteinjeivel, amelyekben ennek nyomán keresztkötések jönnek létre. Az oxidált LDL-t aztán a makrofágok scavenger-receptora felismeri, és fagocytózis során a sejtekbe kerülnek. Ez a makrofágok habos sejtekké történő átalakulásának, és így atherosclerotikus plakk kialakulásának veszélyét növeli¹⁰⁸.

Az aktivált leukocyták képesek különböző xenobiotikumokat oxidálni és klórozni DNS-károsító vegyületeket hozva létre, amelyek karcinogenezist eredményezhetnek. Részben ez lehet a mechanizmusa az etopoziddal végzett kemoterápia után kialakuló szekunder akut myeloid leukémia, illetve a krónikus benzol-expozíció okozta leukémia kialakulásának^{109, 110}. Ezen anyagok átalakítása karcinogénekké legalább részben a leukocytákból származó myeloperoxidáz hidrogén-peroxid-függő működésének tulajdonítható. A myeloperoxidáz az ösztrogénreceptor pozitív emlőkarcinómák adjuváns terápiájában használt tamoxifent is képes DNS-károsító vegyületté alakítani¹¹¹⁻¹¹³. Bár ez az egyik legbiztonságosabbnak tartott tumorellenes szer, patkányokon

végzett vizsgálatokban hepatokarcinogénnek bizonyult. Az aktivált leukocyták még több más xenobiotikum által kiváltott karcinogenetikus folyamatban is részt vehetnek, mivel a benzidin, a methyldiaminoazobenzol és az aminofluorén DNS-károsodást idéznek elő myeloperoxidáz és hidrogén-peroxid jelenlétében ¹¹⁴. Az MPO ezeken kívül reaktív gyökökké képes alakítani a chlorpromazint, az aminopyrint és a phenylhydrazint ¹¹⁵.

Valószínűleg szerepe lehet a myeloperoxidáz általi oxidációnak különböző gyógyszerek okozta idioszinkráziás reakciókban is ¹¹⁶. Ilyen gyógyszerek a clozapin, aminopyrin, propylthiouracil, dapsone, procainamid és mások ¹¹⁷⁻¹¹⁹. Ezen reakciók gyakori célszerve a csontvelő, amelynek károsodása agranulocitózisban nyilvánul meg. Szólnak adatok amellett is, hogy a myeloperoxidáz a máj Kupffer sejtjeiből felszabadulva részt vesz a fájdalom- és lázcsillapító acetaminophen túladagolása által okozott májnekrozis kialakulásában, valamint a phenacetin okozta vesekárosodás folyamatában ¹²⁰.

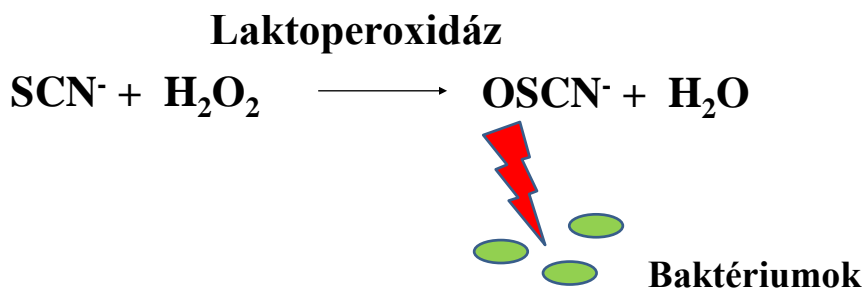
3.3.4. Az eozinofil peroxidáz

Az eozinofil peroxidáz (EPO) kifejeződése során a transzláció eredménye egy 715 aminosav hosszúságú polipeptid lánc, mely aztán proteolitikus átalakuláson megy keresztül. Az érés végeztével egy, az MPO monomerhez hasonló, 69,8 kDa tömegű, erősen kationos glikoprotein jön létre mely egy 57,9 kDa-os nehézláncból és egy 11,9 kDa-os könnyűláncból áll ^{121, 122}. Az EPO az egyik fő granulum fehérjéje az eozinofil granulocytáknak, melyek soksejtű paraziták eliminálására specializálódott sejtek. Az eozinofil granulocyták normálisan a fehérvérsejteknek mindössze ~2%-át teszik ki. Fontos szerepük van speciálisan a paraziták elleni védelemben, fertőzés esetén a számuk nagymértékben megemelkedik. Az eozinofil granulocyták szekréciós granulumaikat a parazita környezetébe ürítik, mely granulumok különféle neurotoxikus hatású fehérjék mellett nagy mennyiségű EPO-t tartalmaznak. Az EPO az eozinofil granulumok egyéb bázikus fehérjéihez hasonlóan a parazita felszínéhez köt, és lokalizáltan termel toxikus metabolitokat, így fokozva ölü hatását ⁷³. Az izolált EPO-ról kimutatták, hogy hatékonyan ölte a *Schistosoma mansoni* parazitát és antivirális hatása volt a humán immunodeficiencia vírus 1-es típusával (HIV-1) szemben ¹²³. Az előbb említett, EPO-ra jellemző ionos adherencia az alapja az enzim okozta epitheliális és intersticiális szövetkárosodásnak több, hiperszenzitivitás talaján kialakuló kórképben,

mint az asthma bronchiale vagy az eozinofil pneumonia^{124, 125}. Más betegségekben, mint a Hodgkin-kór, a krónikus myeloid leukémia vagy az endomiokardialis fibrózis, az extenzív eozinofil sejt-degranuláció és EPO depozíció járulékos szövetkárosodást okozhat¹²⁶. Ennek egyik útja az erősen fehérjekárosító hipobromit termelés, amelynek hatékonysága az EPO esetében egyedülálló a peroxidázok között¹²⁷. Az EPO a myeloperoxidázhoz viszonyítva sokkal lassabban végzi a klorid, és sokkal gyorsabban a bromid, a jodid, valamint a tiocianát oxidálását. Fontos még megemlíteni, hogy Xenopus májban azonosítottak egy 60 kDa molekulatömegű ribonukleázt, mely ez eozinofil peroxidáz génjének egy alternatív terméke¹²⁸⁻¹³⁰. A fehérje a PMR1 nevet kapta, és más endonukleázokhoz hasonlóan fontos szerepe lehet az mRNS szabályozott lebontásában, valamint mikroRNS molekulák létrehozásában¹³¹.

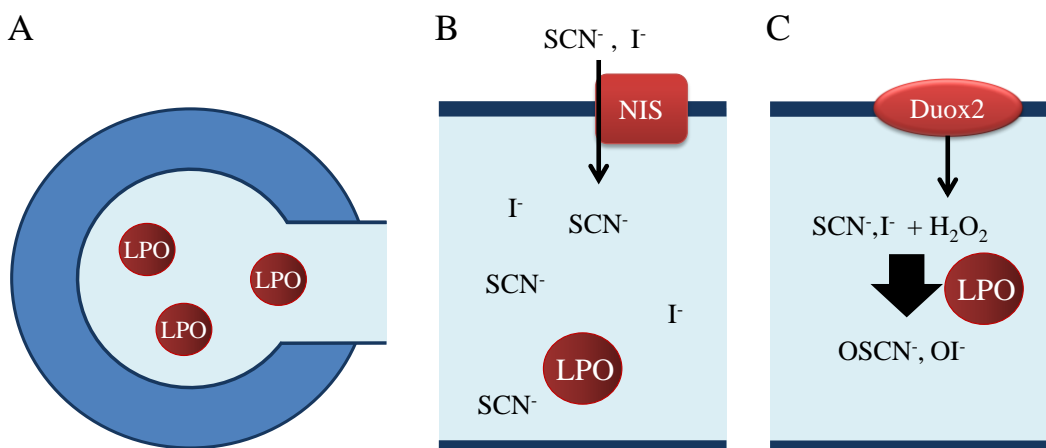
3.3.5. A laktoperoxidáz

A humán LPO egy monomer, 80 kDa molekulásúlyú, 712 aminosavból álló N- és O-glikozilációs helyekkel rendelkező glikoprotein, amelynek aminosav sorrendje az EPO és az MPO szekvenciájával is 51 %-os hasonlóságot mutat¹³². A laktoperoxidáz szekretoros szignál szekvenciát tartalmaz. Az enzimnek két alternatív splice-variánsát is leírták, ami magyarázhatja, hogy SDS-poliakrilamid gélen futtatva több specifikus csíkot detektáltak¹³³. A laktoperoxidázt exokrin mirigyek szekretoros sejtjei termelik és a különböző szekrétaumokban, mint a tej, könny és nyál fejt ki hatását. Ezen kívül a laktoperoxidáz enzim megtalálható még a nagy légutakban, ahol a tüdő védelmében játszik lényeges szerepet¹³⁴. Kimutatták például, hogy a birka tracheájában és bronchusaiban az LPO a teljes szekretált szolubilis fehérjék 1%-át teszi ki¹³⁵. Antimikrobiális működése analóg az előbbi két peroxidázéval. Hidrogén-peroxid jelenlétében elsősorban tiocianátot oxidál, így hipotiocianátot képez.¹³⁶



12. ábra A laktoperoxidáz katalizálta hipotiocianát képzés reakcióegyenlete. A képződött hipotiocianát a nyálkahártya felszínének védelmében szerepel.

A reakcióhoz szükséges H_2O_2 -ot termelhetik maguk a baktériumok vagy a NADPH-oxidázok családjába tartozó Duox enzimek. A HOSCN gyengébb oxidáló hatású, mint a fagoszómában keletkező hipoklórsav, azonban így a gazdaszervezet epithel sejtjeire is kevésbé káros, ami lényeges a rendszer konstitutív expressziója miatt. A OSCN^- -ion vizes közegben egyensúlyban van a hipotiociansavval ($\text{pK}_a=5,3$), mely membrán permeabilitásának köszönhetően a baktériumok intracelluláris oxidatív károsodását okozza. A nyál 6,5-ös pH értékénél a hipotiocianát-ionok 5,9 %-a van protonálva¹³⁷.



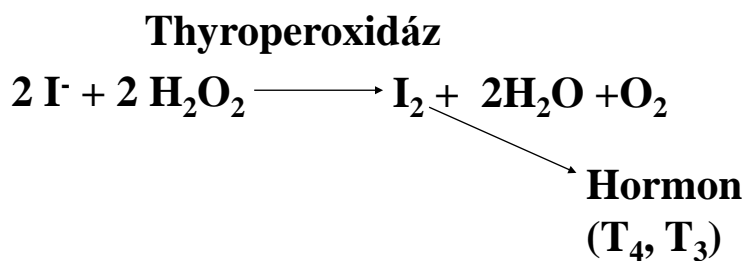
13. ábra: A Duox-laktoperoxidáz antimikrobiális rendszer modellje nyálmirigyben. Az LPO a szerózus acinusokban termelődik és szekretálódik (A), a kivezetőcsövek falában a NIS transzportálja a szekrétumba a jodid- és tiocionát-ionokat, melyek az LPO szubsztrátjai (B), végül a Duox2 enzim által termelt H_2O_2 a terminális csatornában adódik a nyálhoz (C)¹³⁸.

A saját nyálkahártyák védelmének funkcióján azonban túlmutat jelenléte a tejben, ami lehetővé teszi a szoptatás során az utód szájüregében és gasztrointesztinalis rendszerében is a még elégtelen antimikrobiális védelem erősítését ¹³⁹. A kórokozók elleni védő hatása mesterségesen több területen is felhasználásra kerül. Fogkrémekben alkalmazva hatékonyan gátolja különféle tejsavbaktériumok elszaporodását, ezáltal gátolja a savanyú pH kialakulását a szájüregben, ami fogszuvasodást okozhat. A WHO ajánlása alapján régóta használják olyan trópusi országokban, ahol hűtés nélkül kell egy bizonyos ideig eltartani a tejet. Tiocianát és hidrogén-peroxid hozzáadásával aktiválják a tejben természetesen jelen lévő LPO rendszert, ezáltal akár 30 °C-on is hat órán keresztül szállítható a tej minőségromlás nélkül ⁷³.

3.3.6. A thyroperoxidáz

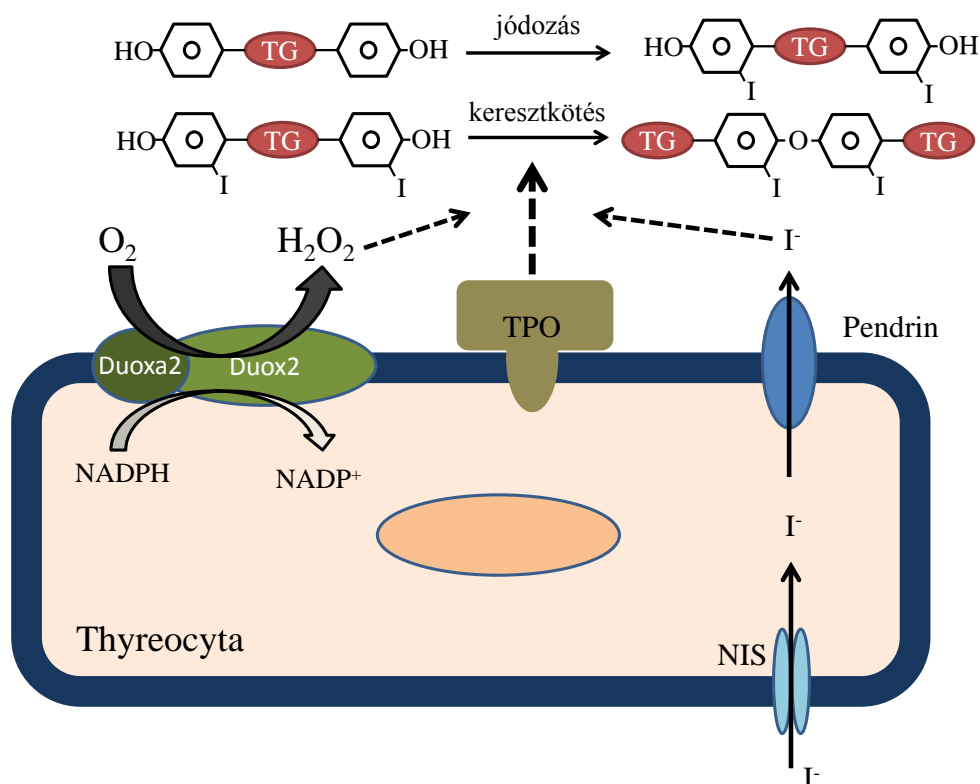
A TPO génje emberben az előző peroxidázokéitól eltérően nem a 17-es, hanem a 2-es kromoszómán helyezkedik el ⁸¹. Mindebből arra lehet következtetni, hogy a TPO az ősi peroxidáz géntől, amiből a többi humán peroxidáz kialakult, függetlenül fejlődött ki és eredetileg valamilyen más fehérjefunkcióért volt felelős, és csak később szerzett peroxidáz aktivitást. A gént 17 exon alkotja és a TTF-1, TTF-2, és Pax8 pajzsmirigy-specifikus transzkripciós faktorok szabályozása alatt áll. Az enzim első 735 aminosavat tartalmazó része 42 %-ban homológ a humán myeloperoxidáz szekvenciájával. A TPO egy glikozilált, heme-tartalmazó fehérje, mely a myeloperoxidáz család többi tagjával (MPO, EPO, LPO) ellentétben egy transzmembrán régiót is tartalmaz. Az aminosavsorrend analízise és az MPO-zal történő összehasonlítás alapján valószínűleg dimerizálódik. A thyroperoxidáz a pajzsmirigy hormonszintézisében vesz részt, a pajzsmirigy hormontermelő sejtjei, a thyreocyták termelik. Az enzim a sejtek apikális oldalán, a microvillusok plazmamembránjában található, katalitikus doménje a thyreocyták által alkotott folliculus lumenében helyezkedik el ¹⁴⁰. Itt két fontos reakciót katalizál hidrogén-peroxid jelenlétében. Először is a folliculus lument kitöltő tireoglobulin fehérje tirozin oldalláncainak jódozását végzi, amikor protein-kötött mono- és dijódtirozinok képződnek. Másodszor katalizálja a phenoxi-éterkötés kialakulását, amellyel létrejönnek a tireoglobulinhoz kötött hormonmolekulák, a tiroxin (T4) és a trijódtironin (T3). Ezekben a molekulákban két-két, kovalensen kötött tirozin

és három (T3) vagy négy (T4) jódmolekula található. A folyamathoz a H₂O₂-t a Duox2 NADPH-oxidáz enzim szolgáltatja.



14. ábra A TPO által katalizált reakció A thyriperoxidáz molekuláris jódhoz létre H₂O₂ felhasználásával a jodid ionokból mely aztán a hormonszintézishez használódik fel.

A TPO-nak a hormonszintézis folyamatában betöltött esszenciális szerepére utalnak azok a közlemények is, amelyek egyes primer hypothyreózis esetek hátterében ezen enzim defektusát találták ^{141, 142}.



15. ábra: A TPO szerepe a pajzsmirigy hormonszintézisében. Duoxa2/Duox2 enzimkomplex által termelt H₂O₂-ot a TPO a jodid-ionok oxidálására, majd tirozin aminosavak jódozására, végül a jódtirozinok keresztkötésére fordítja¹⁴³. (NIS: Na-iodide symporter, TG: Tireoglobulin)

3.3.7. A ciklooxigenáz enzimek

A peroxidáz család további tagjai a COX1 és COX2 (prostaglandin H szintáz 1-es és 2-es) enzimek, amely fehérik a prosztanoid hírvivők bioszintézisében szerepelnek. A COX1 génje a 9-es, a COX2-é az 1-es kromoszómán helyezkedik el. Ezek az enzimek egyidejűleg peroxidáz és ciklooxigenáz aktivitással is rendelkeznek, a molekula különböző régióhoz kötötten¹⁴⁴. Ciklooxigenáz aktivitásával prosztanoid G2 arachidonsavból való képződését katalizálja, a peroxidáz aktivitással pedig a prosztanoid G-t átalakítja prosztanoid H-vá¹⁴⁵. Ezen enzimek aminosavszekvenciája kisebb mértékű homológiát mutat a család más tagjaiéhoz, kristályszerkezetük azonban ennek ellenére nagymértékben hasonló a myeloperoxidázéhoz, ennek alapján tartoznak ugyanazon enzimesaládba.

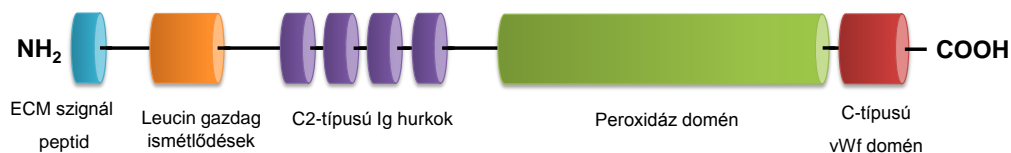
3.3.8. A peroxidazin fehérjék

A peroxidazinok az állatvilágban széles körben megtalálható, igen konzervált fehérjék. Az emberi peroxidazin fehérjék (PXDN vagy VPO1: vascular peroxidase 1 és PXDNL: peroxidasin-like vagy VPO2: vascular peroxidase 2) egyedülálló szerkezeti sajátosságokkal rendelkeznek a peroxidázok között, mert peroxidáz-homológ doménjeik mellett az extracelluláris mátrix fehérjékre jellemző motívumokat is tartalmaznak. Az emberi genomban két peroxidazin fehérjét kódoló gén található (*pxdn* és *pxdnl*), melyek közül a *pxdnl* azonosításáról és jellemzéséről a dolgozat saját eredményeimet tárgyaló fejezeteiben lesz szó.

A PXDN-t elsőként *Drosophila melanogaster*-ben azonosították, ahol az állat számos fejlődési szakaszában detektálták a gén expresszióját ¹⁴⁶. Humán homológiát először EB1 vastagbélrák sejtvonalból izolálták, melyben a p53 tumorszupresszor gén overexpressziójával kiváltott apoptózisban megnövekedett a PXDN expressziója ¹⁴⁷. Egy másik munkacsoport az előzőtől függetlenül melanómákból származó mintákban találta meg ugyanezt a gént, és mint Melanoma Gén 50 (MG50) írta le ¹⁴⁸. Később a peroxidazint több állatfajban is jellemezték, mint például *Xenopus tropicalis* ¹⁴⁹, *Caenorhabditis elegans* ¹⁵⁰, valamint az elmúlt néhány évben a humán fehérjéről is egyre több adat jelent meg ¹⁵¹⁻¹⁵⁶. Ebben a fejezetben a PXDN-ről az irodalomban megjelent kutatási eredmények összefoglalója olvasható.

3.3.8.1. A peroxidazin fehérjék szerkezete

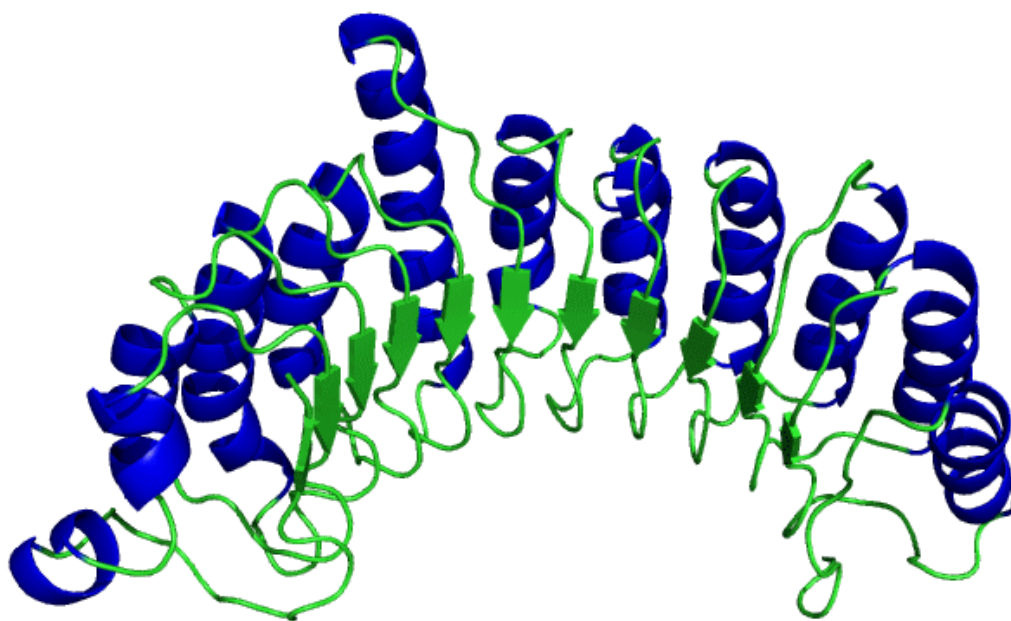
Az aminosav szekvencia alapján a fehérje azon fő doménjei, amelyeket az irodalomban megtalálható konszenzus szekvenciák meghatároznak, minden eddig leírt peroxidazinban megegyeznek.



16. ábra A peroxidazin fehérjék általános szerkezete

A fehérje N-terminálisan tartalmaz egy hidrofób szekréción szignált, így a primer szerkezet azt valószínűsíti, hogy a protein kikerül a sejtől. A protein szekréciónját először *Drosophilában* írták le, azonban exocitosisának pontos mechanizmusa nem tisztázott. A hemocyták sejt kultúrában és embrióban mutatott, peroxidazinra, valamint más ECM proteinekre (papilinre, kollagén IV-re és lamininra) vonatkozó jelölési mintázata azt sugallja, hogy ezek a fehérjék átmenetileg a durvafelszínű endoplazmatikus retikulumban, vagy citoplazmatikus vezikulumokban tárolódnak. *Drosophila* embrionális sejt kultúrákat radioaktív ként tartalmazó aminosavak hozzáadásával vizsgálva, a jelölt peroxidazin, más ECM-komponensekhez hasonlóan, a tápoldatban halmozódik fel, vagyis a sejtek kiválasztják. Az emlős peroxidazinra vonatkozó szekréción adatok is ismertek: heterológ expressziós rendszerben, HEK sejtekben expresszáltatva a fehérjét, az a médiumba kerül, valamint endothel sejtek monomer formában képesek kiválasztani és így megtalálható az emberi szérumban^{152, 154}.

A szignál peptidet követő, az érett fehérjében valószínűleg N-terminálisan található első domén leucin-gazdag ismétlődésekből (leucin-rich repeat: LRR) és az ezeket közrefogó cisztein-gazdag összekötő motívumokból áll. Az LRR domének 22-28 aminosavból álló ismétlődések, melyeket már sok változatos lokalizációval és biológiai funkcióval rendelkező fehérjében azonosítottak. Jellemző rájuk, hogy ha több található egymás után, félhold alakú formába rendeződnek, kialakítva egy β -redőkből álló belső, hidrofób felszínt. A struktúra fő funkciója protein-protein interakciók létrehozása, melyben általában az előbb említett hidrofób felszín vesz részt^{157, 158}.



17. ábra A sorba kapcsolt LRR domének szerkezete A belső konkáv, a képen zölddel jelölt hidrofób felszín gyakran biztosított strukturális alapot protein-protein interakciókhoz¹⁵⁷.

A C-terminus felé haladva az LRR-doméneket négy immunoglobulin C2-szerű domén követi. Ezek nagyfokú homológiát mutatnak más *Drosophila* és gerinces sejtadhéziós fehérjékben megtalálható Ig-hurkokkal. Ilyenek a neuroglian, a fascilin, az NCAM (idegi sejtadhéziós molekula), az L1 (idegi adhéziós molekula), vagy a Trk neutrophin receptorok. Az első Ig-hurkot a másodiktól egy az IgA-molekula nehézláncának hinge-régiójával homológ szakasz választja el a többitől. Ezek az erősen glikozilált struktúrák fehérjék közötti homofil és heterofil interakciók létrejöttét tudják mediálni adhéziós és receptor molekulákban^{159, 160}.

Az Ig hurkokat a fehérjében a peroxidáz domén követi, melynek különböző tulajdonságairól és funkciójáról a homológ peroxidáz fehérjék ismertetése kapcsán már esett szó. A peroxidazin peroxidáz doménjének enzimatis aktivitását két cikkben elemzik részletesen^{146, 154}. A *Drosophila* peroxidazin hem-kötését egyrészt a fehérjeoldat abszorpciós spektrumának hemre jellemző, 415 és 280 nm-nél lévő abszorpciós maximumai bizonyítják. Másrészt a monomer fehérjeláncok (lítium dodecil szulfát gél elektroforézis után is) képesek hem katalizálta oxidációs reakciók

véghezvitelére. Más peroxidázokkal történt összehasonlítás alapján a sejttenyészetből tisztított peroxidazinban kevesebb, mint egy hem molekula jut egy 170 kDa-os fehérjeláncre. Lehetséges, hogy a Kc7E10 sejtekben elégtelenül történik a hem beépítése az enzimbe; valamint az is, hogy a hem az izoláció során vesz el.

A tisztított peroxidazin peroxidáz-aktivitással rendelkezik: *in vitro* szubsztrátja az o-dianizidin, a tirozin, amelyből ditirozint képez és különböző fehérjék, amelyeknek oxidatív jódozását végzi nátrium-jodid és hidrogén-peroxid jelenlétében. Részben a hem már említett elégtelen jelenléte lehet az oka a peroxidazin esetében mért percenkénti átalakított o-dianizidin mennyiség alakulásának. Ez 1200/s-nak adódott, míg az ovoperoxidázra, az MPO-ra illetve az LPO-ra 20000/s és 52000/s közötti mennyiség a jellemző. A ditirozinképződés viszont nagyobb sebességgel megy végbe a peroxidazin, mint az utóbbi enzimek jelenlétében. Az enzimaktivitás gátlódik nátrium-azid jelenlétében, hidrogén-kloridos denaturálás hatására és melegítésre (62°C). Ezeken kívül különösen érzékeny a peroxidáz-gátló phloroglucinolra. A cetyl-tetramethylammonium-bromid egy detergens, amely gátolja a hem és több hem-protein, mint például a citokrómok által katalizált, nem specifikus oxidációs reakciókat. Ennek az anyagnak a jelenlétében a peroxidazin enzimaktivitása szignifikánsan nő. Ez a növekedés nyilvánvaló gátlóanyag-felszabadulás vagy proteolitikus hasítás nélkül jelenik meg és nem tulajdonítható az egyidejűleg jelen lévő bromid-ionok hatásának sem. Valószínűleg a harmadlagos fehérjeszerkezet átalakulásának, a molekula konformációváltozása hatására bekövetkező kedvezőbb szubsztráthozzáférés eredménye.

A humán peroxidazin peroxidáz doménjét és aktivitását először G. Cheng és munkatársai jellemezték ¹⁵⁴. A peroxidáz domén 42, 41, 39, 41, 21 és 19% homológiát mutat a humán MPO, EPO, LPO, TPO, Duox1 és Duox2 megfelelő részeivel. A fehérjét HEK293 sejtekben, hematin és NaBu (hiszton deacetyláz inhibitor) jelenlétében expresszáltatva jelentősen oxidálta a TMB-t (3,3',5,5'tetrametilbenzidin), ami aktív peroxidáz funkcióra utal. A tisztított fehérje spektroszkópos analízisével megállapították, hogy hemet tartalmaz, sőt egy SDS gélelektroforézist követő kemilumineszcens mérőmódszerrel azt is megállapították, hogy a hem kovalensen kötődik a fehérjelánchoz. A peroxidáz aktivitás vizsgáló további kísérletek megállapították, hogy TMB szubsztrátot alkalmazva az enzimaktivitás viszonylag

független a Ca^{2+} koncentrációtól (100nM-1mM) és a pH-tól (3,6-8) és az értéke kb. 2-5%-a az MPO és LPO aktivitásának. A K_m érték H_2O_2 -re 1,5 mM-nak adódott, míg ugyanez az érték az MPO és az LPO esetén 0,5 és 0,2 mM¹⁵⁴.

A fehérje C-terminális része tartalmaz egy konzervált ciszteinekben gazdag von Willebrand faktor C-típusú (vWF-C) domént, ami homológ a gerinces thrombospondinok és prokollagének, komplement faktorok egyes részeivel, valamint a von Willebrandt proteinnel. Ezek a domének általában 70 aminosav hosszúságúak és 10 konzervált cisztein oldalláncot tartalmaznak, melyekről feltételezik, hogy fehérjék oligomerizációjában szerepelhetnek¹⁶¹. A *Drosophila* peroxidazin kapcsán már ismert, hogy trimer formájában szekretálódik, így lehetséges, hogy ez a domén áll az trimerizáció hátterében.

3.3.8.2. A peroxidazin expressziója különböző speciekben

A peroxidazint először egy rovarfaj, a *Drosophila melanogaster* egyedfejlődésében szereplő új enzim-mátrix proteinként írták le és jellemezték¹⁴⁶. A peroxidazin expresszióját egész embrióban *in situ* hibridizációval és immunfestéssel, lárvából és felnőtt állatból származó szöveteken immunfestéssel vizsgálták. Az *in situ* hibridizációs vizsgálatok tanúsága szerint a peroxidazin eredetileg hemocytákban, később a zsírtest sejtjeiben is átíródik. Az átíródás elsőként a procephalikus mezoderma két lemezének területén történik. A korai hemocyták is először ezen a területen jelennek meg, majd előre vándorolnak a fej régióba, valamint a ventrális oldalra és a dorsalis felszínen a kiterjedt csírköteg területére is. A következő fejlődési stádiumban további vándorlás történik az embrió elülső részéből posterior irányba, végig a ventrális és a dorsalis oldalon. A ventrális oldalon először az ideghúr és az epidermis közé, tehát az ideghúr ventrális felszínére kerülnek, majd röviddel ezután megtalálhatóak a dorsalis felszínén is. Amikor a dorsalis helyzetű csírköteg retrakciója bekövetkezik, a hemocyták benépesítik a bélkezdeményt. A fejlődés későbbi stádiumaiban is ugyanígy, az embrióban belül elszórtan, a bazális membránok képződési helyein, a bél, az ideghúr és az agy körül találhatók meg¹⁴⁶.

Ez alatt a vándorlás és differenciálódás alatt a hemocytákban mindvégig, egyre növekvő mennyiségben expresszálódik peroxidazin, amint azt az *in situ* hibridizációs és immunfestés vizsgálatok egyaránt mutatják. Ez a peroxidazinnak ismét egy más

peroxidázoktól eltérő tulajdonsága, az MPO például csak a granulocyták korai, premyelocyta stádiumában expresszálódik ¹⁴⁶.

A peroxidazin termelését ezen kívül több ECM-protein egymást követő kifejeződése kíséri. A peroxidazin megjelenését a bazális membránokban található proteoglikán, a papilin expressziója követi. Ezután kezdik a hemocyták a laminin, majd a kollagén IV, a glutacin és a tigrin szintézisét és szekrécióját. Kettős jelöléssel, késői stádiumú embriókon végzett immunfluoreszcens vizsgálatok alapján a hemocyták több mint 95%-ában a peroxidazin és a kollagén IV egyaránt kifejeződik. Tehát a peroxidazin ugyanazon sejtek terméke, amelyek az extracelluláris mátrixot formálják és bazális membránok alakjában rakják le. A peroxidazin ennek megfelelően a bazális membránokban rakódik le az embriogenezis során. A lárvák és felnőtt állatok anti-peroxidazin antitesttel történt festése során több szervben detektálták a fehérjét. Lárvában a zsírtestben, az emésztőszervben, a nyirokmirigyekben és a szárny véna sejtek bazális felszínének mentén volt látható ¹⁴⁶.

Régóta ismert, hogy a *Drosophila* ovárium tartalmaz egy peroxidázt, amelynek ditirozin keresztkötések létrehozásával a petesejtet védő chorion burok megszilárdításában van szerepe. A felnőtt állat ováriumának késői stádiumú tüszői peroxidazinra határozott festődést mutattak, de gyengébb jelölődést a korábbi stádiumú tüszőkben is ki lehetett mutatni. Differenciálódásuk során az oocytákban és dajkasejtjeikben egyformán detektálható a peroxidazin. A folliculus sejtek csak gyengén jelölődtek. A chorion kialakulása folyamán a szövetek impermeábilissá válnak, így a jelölés a további stádiumokban nem kivitelezhető ¹⁴⁶.

Xenopus tropicalisban a peroxidazin expresszióját az embrionális fejlődés folyamán, RT-PCR és egész embriókon végzett *in situ* hibridizációs technikával vizsgálták. Az eredmények alapján a peroxidazin a fejlődés folyamán végig expresszálódik ¹⁴⁹.

A zigóta eredetű expresszió először neurula stádiumban jelenik meg, elsősorban a fejlődő idegcső területén, de alacsony mértékű expresszió észlelhető a nem idegi ektodermában is. Az idegcső záródása után a peroxidazin mRNS-e az embrió néhány jól körülhatárolt területén detektálható. Ezek a kopolyúívek, a farkbimbó és a fejlődő szem területe. Ezek mellett az intermediális mezodermában a pronephros

kezdeményének területén is határozott expresszió található. Halvány jelölődés a korábbi stádiumokban is látható ezen a területen ¹⁴⁹.

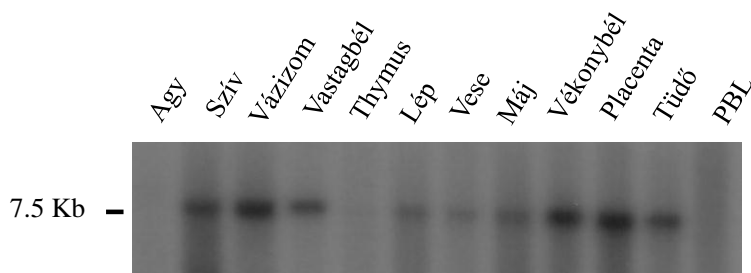
A további fejlődés folyamán, az idegcsövön belül eleinte a középagy és a hátsóagy jelölődik, később inkább a két terület határrégiója. A szem területén az expresszió egyre inkább a fejlődő lencsére korlátozódik. Jelölődik még a hátsó farok uszony, valamint a proctodeum. A pronephrosban az expresszió a tubulusok és a gyűjtőcsatorna területére lokalizálódik. Itt a peroxidazin expressziója végig nagymértékű marad, de emellett a késői embrióban mindinkább általánossá válik az összes szövetben ¹⁴⁹.

A *C. elegans* genom két igen hasonló peroxidazin fehérjét kódol a PXN-1-et és a PXN-2-t. Gotenstein és munkatársai részletesen jellemezték a PXN-2 expresszióját egy fluoreszcens *pxn-2* transzkripció reportert tartalmazó genetikai modellel. A konstrukt a *pxn-2* gén promoterének egy 1,8 kb szakaszát tartalmazta, mely a GFP fluoreszcens fehérje expresszióját szabályozta. Az expressziót először a késői gasztrulációban (kb. 200 perccel az első osztódást követően) tapasztalták, és később az egyedfejlődés minden szakaszában megfigyelték (embrió, lárva, felnőtt) a differenciálódott epithelsejteken. Kifejlett egyedekben a vulva izomzatában is kifejeződött a fluoreszcens reporter, valamint néhány idegképletben, mint például a PVQ-ban (posterior ventral neuron Q) ¹⁵⁰.

Egér embriókon végzett *in situ* hibridizációs kísérletek alapján az egér PXDN minden szövetben expresszálódik. Az idegrendszert vizsgálva megállapították, hogy a telencephalon és a mesencephalon bizonyos sejtrétegei nagy mennyiségben expresszálják a PXDN-t, azonban pontosan nem tudták azonosítani a sejteket. Kimutatták, hogy nagy mennyiségben expresszálódik a gén a fejlődő végtagokban, az embrionális májban, szívben és emésztőrendszerben ¹⁵⁸. A kifejlett egyedeken végzett expressziós vizsgálatok egyelőre még váratnak magukra.

A humán peroxidazin expresszióját vizsgáló korábbi Northern blot kísérleteink az irodalmi adatokkal egybehangzóan azt találták, hogy a PXDN mRNS-e széleskörűen expresszálódik a szövetekben, kivéve az agyat és a fehérvérsejteket ^{147, 154}. A legnagyobb mértékű expressziót a szívben, a placentában, a lépben, az ováriumban és a belekben volt megfigyelhető. Az mRNS hozzávetőleges mérete 7,5 kb-nak adódott, a herében azonban detektáltak egy kisebb, 4,5 kb méretű homológot is. Ez a Northern

blothoz felhasznált DNS-próbák peroxidazinon belüli elhelyezkedése alapján az mRNS 3' végével, tehát a fehérje C-terminális részével homológ, a peroxidáz domént is tartalmazó, alternatív forma lehet. Ebből kiindulva Horikoshi és munkatársai úgy vélték, hogy nem tartalmazza az N-terminális extracellulárisan irányító szignál peptidet, tehát az eredeti peroxidazinnal ellentétben, a sejten belül marad.



18. ábra A PXDN-t kódoló mRNS expressziós mintázata humán szövetekben A peroxidazint kódoló mRNS az agy kivételével minden szövetben kimutatható (Laborunk korábbi eredményeiből).

3.3.8.3. A peroxidazin fehérjék funkciói

Mivel a fehérjék nem régóta ismertek ezért, viszonylag kevés funkcionális adat áll rendelkezésre velük kapcsolatban. Azonban fontos megjegyezni, hogy az elmúlt évben jelentek meg és sorra jelennek meg közlemények, amelyek genetikai evidenciát tudnak egy-egy funkció mögé helyezni, vagy esetleg a gének mutációja olyan funkcióra hívja fel a figyelmet, amire a fehérje szekvencia adatok analíziséből nem lehetett következtetni.

C. elegans-ban a PXN-2 esszenciális az embriogenezis késői elongációs szakaszában, ahol az epithel sejtek fejezik ki¹⁵⁰. Mutációja esetén nem jön létre megfelelő kapcsolat az izmok és az epidermis között, mely fenotípus nagyon hasonló más bazális membrán fehérjéket kódoló gének hiányában tapasztalható fenotípusokhoz^{162, 163}. Azt találták, hogy a PXN-2 fontos szereplő a bazális membránok szintézisének késői lépéseiben. Hiányának tünetei főleg olyan helyeken jelennek meg a feregben, ahol erős adhézióra van szükség a sejtek és az extracelluláris mátrix között. A *pxn-2* mutáns állatok súlyos garat disztrófiát mutattak. Feltételezhető, hogy ebben a feregfajban a

garatizmok állandó, viszonylag intenzív mozgása jelentős mechanikai stresszt képvisel, ami egy mechanikailag stabilabb bazális membránt kíván, mint a szervezet más részei. *C. elegans*-ban a PXN-2 hiánya befolyásolja a sérülést követő axon-regenerációt is kifejllett állatokban. A szerzők azt találták, hogy a PXN-2 mintegy inhibitorként működik a folyamatban, hiányában az állatok fokozott axon növekedést mutattak a sérülés helyén.

Az emberi peroxidazin funkciójával kapcsolatban genetikai vizsgálatok szolgáltatottak adatokat ¹⁵⁰. Két anterior szegmentum diszgenezisben (ASD) szenvedő pakisztáni család esetében mutatták ki, hogy az elváltozás hátterében a *pxdn* gén mutációi állnak. Az anterior szegmentum diszgenezis egy heterogén fejlődési rendellenesség csoport, melyre jellemző, hogy a szem elülső csarnokát érinti, valamint, hogy ezeknek a betegeknek jóval nagyobb esélyük van glaucoma kialakulására. A genetikailag érintett betegekben megfigyelhető volt cataracta, mikrocornea, a cornea transzparencia változó mértékű csökkenésével. Az egyik család esetében a glaucoma is öröklődő módon jelentkezett. A publikált eredmények alapján a PXDN nélkülözhetetlen a normális szemfejlődéshez, ahol egyrészt lehetséges, extracelluláris mátrix proteinként strukturális alkotója a lencsének és a corneának. Másrészt az enzimatis funkcionak jelentősége lehet az oxidáns-antioxidáns egyensúly beállításában a szem elülső részének képleteiben.

További funkcionális adatok is fellelhetőek az utóbbi néhány év irodalmában, ám ezek a fehérjefunkciók többnyire még nem bizonyítottak, inkább a szekvenciából, expressziós mintázatból és az enzimatis aktivitásból kiinduló következtetések. A humán és egér peroxidazinnak felvetették már szerepét az LDL (low density lipoprotein) oxidációjában és az ennek következtében bekövetkező endothel sejt apoptózisban ¹⁵³. Lehetséges, hogy a myeloperoxidázhoz hasonlóan, HOCl képzésen keresztül a szervezet védekező mechanizmusaiban szerepel ¹⁵². Egy másik munkacsoport eredményei pedig arra utalnak, hogy a PXDN a tumorsejtek adhéziójában lehet fontos ¹⁵⁶.

4. Célkitűzések

A PhD dolgozatomban tárgyalt saját munkám alapvetően két részre bontható. Az első részben az MRTF transzkripciós faktorok EMT jelátvitelben betöltött szerepéről lesz szó, mely munkát Kapus András laboratóriumában végeztem a St. Michael's Hospital-ben (Toronto, ON, CA). A második részében pedig a peroxidazin fehérjék jellemzésével kapcsolatos eredményeinket fogom bemutatni. Ezeket a kísérleteket Geiszt Miklós irányítása alatt végeztem a Semmelweis Egyetem Élettani Intézetében.

Munkánk során az alábbi célokat tűztük ki magunk elé:

1. A heterológ módon expresszált MRTF-transzkripciós faktorok jellemzése LLC-PK1/AT1 sejtekben.

Az MRTF transzkripciós faktorok lokalizációs különbségeinek meghatározása mesenchymális és epitheliális sejtekben.

A heterológ módon expresszált MRTF-B jellemzése a kontaktsérüléshez kapcsolódó jelátvitelben.

2. A PXDN fehérje vizsgálata *in vitro* és *in vivo*.

A PXDN fehérje lokalizációjának azonosítása humán primer sejtekben.

A fehérje expressziós és lokalizációs változásainak jellemzése a fibroblaszt-myofibroblaszt átalakulás során.

A peroxidáz aktivitás szerepének vizsgálata a fehérje szekréciójában.

A PXDN jellemzése egy egér vesefibrózis modellben.

3. A humán PXDNL jellemzése.

A PXDNL azonosítása és klónozása valamint expressziós mintázatának meghatározása.

A PXDNL lokalizációjának és enzimaktivitásának jellemzése heterológ expressziós rendszerben.

Az endogén módon kifejezett PXDNL lokalizációjának azonosítása.

A PXDNL expresszió szerven belüli eloszlásának vizsgálata egészséges és dilatatív cardiomyopathiás szívekben.

5. Anyagok és módszerek

5.1. Munkánk során használt anyagok:

Az alábbi ellenanyagokat használtuk kísérleteinkhez: Alexa488 és Alexa568 jelölt nyúl és eger elleni Fab (Life Technologies), PDI (RL90) és Fibronektin (IST-9) elleni antitest (Abcam, Cambridge, UK), Lamin antitest (Santa Cruz Biotechnology), β -aktin, FLAG és SMA antitest (Sigma-Aldrich), anti-V5 antitest (Serotec), protein G gyöngy (Life technologies). A kísérletekhez használt vegyszereket, reagenseket a Sigma-Aldrich-től szereztük be, ha azt az adott kísérlet ismertetésénél nem jeleztük másként. A dilatatív cardiomyopathiás és egészséges humán szövetmintákat, melyek transzplantáció során eltávolított szervekből származnak Dr Ajah Shah (King's College, London) kollaborációs partnerünktől kaptuk.

5.2. Anti-PXDN és PXDNL ellenanyag

Nyulakat immunizáltunk a PXDN C-terminális részét (1329-1479 AS) vagy a PXDNL C-terminális részét (1312-1463 AS) tartalmazó GST fúziós fehérjével, majd a szérumból ugyanezekkel az Affigel 10 (BioRad Laboratories, Richmond, CA, USA) gyöngyre kötött antigénekkal affinitáskromatográfiás eljárással tisztítottuk a poliklonális ellenanyagunkat. A PXDN és PXDNL fehérjék legkevésbé homológ részei C-terminálisan találhatóak, éppen ezért választottuk ezeket a szakaszokat a nyulak immunizálásához. Itt a két fehérjelánc közötti azonosság 42% a hasonlóság pedig 51%. Az antitestek tesztelése során megállapítottuk, hogy a PXDN ellen termelt antitest felismeri a PXDNL-t. Ez a tény azonban a kísérletek szempontjából nem jelentett problémát, ugyanis a sejt kultúra modellben végzett kísérletekben az antitesttel detektált jelet mindig ellenőriztük siRNS-sel az állatkísérletben pedig egy eger betegség modellt használtunk, mely species genomja nem tartalmazza a *pxdnl*-t. A PXDNL ellen termelt antitestünket is teszteltük overexpressziós rendszerben de nem mutatott keresztreakciót a PXDN-nel. Az antitestek tesztelését elvégeztük C-terminálisan V5-epitóppal taggalt

fehérjékkel is, és megállapítottuk, hogy a jelölés nem változtatta meg az az általunk termelt antitestek antigén felismerését.

5.3. Sejtkultúra

A COS-7 sejteket 10% FBS-t, 50 U/ml penicillint és 50 µg/ml streptomycint tartalmazó Glutamax DMEM médiumban növesztettük. A human primer tüdőfibroblasztokat (PromoCell, Heidelberg, Germany) 2% FBS, 5 µg/ml Insulin, 1 ng/ml FGF tartalmú FBM-ben növesztettük. Az EMT kísérleteinkhez sertés eredetű, proximális tubulus hámsejt vonalat, az LLC-PK1 sejteket használtunk. Az eredeti vonalból szelektált C14 klón, amely az angiotenzin II AT1-es receptorát stabilan expresszálja Dr. R. Harris ajándéka¹⁶⁴. Az LLC-PK1 sejtek széles körben használt, jól karakterizált alanyai nefrológiai és fiziológiai kutatásnak¹⁶⁵. A sejteket alacsony glukóz tartalmú Duplecco's Modified Eagle médiumban (DMEM) tenyésztettük (1000 mg/l glukóz) a következőkkel kiegészítve: 100 IU/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 10% FBS. Minden sejtet 5% CO₂-tartalmazó, vízgőzzel telített inkubátorban tenyésztettünk 37 °C-on. A TGF-β1 kezeléseket megelőzően a sejteket 0,05% FBS tartalmú médiumban tartottuk egy éjszakán keresztül. A TGF-β1 (R&D Systems) kezelés szérumentes környezetben történt 24-48 órán keresztül. Az esetek egy részében a kezeléseket kiegészítettük 500 µM δ-aminolevulinsav (Sigma-Aldrich) hozzáadásával.

Az extracelluláris kalcium szint csökkentéséhez a sejteket alaposan mostuk kalciummentes foszfát puffer oldattal (PBS), majd megfelelő mennyiségű szérumentes, alacsony kalcium koncentrációjú DMEM (Gibco-BRL) oldatot adtunk a tenyésztőedényekbe. A sejtek a kalcium-függő sejtadhéziók hiányában kb. 30 perc alatt szeparálódtak egymástól.

Az emlős expressziós vektorokat Fugene6, Fugene HD (Roche Diagnostics), Lipofectamine 2000 vagy Lipofectamine LTX (Life technologies) transzfekciós reagenssek segítségével juttatuk a sejtekbe a gyártók által ajánlott utasításoknak megfelelően. Az siRNS transzfekciókhoz Interferin siRNA (Polyplus Transfection) vagy RNAiMAX (Invitrogen) reagenszeket használtunk.

5.4. PXDN siRNS szekvenciák

A szekvencia specifikus és kontroll Stealth siRNS oligonukleotidokat az Invitrogen-től szereztük be. A pontos szekvenciákat az 19. számú ábra tartalmazza.

| Név | Szekvencia (5'-3') |
|-----------------|-----------------------------------|
| PXDN-1 | CCU CCA UCC UAG AUC UUC GCU UUA A |
| PXDN-1 kontroll | CCU CCC UCA UAG AUG UUC CCU UUA A |
| PXDN-2 | GCA UAA CAA CCG GAU UAC ACA UUU A |
| PXDN-2 kontroll | GCA UCA AAA CCG GAU AAC UCA UUU A |

19. ábra PXDN siRNS szekvenciák

5.5. Western blot kísérletek

A fehérjemintákat 4x Laemmler pufferben vettük fel, majd 10 percig 100 °C-on denaturáltuk. Ezek után a minta fehérjéit 8 vagy 10 %-os, SDS-poliakrilamid gélen szeparáltuk. A gélen elválasztott fehérjéket nitrocellulóz membránra blottoltuk (12 óra, 45 V), majd 5 %-os tejport és 0,1 % Tween20-at tartalmazó PBS-ben blokkoltuk. Az elsődleges antitestekkel 1 órát inkubáltuk a blokkoló oldatban szobahőmérsékleten, majd 6x5 perces mosás után, HRP-konjugált anti-nyúl vagy anti-egér másodlagos antitestet (Amersham Pharmaceuticals) használtunk 1:5000 hígításban, melyet egy kemilumineszcencia elven működő eljárással (ECL, GE Healthcare) előhívtunk, majd a jelet FUJI Super RX filmen detektáltuk.

A PXDN precipitációs kísérletekhez a 1:4 arányban 100 % triklór-ecetsavat adtunk a sejtekről eltávolított médiumhoz. A mintákat 10 percig jégen tartottuk, majd a precipitátumot kifugáltuk az oldatból (14K rpm, 5 perc). A csapadékot ezután 3x jéghideg acetonnal mostuk, majd 95 °C-ra helyeztük 5 percre. A kiszárított mintát 4x Laemmler pufferben vettük fel és 10 percig főztük mielőtt az SDS-poliakrilamid géltre töltöttük.

A PXDN oligomerizációs vizsgálatok során a minta fehérjéinek szeparálására minden esetben SDS-poliakrilamid gélelektroforézist végeztünk. Nem redukáló

körülmények között a standard minta (Laemli) puffer nem tartalmazott β -2-merkaptotetanolt, redukáló körülmények között pedig igen.

5.6. Peroxidáz aktivitás mérése

A PXDN cDNS-ével transzfektált COS-7 sejteket két nappal a transzfekció után 1 % hexadeciltrimetilammónium-bromidot tartalmazó PBS-ben lizáltuk, majd a lizátum peroxidáz aktivitását mértük Amplex Red H_2O_2 /Peroxidase Assay módszerrel (Molecular Probes) a használati utasításban leírtak szerint. A reakcióban keletkezett resorufin fluoreszcenciáját 30 perc után 550 nm-en excitálva 590 nm hullámhosszon mértük. Kontrollként üres pcDNA3.1 plazmiddal transzfektált COS-7 sejtizátumot használtunk.

5.7. H_2O_2 -mérés Amplex Red módszerrel

A TGF- β 1 indukálta H_2O_2 termelést 12 lyukú tenyésztőedényben lévő, letapadt sejteken végeztük. A sejteket 1 órán keresztül tartottuk 50 μM Amplex Red-et és 0,1 U/ml HRP-t tartalmazó 145 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 0.8 mM CaCl_2 , 5 mM glukóz és 10 mM HEPES médiumban, majd a sejtektől mentes médiumban mértük a képződött resorufin fluoreszcenciáját.

5.8. Immunfluoreszcens jelölés és konfokális lézer mikroszkópia

A fedőlemezen növesztett sejteket 4 % paraformaldehid tartalmú PBS-ben fixáltuk 30 percig szobahőmérsékleten. Ezután PBS-sel ötször mostuk, majd 100 mM glicint tartalmazó PBS-ben inkubáltuk. Ezt követően PBS-sel kétszer mostuk, majd 1 % marha szérum albumin és 0,1 % Triton X-100 tartalmú PBS-sel 20 percig szobahőmérsékleten permeabilizáltuk. 3 % albumin oldatban egy órát blokkoltuk, majd a megfelelő antitestekkel egy órát inkubáltuk. A primer antitetestet 3 % albumint tartalmazó PBS-ben oldottuk. Inkubálás után PBS-ben hatszor mostuk, majd 1 órát inkubáltuk a másodlagos antitesttel. Végül a fedőlemezeket Mowiol 4-88 (polivinil-alkohol 4-88 és glicerin vizes oldata, pH Tris-sel 8,5-re állítva) médiumban fedtük. A

felvételeket egy Zeiss LSM 510 konfokális lézer mikroszkóppal 63x-os, 1,4 numerikus apertúrájú plan Achromat vagy 40x-es, 1,3 numerikus apertúrájú plan Neofluar immerziós objektívekkel készítettük. Az excitációhoz 25 mW-os argon lézert (488 nm) és 1 mW-os hélium/neon lézert (543 nm) alkalmaztunk. Az emissziót 500- 530-nm-es szűk sávú filterrel detektáltuk az Alexa 488, és egy 560-nm felett átengedő széles sávú filterrel az Alexa 568 fluorofór esetében. 1-2 μ M optikai szeletvastagságú képeket készítettünk. A fluorofórok közötti átbeszélés elhanyagolható volt.

Az EMT-hez kapcsolódó kísérletek esetén az immunfestéshez használt protokoll megegyezett az előbb ismertetettel. A mintákat ebben az esetben egy Olympus IX81 fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk, melyet QED InVivo Imaging szoftver vezérelt.

5.9. Az MRTF proteinek nukleáris/citoszolikus megoszlásának vizsgálata

Az MRTF-B-Flag festések kvantifikálásához az ImagePro Plus szoftvert használtuk. A fluoreszcencia intenzitását vagy három egy egyenes mentén elhelyezkedő véletlenszerűen kiválasztott ponton, vagy pedig három véletlenszerűen kiválasztott region of interestben (ROI) mértük meg a sejtmagban és citoplazmában. A két módszerrel nyert értékek szignifikánsan nem különböztek egymástól. A mag területén és a citoplazma területén mért három-három értékét átlagoltuk, majd ezt használtuk fel a mag/citoplazma hányados számításához. A mag pontos lokalizációjának meghatározásához DAPI festéket használtunk. Az így nyert értékeket aztán három kategóriába soroltuk: Ha a hányados $< 0,75$ a festődés citoszolikus, ha $0,75$ és $1,25$ közé esett, akkor a festődés mag és citoszol, ha pedig $> 1,25$, akkor nukleáris festődés kategóriába került.

5.10. Northern blot

A humán PXDNL mRNS expressziójának vizsgálatához a Clontech cég humán Northern blot szövetpanelét használtuk (2-2 μ g poli [A]⁺ RNS). A hibridizációhoz a jelölt nukleotidsort a random primed labeling metodika alapján készítettük. Először egy polimeráz láncreakcióval kiterjesztettük a humán PXDNL cDNS-ének 3' UTR-ben található körülbelül 400 bázispárt tartalmazó szakaszát. Ezt a DNS-t denaturáltuk (100

°C, 5 perc). A jelölt próba szintéziséhez a primereket egy olyan hexanukleotid mix alkotta, mely a 6 nukleotidot minden lehetséges variációban tartalmazta. A szintézist a DNS polimeráz I Klenow alegysége végezte, melynek hiányzik az exonukleáz aktivitása. A reakcióhoz felhasznált nukleotid mix rádioaktív foszfor izotópot tartalmazó CTP molekulákat tartalmazott. A jelölés során a hexanukleotid oligók véletlenszerű helyeken tapadtak a DNS láncokhoz, így különböző hosszúságú, az eredeti szekvenciával komplementer béta-sugárzó DNS láncok jöttek létre.

A hibridizációt az alábbi metodika szerint végeztük. Az előhibridizáció során lazac spermiumokból preparált DNS-sel blokkoltuk a membránt. Ehhez a 0.5 ml 1 mg/ml koncentrációjú lazac DNS-t denaturáltuk (100 °C, 5 perc), majd evvel egy órán keresztül 65 °C-on inkubáltuk a membránt 25 ml prehibridizációs pufferben (6,25ml 20xSSPE, 0,5ml 5 % PPI, 1,25 ml 100x Denhardt's solution, 0,625 ml 10% SDS, 16,37 ml desztillált víz). Ezek után denaturáltuk a jelölt humán PXDNL-ből származó nukleotidsort (100 °C, 5 perc), majd hozzáadva a prehibridizációs pufferhez egy éjszakán keresztül 65 °C-on forgattuk egy inkubátorban. A hibridizáció után kétszer mostuk a membránt szobahőn 2x SSPE, 0,1% SDS-t tartalmazó oldatban, majd 65 °C-on kétszer tíz percig 1xSSPE, 0,1% SDS-ben. Ezek után egy előhívó kazettában történt az expozíció.

5.11. *In situ* hibridizáció

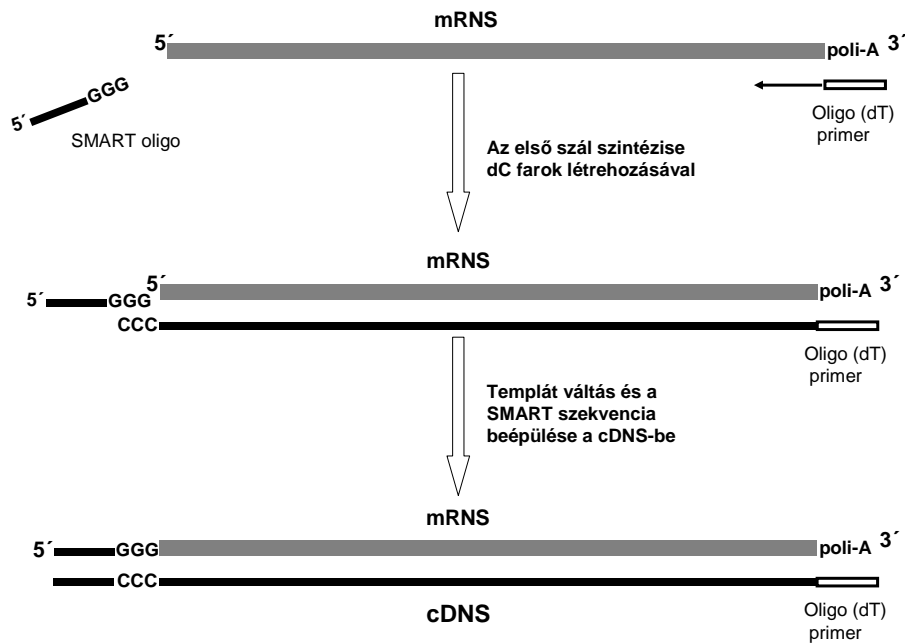
Az *in situ* hibridizációs kísérleteket Tóth Zsuzsannával (SE Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet) kollaborációban végeztük. A metszetek készítéséhez friss, fagyasztott szöveti blokkokból metszettünk 12 µm vastagságú szövetmintákat egy cryostat (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) segítségével. A metszeteket 37 °C-on a pozitívan töltött Supefrost Plus (Thermo Scientific, Budapest, Hungary) tárgylemezre fixáltuk és -80 °C-on tároltuk felhasználásig. A hibridizáció 55 °C-on történt egy éjszakán keresztül, 10⁶ cpm/tárgylemez aktivitású [35S]UTP-jelölt próbákkal egy párasított kamrában, melynek részletei Könczöl és mtsai közleményében olvashatóak ¹⁶⁶. Ezek után a metszetek Kodak NTB emulzióba kerültek (Carestream Health, Inc., Rochester, NY), majd sötétben, 4 °C-on, 3 hétig történt az expozíció. A tárgylemezek előhívásához Kodak Dektol (Sigma-Aldrich) előhívó és fixáló reagenseket használtunk 18 °C-on sötétben. A metszeteken hematoxin-eozin festést is

végeztünk DPX (Sigma-Aldrich) fedő-médium segítségével. A képeket egy Olympus BX51 mikroszkópon, QICAM Mono-10bit kamerával készítettük (QImaging, Surrey, BC, Canada).

5.12. A PXDNL klónozása - SMART RACE

A klónozáshoz a Clontech cég SMART RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) eljárását használtuk. A SMART RACE metodika alkalmazásakor külön cDNS szál szintézise folyik az 5' és a 3' vég szekvenciájának meghatározása érdekében. A 3' RACE templát első szálának előállításakor olyan oligodT-t alkalmazunk, melynek 5' végén specifikus SMART szekvencia van. Az 5' RACE templát szintézise során egyszerű oligodT primert használva folyik a komplementer szál előállítása, azonban a speciális reverz-transzkriptáz az 5' vég elérésekor terminális transzferáz aktivitásának köszönhetően néhány (döntően) citozin nukleotidot tesz a komplementer szál 3' végére. Ehhez hibridizál hozzá a reakcióelegyhez adott oligoG 3' véggel rendelkező SMART oligo, majd a templát váltás (template switching) jelenségnek köszönhetően a reverz-transzkriptáz a SMART oligonak megfelelő komplementer szakaszt is beépíti az új cDNS szál 3' végébe. Így mind az 5' mind a 3' RACE-re előállított templát cDNS szál tartalmazza megfelelő végén az ismert SMART szekvenciát.

Ezt követően egy PCR-t alkalmazva amplifikáljuk a megismerni kívánt 5' ill. 3' végeket, mely reakciók során (külön 5' ill. 3') egyrészt a rendelkezésünkre álló szekvencia információ alapján tervezett specifikus, másrészt az első szálba beépített SMART szakaszoknak megfelelő primereket használunk. Átfedő PCR termékeket tervezve a felszaporított termék szubklónozása és szekvenálása utána meghatározhatjuk a teljes hosszúságú cDNS-t és a vonatkozó szekvencia információt.



20. ábra SMART RACE Ez az eljárás alkalmas ismeretlen végű cDNS szekvenciák klónozására.

5.13. Génexpressziós kísérletek

A qPCR kísérletekhez az RNS-t Trizol reagenssel (Invitrogen) izoláltuk a gyártó utasításainak megfelelően. A cDNS-t 2 µg RNS-ből kiindulva oligo(dt)₁₈ primerekkel a RevertAid M-MuLV (Fermentas) reverz-transzkriptázzal szintetizáltuk 20 µl térfogatban a gyártó ajánlása szerint. A 2,5x-re kihígított cDNS mintát használtuk a qPCR kísérletekhez. Az amplifikációt egy LightCycler 1.5-ös készülékkel végeztük, LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I mix (Roche) felhasználásával (végső primer koncentráció 0,5 µM, a Mg²⁺ koncentráció pedig 2,25 mM volt). A primereket úgy terveztük, hogy páronként külön exonra üljenek fel, így elkerülve a genomiális templát kiterjesztését. A primerek szekvenciái a 21. ábrán találhatóak. Az alábbi PCR protokollt használtuk: 95°C 10 perc, majd 40 ciklus 95°C 10 sec, 60°C 5 sec, 72°C 15-25 sec (target hossza [bp]/25), az utolsó lépés pedig az olvadási görbe analízise volt (65-től 95°C-ig 0.1°C/sec meredekséggel). Az adatok kiértékelését a LightCycler Software 4.05 szoftver segítségével végeztük az alábbiak szerint. A görbék függvényének második deriváltja szolgáltatja az áttörési pontot (crossing point). A PCR reakciók hatékonyságát minden különböző génre egy kevert cDNS hígítási soron végeztük

reakciósorozattal határoztuk meg. A relatív expressziós szint meghatározásai esetén a vizsgált gének expresszióit a gapdh gén kifejeződésének mértékével osztottuk el, majd kontroll reakciókat 1-nek véve ezekhez viszonyítottuk.

| Név | Faj | Szekvencia (5'-3') |
|---------|--------------------|-----------------------------------|
| gapdh F | <i>H. Sapiens</i> | AAG GTG AAG GTC GGA GTC AAC GG |
| gapdh R | <i>H. Sapiens</i> | CCA AAG TTG TCA TGG ATG ACC TTG G |
| pxdn F | <i>H. Sapiens</i> | CTC AGC CTT CAG CAC ACG CTC |
| pxdn R | <i>H. Sapiens</i> | GAG TTC TGG GTG TTT CCT GGT |
| gapdh F | <i>M. musculus</i> | CTG AGT ATG TCG TGG AGT CTA CTG |
| gapdh R | <i>M. musculus</i> | AAG GCC ATG CCA GTG AGC TTC |
| pxdn F | <i>M. musculus</i> | CGA GGC CGG GAC CAT GGC ATC |
| pxdn R | <i>M. musculus</i> | CTG CAG GCT GGC AAG CTT CCA C |

21. ábra A kvantitatív PCR-hez használt primer szekvenciák

5.14. Állatkísérletek

A nyolc hetes, hím BALB/c egereket az Onkológiai Intézetből szereztük be. Az állatokat standard tápon tartottuk és vizet korlátozás nélkül fogyaszthattak. Az unilaterális obstrukciót az alábbi protokoll szerint végeztük: Az altatást ketamine (50mg/ttkg) és xylazine (10mg/ttkg) anesztetikumok intraperitoneális alkalmazásával indukáltuk. A hasfal középvonali megnyitását követően a teljes obstrukciót az ureter egyoldali ligatúrájával értük el. Az állatokból egy héttel a műtétet követően eltávolítottuk mindkét (az obstrukciós és a kontroll) vesét. A vesék egy részét paraformaldehidben fixáltuk, majd paraffinos beágyazást követően metszeteket készítettünk belőlük. A fibrotikus elváltozás súlyosságát Masson-Goldner-trichrome festés alapján ítéltük meg. A vesék maradék részét RNS izolálásra és immunfestésekhez használtuk fel. A PXDN lokalizációját 8 µm vastag fagyasztott metszeteken vizsgáltuk

a kontroll és az obstrukciós veséken az alábbi protokoll szerint. 1% albumin és 2% normál kecske szérummal történő blokkolás után az általunk tisztított PXDN és fibronectin elleni antitesttel inkubáltuk a metszeteket egy éjszakán keresztül 4 °C-on. A fluoreszcensen jelölt másodlagos antitest ezután került a mintákra egy órán keresztül szobahőmérsékleten.

5.15. Statisztikai analízis

A kísérleteket minden esetben legalább három alkalommal végeztük el, az adatok átlag \pm standard hiba formában kerülnek bemutatásra. A csoportok közötti különbségek analízisét Student-féle t-próbával vagy egyutas ANOVA-val végeztük GraphPad InStat szoftver segítségével. A 0,05-nél kisebb p értéket tekintettük szignifikánsnak.

6. Eredmények

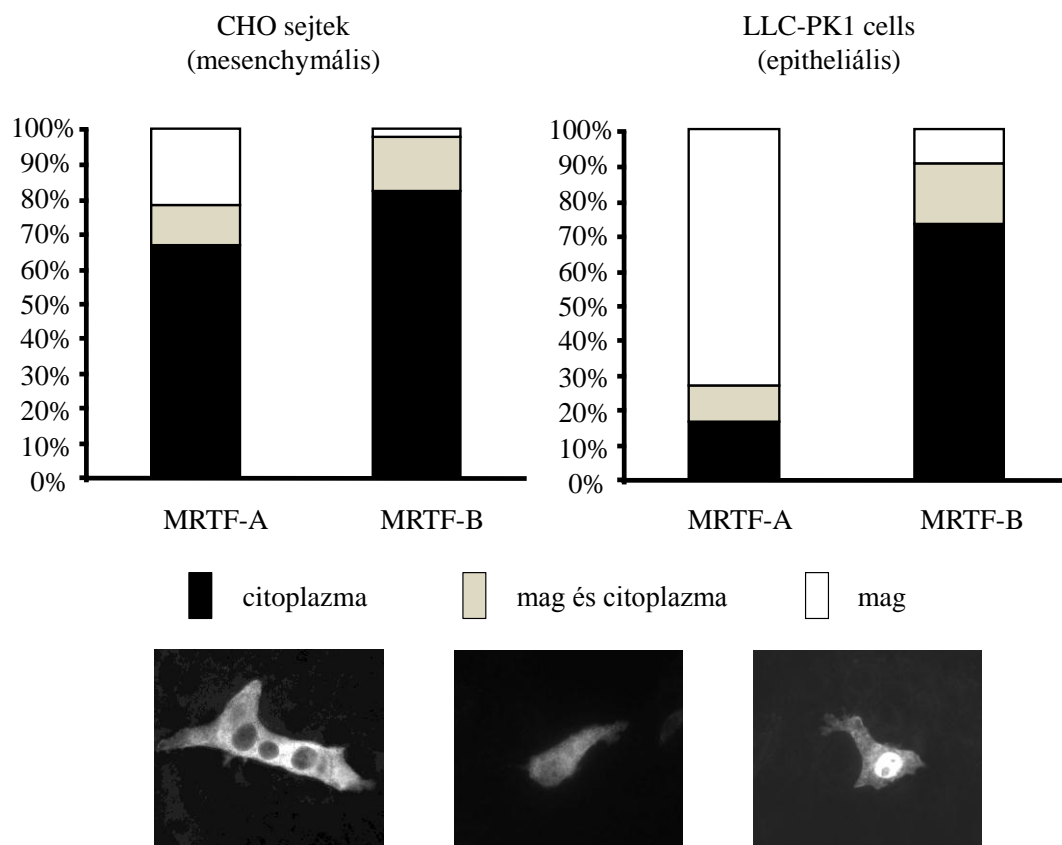
A dolgozatomban található eredményeket az alábbiak szerint fogom tárgyalni: Elsőként az epitheliális mesenchymális tranzícióban szereplő jelátvitelről, majd pedig két új extracelluláris mátrix molekulákról a PXDN-ről és a PXDNL-ről lesz szó.

6.1. Az MRTF transzkripciós faktorok szerepe az epitheliális mesenchymális tranzícióban

A simaizom-aktin promotor egyik fő szabályozófehérjéje fibroblasztokban és izomsejtekben a serum response faktor (SRF), mely más kofaktorokkal együttműködve a sejtmag és a citoplazma között mozogva szabályozza a génátírást⁷⁰. Habár az SRF transzlokációjának és szabályozásának pontos mechanizmus még vitatott^{71, 72}, az azonban biztos, hogy a myocardin szerű transzkripciós faktorokkal (MRTF) komplexet alkotva képesek befolyásolni a génexpressziót. Munkánk során arra kerestük a választ, hogy az MRTF transzkripciós faktoroknak van-e szerepe a sejt-sejt kapcsolatok felbomlása által indukált epitheliális mesenchymális tranzícióban.

6.1.1. Az MRTF transzkripciós faktorok lokalizációja

Mivel az MRTF transzkripciós faktorok sejten belüli lokalizációja és szabályozása a kísérleteink kezdetén még nem volt ismert epitheliális sejtekben, ezért először összehasonlítottuk a két izoforma (MRTF-A, MRTF-B) elhelyezkedését a vese epithel eredetű LLC-PK1 sejtekben és a fibroblasztszerű CHO sejtekben. Azonban ahhoz, hogy ezt vizsgálhassuk le kellett küzdenünk azt az akadályt, amelyet az MRTF izoformák elleni specifikus antitestek hiánya jelentett. Ezért a sejteket olyan konstruktokkal transzfektáltuk, amelyek az MRTF-A-t és MRTF-B-t FLAG epitóppal megjelölt formában kódolták. Ezek után immunfestést végeztünk a FLAG epitóp ellen, melynek eredményei a 22. ábrán láthatóak.

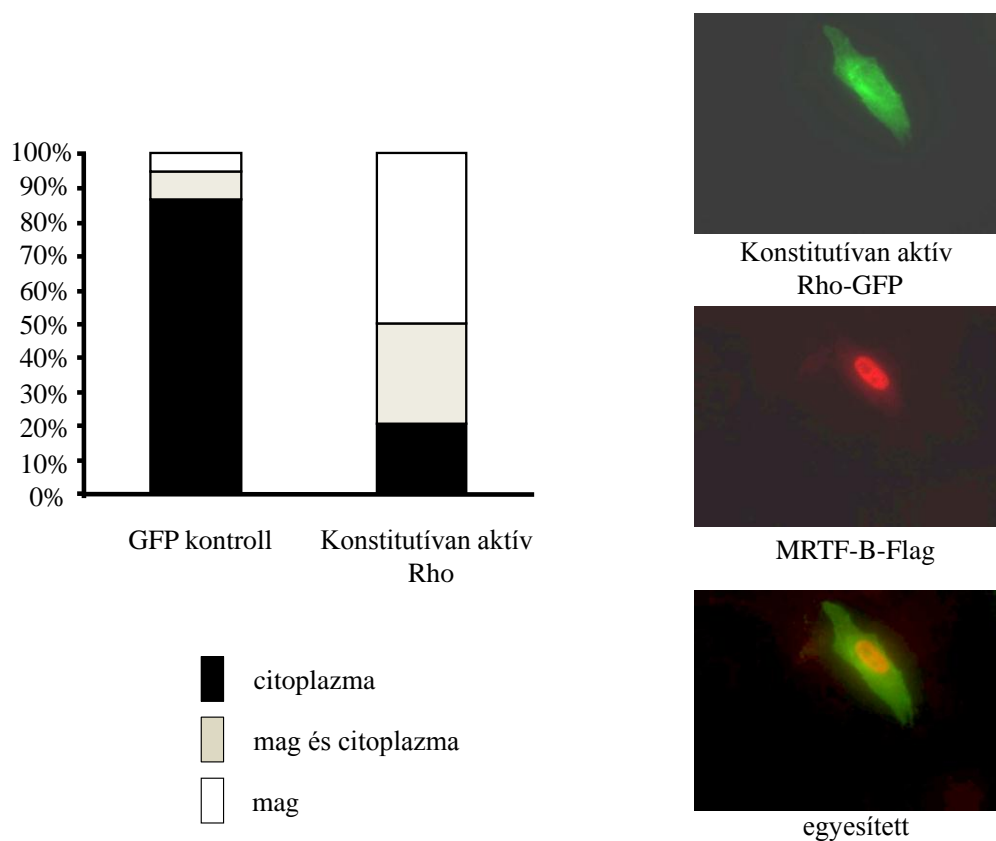


22. ábra Az *MRTF* lokalizációja fibroblastszerű és epithel sejtekben. *CHO* sejtekben mindkét transzkripciós faktor többnyire a citoplazmában helyezkedett el, míg *LLC-PK1* sejtekben az *MRTF-A* elsősorban nukleáris festődést mutatott, az *MRTF-B* pedig főleg citoplazmában helyezkedett el.

Ahogy az az irodalmi adatok alapján várható volt, a *CHO* sejtekben mind az *MRTF-A* (67%), mind az *MRTF-B* (82%) döntően citoplazma festődést (a nukleusz és citoplazma festési intenzitásának hányadosa 0,75 alatt) mutatott. Azonban meg kell jegyezni, hogy mind a két sejtípus esetén tapasztalhatóak voltak citoszolikus (a nukleusz és citoplazma festési intenzitásának hányadosa 1,25 felett) vagy citoszolikus és magfestődés közel azonos mértékben (a nukleusz és citoplazma festési intenzitásának hányadosa 0,75 és 1,25 között) mutató festődések. Ezzel részben ellentétben az *LLC-PK1* sejtek esetén az *MRTF-A* a legtöbb esetben (>70%) sejtmagba lokalizálódott, míg az *MRTF-B* döntően (>70%) citoszolikus maradt. Ezen eredmények tükrében megállapítható, hogy az *MRTF* fehérjék esetében jelentős sejt-specifikus különbségek figyelhetők meg az intracelluláris lokalizációban.

6.1.2. A Rho kis G-fehérje hatása az MRTF-B lokalizációjára

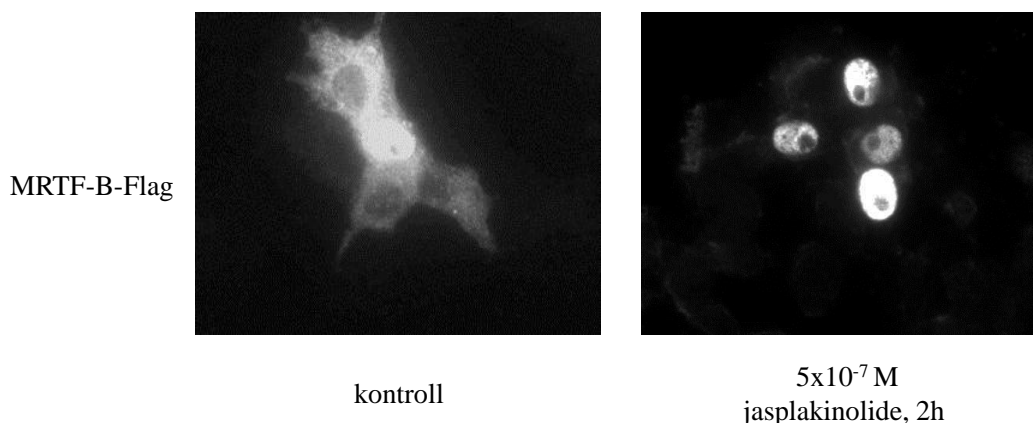
Mivel LLC-PK1 sejtekben zömmel az MRTF-B lokalizált a citoszolba, megvizsgáltuk, hogy van-e valamilyen hatása a Rho jelátvitelének a fehérje disztribúciójára. A sejteket kotranszfektáltuk FLAG-MRTF-B-vel és egy GFP-vel jelölt konstitutívan aktív Rho mutánssal, majd immunfestést végeztünk. Ahogy ez az 23. ábrán látszik, a sejtmagban található MRTF-B relatív aránya mintegy nyolcszorosára nőtt az aktív Rho jelenlétében. A Rho transzfektált sejtek mintegy 80%-a mutatott nukleáris, vagy a sejtmagot és a citoszolt is egyaránt érintő festődést, míg ez a frakció csak hozzávetőlegesen 15% volt a GFP-vel transzfektált, kontroll sejtek esetében.



23. ábra A Rho aktivitásának hatása az MRTF-B lokalizációjára Ha az LLC-PK1 sejteket egy konstitutívan aktív Rho mutánssal transzfektáljuk, jelentősen csökken az MRTF-B citoplazma festődése és nő a nukleáris lokalizáció.

6.1.3. Az aktin polimerizáció hatása az MRTF-B lokalizációjára

Szerettük volna megvizsgálni, hogy az MRTF transzkripciós faktorok szabályozásában szereplő aktin citoskeleton, pontosabban a citoszolikus F-aktin, G-aktin arány befolyásolja-e az MRTF-B sejten belüli elhelyezkedését LLC-PK1 sejtekben. Ebben a kísérletben jaspakinolide-ot, egy ismert aktin polimerizáló drogot használtunk. A vegyület hatására a masszív F-aktin képződés jön létre a sejtekben és ennek hatására, a citoszolikus G-aktin pool jelentősen csökken. A kezelés hatására, hasonlóan a konstitutívan aktív Rho-hoz jelentős nukleáris transzlokációt figyeltünk meg a sejtekben, amint ezt a 24. ábrán látható reprezentatív immunfestés is demonstrálja.

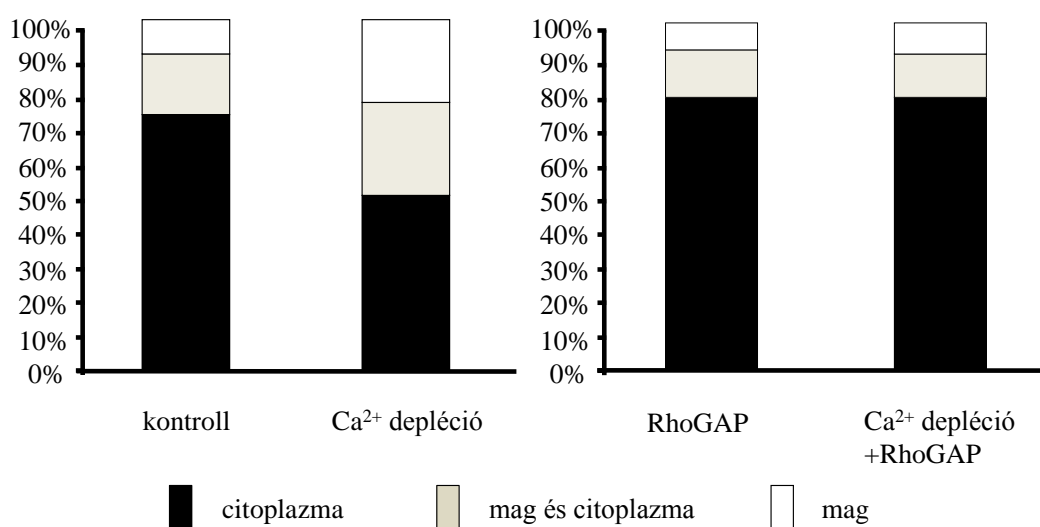


24. ábra Jaspakinolide hatása az MRTF-B lokalizációra Az aktin polimerizáló jaspakinolide hatására az MRTF-B a sejtmagba transzlokálódik LLC-PK1 sejtekben.

6.1.4. A kontaktsérülés hatása az MRTF-B sejten belüli elhelyezkedésére

Laborunk korábbi munkáiban már rámutatott, hogy az intakt konfluens LLC-PK1 monolayerre a TGF- β 1-nek alig van transzdifferentiációs hatása⁵⁹. Sejtkultúra körülmények között szükséges egy másik faktor egyidejű jelenléte a myofibroblasztok létrejöttéhez. Ez a második tényező a sejt-sejt kapcsolatok sérülése vagy legalább részleges elvesztése, melyet kísérletesen szubkonfluenciával, a monolayer sértésével

vagy Ca^{2+} megvonással és ezáltal a Ca^{2+} függő sejtkapcsolatok szétesésével modellezhetünk. Megvizsgáltuk, hogy az MRTF-B-vel transzfektált LLC-PK1 sejtek hogyan viselkednek Ca^{2+} -mentes környezetben. A kalcium megvonás hatására a nukleáris MRTF-B festődést mutató sejtek aránya 2,5-szeresére nőtt. (25. ábra) Szerettük volna megvizsgálni, hogy a Rho jelátvitelének van-e szerepe a kontaktsérülés által indukált MRTF-B transzlokációban, ezért egy GFP-vel jelölt p190RhoGAP konstruktot transzfektáltunk a sejtekbe. Ahogy ez a 25. ábrán látszik, a Rho aktivitás gátlása, megakadályozta az MRTF-B sejtmagba történő vándorlását.



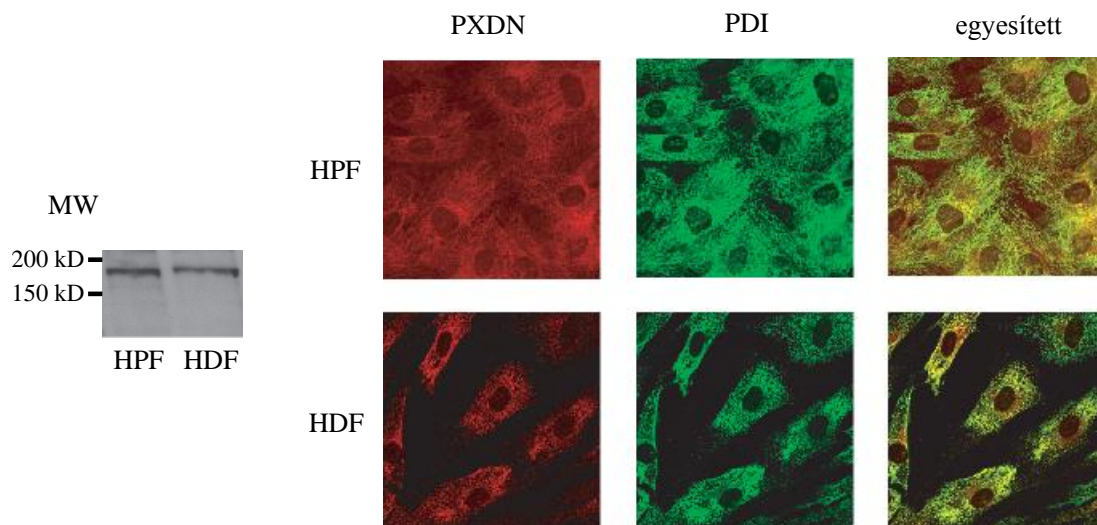
25. ábra *Kontaktsérülés hatása az MRTF-B elhelyezkedésére* A Ca^{2+} depléción hatására megnő a nukleáris festődést mutató sejtek aránya, mely hatás gátolható egy RhoGAP egyidejű transzfekciójával.

Munkacsoportunk további kísérletekben megállapította, hogy az LLC-PK1 sejtekben endogéne expresszálandó MRTF is, hasonlóan a fent vizsgálthoz, a kontaktsérülés során Rho, ROK, miozin könnyűlánc-foszforiláció függő módon transzlokálódik a sejtmagba és ott központi szerepet játszik az SMA promotor indukációjában. További kísérletek azt is bizonyították, hogy az MRTF-en kívül az SRF is kontaktsérülés hatására Rho dependens módon akkumulálódik a sejtmagban. Mivel ezeket a kísérleteket nem én végeztem, e kísérletek további részletei részben a dolgozat bevezetőjében, részben pedig az értekezéshez csatolt közleményben található.

6.2. A PXDN fehérje jellemzése

6.2.1. Az endogéne kifejeződő PXDN vizsgálata

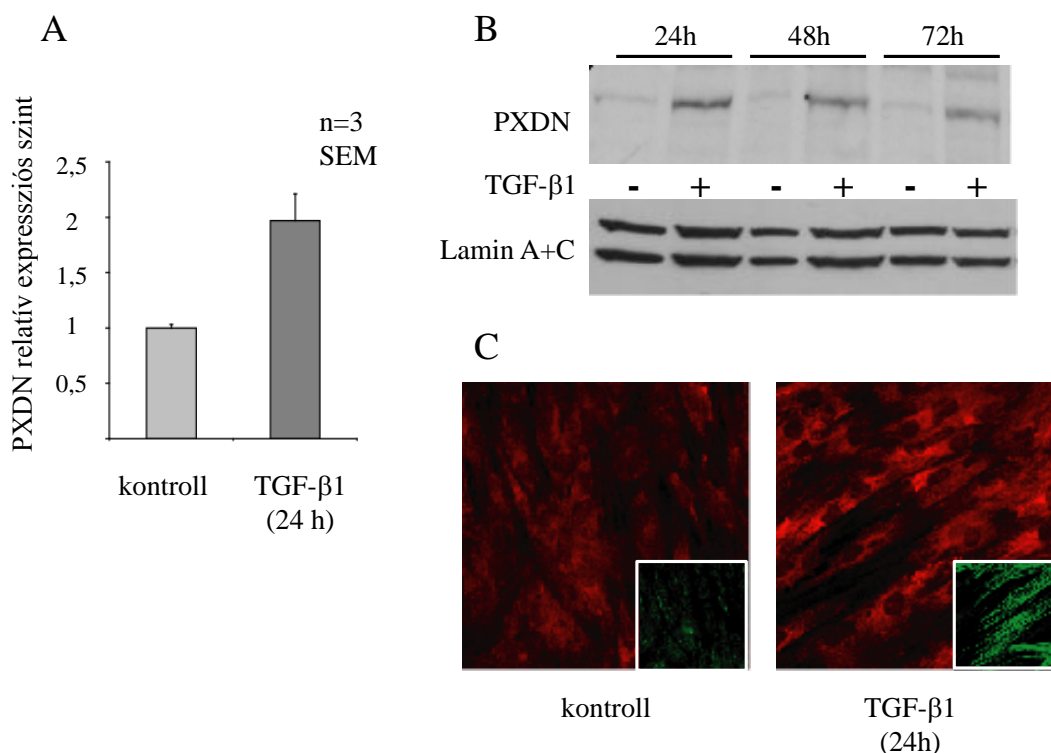
A peroxidazin expressziós mintázatának meghatározása, majd a heterológ expressziós rendszerben történt vizsgálatok (peroxidáz aktivitás, intracelluláris lokalizáció jellemzése) után megkíséreltük az endogéne kifejeződő fehérjét detektálni. Kísérleteink során az találtuk, hogy az általunk vizsgált primer sejtek közül a peroxidazin fehérje megtalálható humán umbilikális véna endothel sejtekben (HUVEC), érfal eredetű simaizom sejtekben (nem bemutatott eredmény) valamint humán tüdő- és bőrfibroblasztokban (26. ábra) Az intracelluláris lokalizáció vizsgálatára immunfestéseket végeztünk, majd az elkészült metszeteket konfokális mikroszkóppal analizáltuk. A festődést két különböző siRNS csendesítéssel is validáltuk (nem bemutatott eredmény). A festődés intracellulárisan hálózatos struktúrát mutatott, mely alapján feltételeztük, hogy a fehérje az endoplazmás retikulumba lokalizál. Ezek után kettős festést végeztünk egy ismert endoplazmatikus fehérjével, a protein-diszulfid-izomerázzal (PDI) és jelentős átfedést találtunk a két fehérje lokalizációja között. Az ER lokalizáció mellett megfigyeltük még a fehérje perinukleáris dúsulását is. (26. ábra)



26. ábra A PXDN fehérje lokalizációja fibroblasztokban A Western bloton megfigyelhető, hogy a fehérje kifejeződik humán dermális és pulmonáris fibroblasztokban is. Az immunfestések a PXDN és PDI kolokalizációját mutatják az ER-ban ugyanezen sejtekben. (HPF-humán pulmonáris fibroblaszt, HDF-humán dermális fibroblaszt, PDI-protein-diszulfid-izomeráz)

6.2.2. A PXDN expressziójának indukciója tüdő- és bőrfibroblasztokban

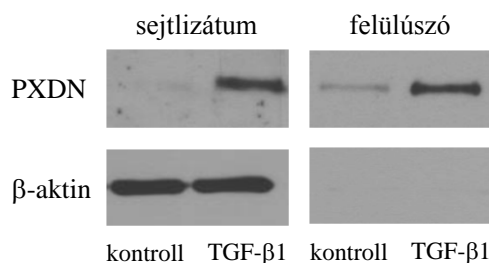
A humán PXDN esetleges extracelluláris lokalizációjára már a kísérleteink előtt is több jel utalt. A peroxidazin sok, az extracelluláris mátrixra jellemző motívumot tartalmaz, mint például leucin gazdag régiók, immunoglobulin C2-típusú domének vagy a von Willenbrand faktor C-típusú domén. A fehérje *Drosophila* megfelelőjéről pedig ismert, hogy a rovar haemocoeljében található sejtek szekretálják¹⁴⁶. Továbbá a TargetP 1.1 lokalizáció-predikciós szoftverrel végzett szekvencia analízisünk is azt mutatta, hogy a fehérje tartalmaz egy szekréción szignálpeptidet. Ezen információk birtokában, kézenfekvő volt egy olyan folyamatban vizsgálni a PXDN-t, ahol intenzív protein szintézis és szekréció történik. Jellegzetesen ilyen biológiai jelenség a fibroblaszt-myofibroblaszt átalakulás. Munkánk során vizsgáltuk, hogy TGF- β 1 hatására hogyan változik a PXDN expressziója humán tüdőfibroblasztokban.



27. ábra A PXDN expresszió változása TGF-β1 hatására A PXDN expresszió mRNS (A) és fehérje szinten (B, C) is fokozódik TGF-β1 kezelés során. Az immunfestéseken a piros a PXDN, a zöld pedig SMA festődést mutat.

A PXDN mRNS-ének expressziója körülbelül kétszeresére nő 24 óra TGF-β1 kezelés hatására (27. ábra). Ebben a kísérletben referenciagénnek a *gapdh-t* választottuk. Western blot kísérletekkel azt is megmutattuk, hogy 24 óra kezelést követően a fehérje szintje megemelkedik, amelyet még 72 órával a TGF-β1 indukció kezdetét követően is detektáltunk. Az expresszió növekedését immunfestésekkel is ki tudtuk mutatni, a PXDN festés intenzitásának növekedése nyilvánvaló volt 72 óra TGF-β1 kezelés hatására. Ezekben a kísérletekben TGF-β1 kezelés sikerességét az SMA festés megjelenése mutatta. Ahogy az immunfestéseken látszik a fibroblasztok nem, míg a myofibroblasztok jelentős SMA festődést mutattak. Az expressziós változáson kívül az érdekelt minket, hogy a myofibroblasztok képesek-e szekretálni a fehérjét, ezért megvizsgáltuk a sejtek felett található médium peroxidazin tartalmát. Az 28. ábrán bemutatott kísérletben látszik, hogy a myofibroblasztok feletti médiumban kimutatható

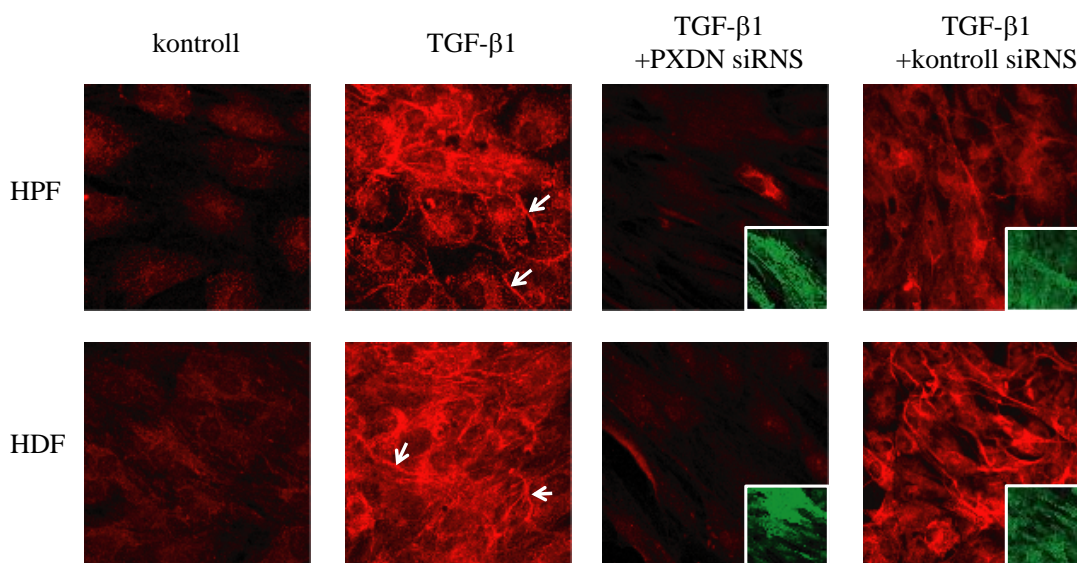
a peroxidazin. Az negatív aktin kontroll jól demonstrálja, hogy a bloton detektált PXDN nem a médiumban lebegő sejtekből származik.



28. ábra A PXDN szekréciója A humán PXDN kimutatható a TGF-β1-gyel indukált myofibroblaszttal kultúrált médiumból. A negatív aktin kontroll mutatja, hogy az PXDN nem úszó sejtekből származik.

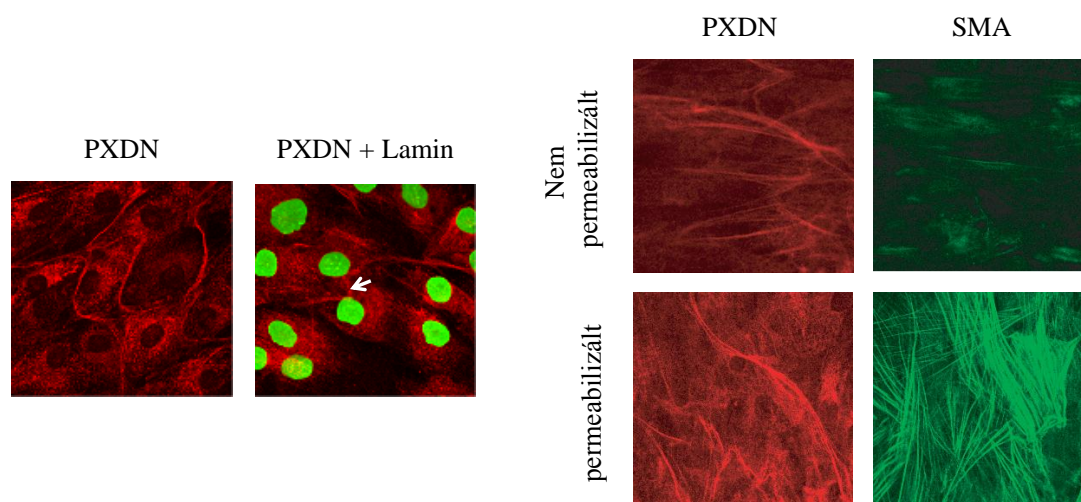
6.2.3. A peroxidazin lokalizációja az extracelluláris mátrixban

A fibroblaszt-myofibroblaszt átalakulás folyamán a sejtek drasztikus fenotípusváltáson mennek keresztül, mely során jelentősen megnő több hemet tartalmazó fehérje expressziója, mint amilyen a NOX4 és a PXDN¹⁶⁷. Mivel a TGF kezelést szérumentes körülmények között végeztük, ezért felmerült a lehetősége annak, hogy esetleg hiányozhat a PXDN bioszintéziséhez szükséges hem. Ezért a kezeléshez alkalmazott médiumot egy hem prekuzorral, a δ -aminolevulináttal (ALA) egészítettük ki. Eredményeink azt mutatták, hogy a médium ALA-val történő szupplementációja nem befolyásolta jelentősen a fehérje expresszióját és a médiumban történt szekrécióját, de alapvetően megváltoztatta a protein lokalizációját. 72 órával a kezelés megkezdését követően a PXDN vaskos kötegekbe rendeződött a sejtek extracelluláris mátrixában.



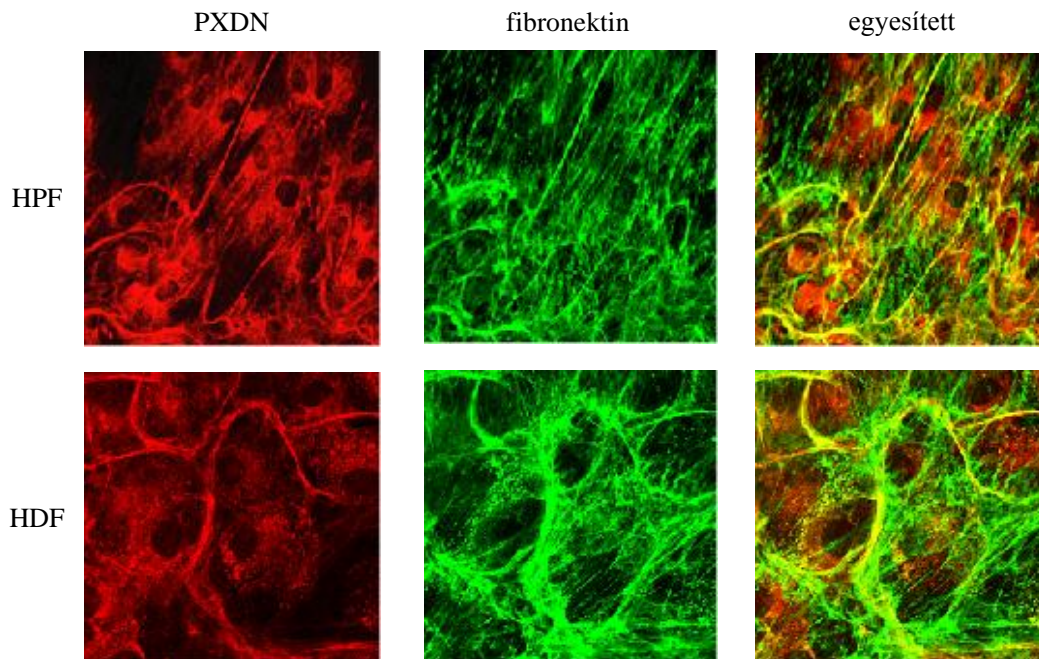
29. ábra ALA hatása a PXDN lokalizációjára A hem prekursor δ -aminolevulinát szupplementáció hatására a PXDN jellegzetes, extracellulárisnak imponáló kötegekbe (nyilak) rendeződött. Jobb oldalon látható, hogy a PXDN specifikus siRNS kezelés hatására csak a PXDN festődés tűnik el, de differenciáció ép marad, ugyanis az SMA festődésben nincs különbség.

Ezeket a struktúrákat mind tüdő, mind bőr eredetű primer fibroblasztok differenciációja során is megfigyeltük, ami alapján úgy tűnik, hogy a myofibroblasztok egy általános, nem szervspecifikus extracelluláris mátrix képző mechanizmusáról van szó. A sejtek PXDN specifikus siRNS kezelés hatására elvesztették ezt a jellegzetes PXDN festődést, annak ellenére, hogy a myofibroblaszt fenotípus megtartott, mint ahogy azt a SMA festődés mutatja. A következő kísérletekben ezeket a PXDN tartalmú struktúrákat részletes elemzésnek vetettük alá. Ahogy ez a 30. ábrán is látszik, a kötegek gyakran alakulnak ki két egymás mellett található sejt között, de sokszor figyelhető meg több sejtnyi távolságot lefedő hossz is. A PXDN festést elvégeztük permeabilizált és nem permeabilizált sejteken is, hogy igazoljuk a fehérje extracelluláris lokalizációját.



30. ábra A PXDN tartalmú kötegek extracellulárisan helyezkednek el. Az ábra bal oldalán megfigyelhető, hogy a kötegek gyakran alakulnak ki szomszédos sejtek között. A jobb oldalon látható immunfestéseket TGF- β 1 kezelt, permeabilizált és nem permeabilizált sejteken végeztük. A PXDN tartalmú rostok festődése megmarad a nem permeabilizált sejteken is.

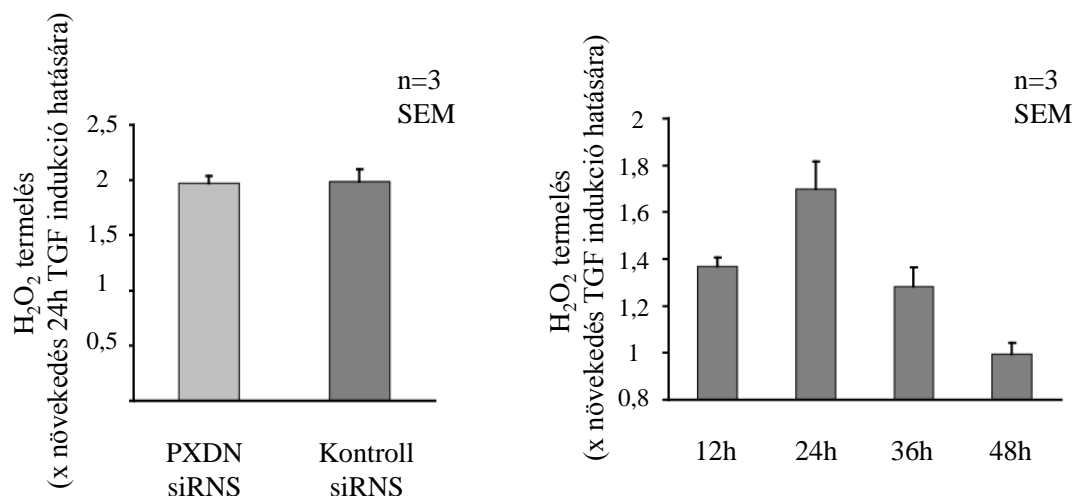
Látható, hogy a nem permeabilizált sejteken is megmarad a hálózatos struktúra, azonban az endoplazmás retikulumra jellemző PXDN festési kép, valamint az SMA festődés eltűnik. A permeabilizált sejteken végzett kontroll festés mutatja, hogy a TGF kezelés sikeres volt. A következő kísérletekben azt vizsgáltuk, hogy ezek a struktúrák milyen más extracelluláris proteint tartalmaznak. A 31. ábra azt mutatja, hogy a fibronectin festődés részben kolokalizál a peroxidazinnal TGF- β 1 kezelt humán tüdőfibroblasztokban. A két fehérje kolokalizációja kifejezett a vastagabb rostokban, míg a vékonyabb szálakban a festődés alapján a két fehérje elkülönülten található.



31. ábra A PXDN és a fibronectin kolokalizációja HPF és HDF sejteken A vastag rostokban a két fehérje kolokalizál, míg a vékonyabb fibrillumokban elkülönülten találhatóak meg.

6.2.4. A H₂O₂ és a peroxidáz aktivitás szerepe a PXDN szekréciójában és lokalizációjában

Megvizsgáltuk fibroblaszt és differenciált myofibroblaszt sejt kultúrák lizátumának peroxidáz aktivitását, azonban a PXDN nyilvánvaló expressziós változása ellenére nem tapasztaltunk mérhető növekedést a peroxidáz aktivitásban (nem bemutatott eredmény).



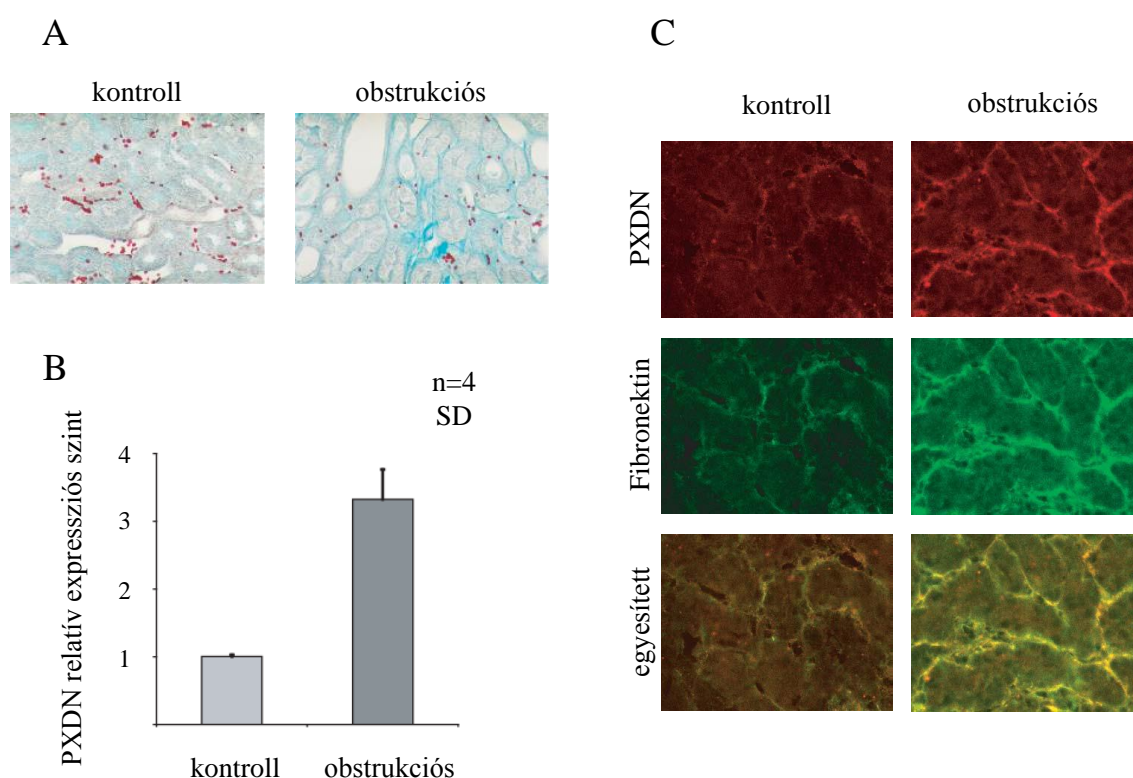
32. ábra A PXDN expresszió és ROS termelés kapcsolata A PXDN expressziója nem befolyásolta a termelt H₂O₂ mennyiségét. A H₂O₂ termelés kinetikája TGF-β1 indukálta fibroblasztokban, a nem indukált sejtek H₂O₂ termelése =1.

Korábbi kísérleteink mutatták, hogy a PXDN egy funkcionális peroxidáz domént tartalmaz, valamint ismert, hogy a fibroblasztok TGF-β1 hatására H₂O₂-t kezdenek el termelni, ezért megvizsgáltuk, hogy a PXDN-nek kimutatható-e a H₂O₂ fogyasztása. A hipotézisünk az volt, hogy ha a PXDN felhasználja a H₂O₂-t akkor a PXDN specifikus siRNS kezelés hatására emelkedett H₂O₂ termelést detektálunk a sejtek környezetében. Ahogy a 32. ábrán látszik, az siRNS kezelés nem befolyásolta a TGF-β1 hatására, ALA jelenlétében mért H₂O₂ mennyiségét. Továbbá arra is kíváncsiak voltunk, hogy a H₂O₂ termelés kinetikája milyen viszonyban van a kialakuló PXDN tartalmú fibrillumok megjelenésével. Különböző időpontokban meghatároztuk a sejtek TGF-β1 hatására létrejövő H₂O₂ termelését, és azt találtuk, hogy az oxidatív válasz csúcsa a kezelés 24. órájában volt megfigyelhető, míg a PXDN tartalmú rostok a 72. órában jelentek meg a sejt kultúrában.

6.2.5. A PXDN expressziója fokozódik egy egér vesefibrózis modellben

Megvizsgáltuk a PXDN expresszió változásait egy korábban már jól karakterizált, az ureter egyoldali lekötésével kiváltott egér vesefibrózis modellben. Azért választottuk

kísérleteinkhez ezt a modellt, mert már irodalmi adatokból ismert, hogy itt a viszonylag gyorsan progrediáló fibrotikus elváltozás TGF- β 1 dependens módon alakul ki, valamint korábban már leírták, hogy ebben a betegségmodellben nagy mennyiségben jelennek meg myofibroblasztok és jelentős extracelluláris mátrix szintézist folytatnak. A 33. ábrán látható, hogy a fibrotikus vesében több mint háromszorosára nőtt a PXDN expressziója a kontroll veséhez viszonyítva. Masson-Goldman-trichrome festéssel igazoltuk, hogy ezzel párhuzamosan jelentős fibrotikus átépülés zajlik az obstrukciós vesében. A veséken immunfestéseket is végeztünk, ahol megfigyelhető, hogy a PXDN alig megfesthető a kontroll vesékben, azonban az obstrukció hatására jelentős dúsulást mutat a peritubuláris térben, ahol a fibronektinnel kolokalizál. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy TGF- β 1 hatására létrejövő expresszió-fokozódás és szekréció nemcsak *in vitro*, hanem *in vivo* is létrejöhet.



33. ábra A PXDN expressziója fokozódik unilateralis ureter obstrukcióban. Masson-Goldman-trichrome festéssel igazoltuk, hogy az obstrukciós vese fibrotikusan átalakul (A). A PXDN expressziófokozódás mind qPCR-al (B), mind pedig immunfestéseken nyilvánvaló volt (C).

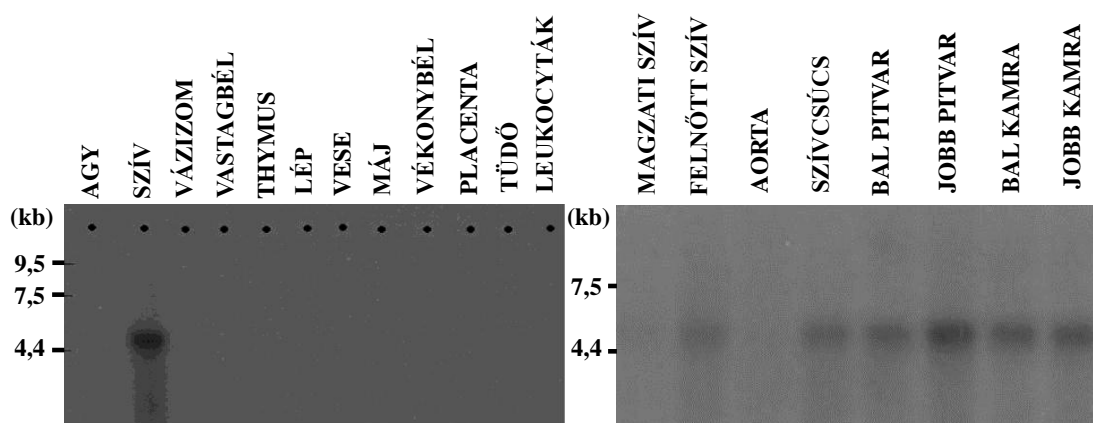
6.3. Egy új szívspecifikus fehérje jellemzése

6.3.1. A PXDNL azonosítása

Homológia kereséssel azonosítottunk a GenBank-ban egy humán DNS szekvenciát (GenBank accession No. NM_144651), amely egy olyan protein részt kódolt, mely jelentős hasonlóságot mutat mind a *Drosophila*, mind az emberi peroxidazinnal. A szekvenciát felhasználva BLAST algoritmus segítségével találtunk egy IMAGE klónt (GenBank accession No. AA927870), amelyet megszereztünk és megszekvenáltunk. Az így talált szekvenciárészlet az mRNS 3', azaz a fehérje C-terminálisan található darabját kódolta, tartalmazta a peroxidáz domén nagy részét és a stop kodont is. Az 5'-vég keresése során az addig ismert szekvencia helyét a humán genomon belül a 8. kromoszómán azonosítottuk. Itt az 5'-véget feltételezhetően kódoló régiót minden lehetséges leolvasási keretben lefordítva kapott aminosavsorrendet homológiába állítottuk a PXDNL-nel. A homológ részek nagy valószínűséggel kódoló szekvencia-szigeteknek felelnek meg. Ezek peroxidazinon belüli elhelyezkedése és konzervált doménekhez való viszonya alapján azonosítottuk a peroxidáz domén hiányzó részét és további, az 5' vég irányába eső doménrészeket. A teljes kódoló szekvenciát SMART RACE (= rapid amplification of cDNA ends) technika segítségével azonosítottuk.

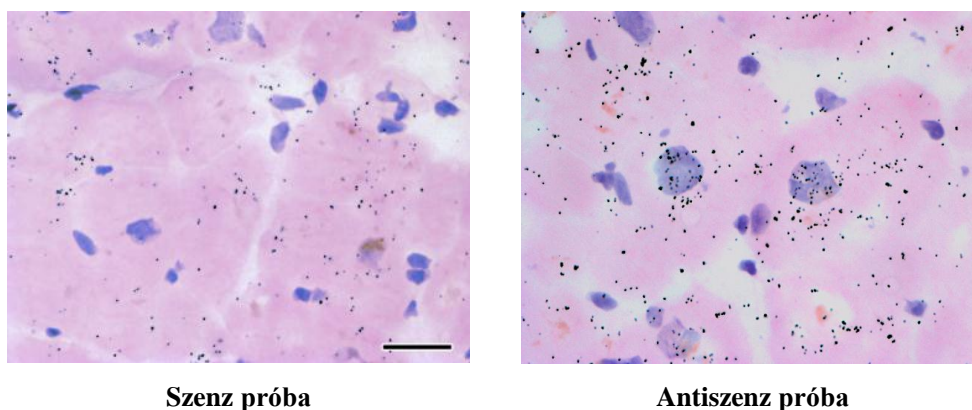
6.3.2. A PXDNL expressziós mintázata

Az IMAGE klón egy darabját használtuk templátnak a Northern blot kísérlethez felhasznált próba szintéziséhez. Ahogy ezt a 34. ábra mutatja, a PXDNL mRNS-ét kizárólag a szívben detektáltuk. További Northern blottal végzett vizsgálataink alapján a PXDNL az aortát kivéve a felnőtt humán szív minden részében megtalálható, azaz a szívcsúcsban, a bal és jobb pitvarban, a bal és a jobb kamrában. A magzati teljes szívből származó mintában is detektálható a PXDNL mRNS-e, azonban sokkal kisebb mennyiségben.



34. ábra A PXDNL expressziós mintázata A PXDNL az általunk vizsgált humán szervek közül csak a szívben volt megtalálható, ahol közel egyenletesen oszlik el.

Szerettük volna azt is megvizsgálni, hogy pontosan melyik sejttípus fejezi ki az mRNA-t a szívben, ezért *in situ* hibridizációs kísérletet végeztünk. A próbát úgy terveztük, hogy az mRNA 3' le nem fordított régiójára üljön fel annak érdekében, hogy elkerüljük a nagyfokú homológia miatt esetlegesen létrejövő keresztreakciót a PXDN-nel. A hibridizációs szignál a cardiomyocyták felett jelent meg, míg a kontroll, szenz próba nem mutatatta ezt a jelölődést. (35. ábra)

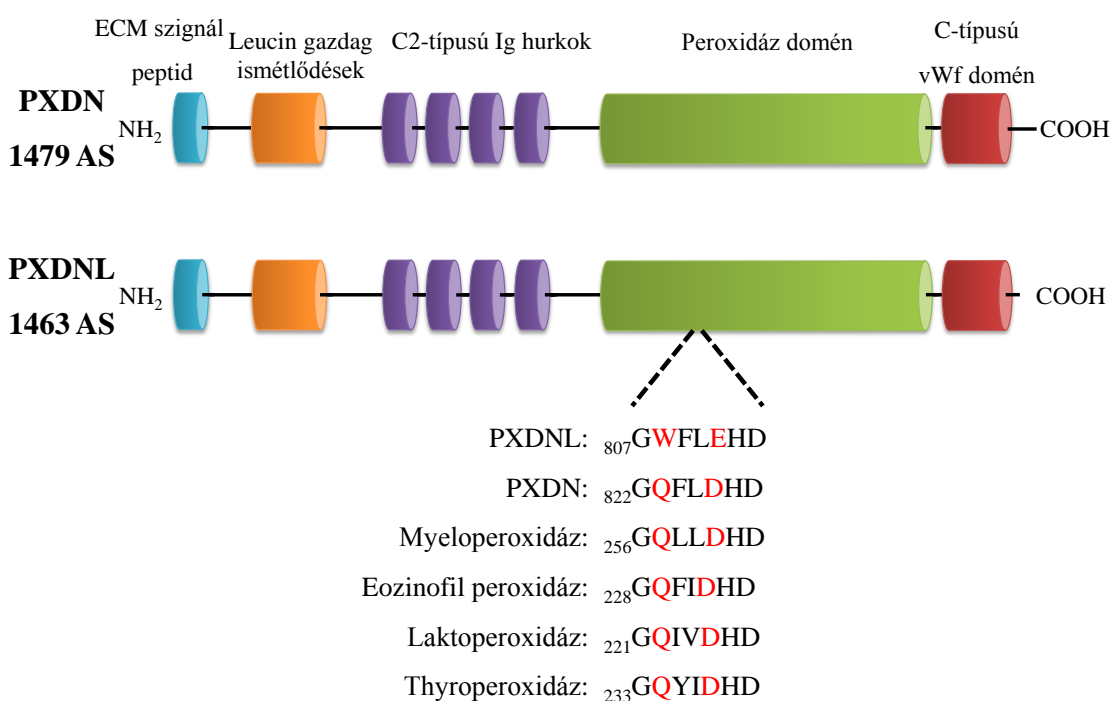


35. ábra Az *in situ* hibridizáció eredménye Az PXDNL-re specifikus antiszenz próba jelét a cardiomyocyták citoplazmája és sejtmagja felett lehetett detektálni.

6.3.3. A PXDNL szerkezete

A PXDNL mRNA-e egy 1463 aminosav hosszúságú proteint kódol, amely 63%-os azonosságot és 72%-os hasonlóságot mutat a humán PXDN-nel. A domén struktúra is nagyban hasonlít a peroxidazinhoz (36. ábra): A protein N-terminális 24 aminosava egy

szekretoros szignálpeptidet kódol, amelyet egy leucin gazdag szakasz (55-182), majd négy immunoglobulin C2 típusú domén (240-584) követ a C-terminus felé haladva. A fehérje peroxidáz doménjét a 726. és a 1273. aminosav között rész kódolja, a C-terminális részen pedig található benne egy vWF C-típusú domén. A peroxidáz domén nagyfokú homológiát mutat más emlős peroxidázok ugyanilyen doménjeivel, azonban a szekvencia analízis jelentős különbségekre is felhívja a figyelmet. A gén evolúciója során a fehérjében módosultak olyan erősen konzervált aminosavak, amelyekről ismert, hogy nélkülözhetetlenek a domén enzimatisz aktivitásához.

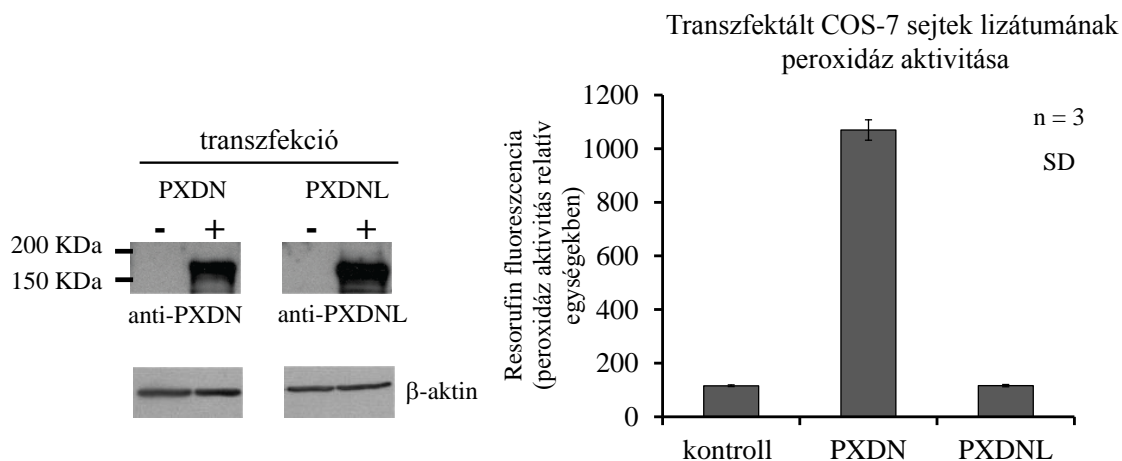


36. ábra A *PXDNL* szerkezete A *PXDNL* nagyon hasonló doménszerkezettel rendelkezik, mint a *PXDN*, azonban a peroxidáz domén néhány konzervált aminosavban különbözik az emlős peroxidázoktól.

6.3.4. A *PXDNL* jellemzése transzfektált sejtekben

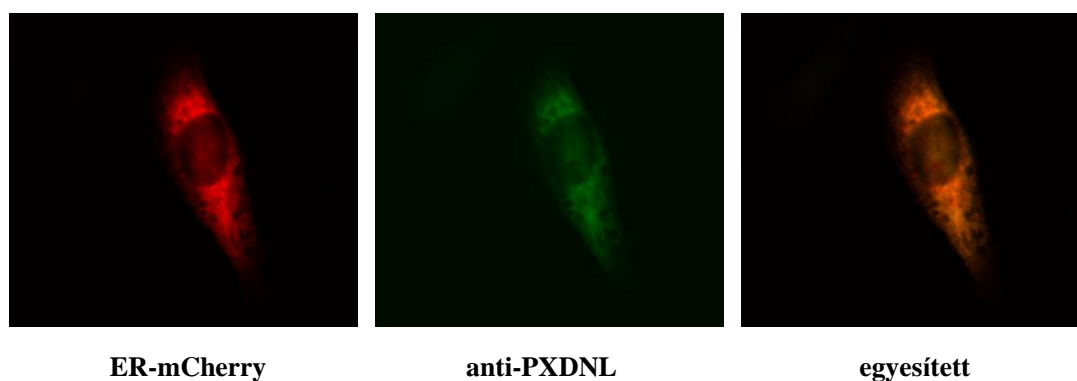
A *PXDNL*-t kódoló cDNS ORF régióját szubklónoztuk egy emlős expressziós vektorba (pcDNA3.1(+)), majd COS-7 sejtekbe transzfektáltuk. A transzfekció sikerességét Western blot technikával ellenőriztük. A fehérje peroxidáz aktivitását a transzfektált sejtek sejtlizátumán Amplex Red reagens segítségével kíséreltük meg

megmérni. A PXDNL-nek a PXDN-nel szemben nem detektálható a peroxidáz aktivitása, melyre magyarázatul szolgálhat a szekvencia-analízis során megállapított konzervált aminosavak hiánya.



37. ábra A PXDNL-nek nincsen detektálható peroxidáz aktivitása. Transzfektált COS-7 sejtek sejlizátumának nincs Amplex Red assay-jel mérhető peroxidáz aktivitása. A bal oldali Western blot a transzfekció sikerességét mutatja.

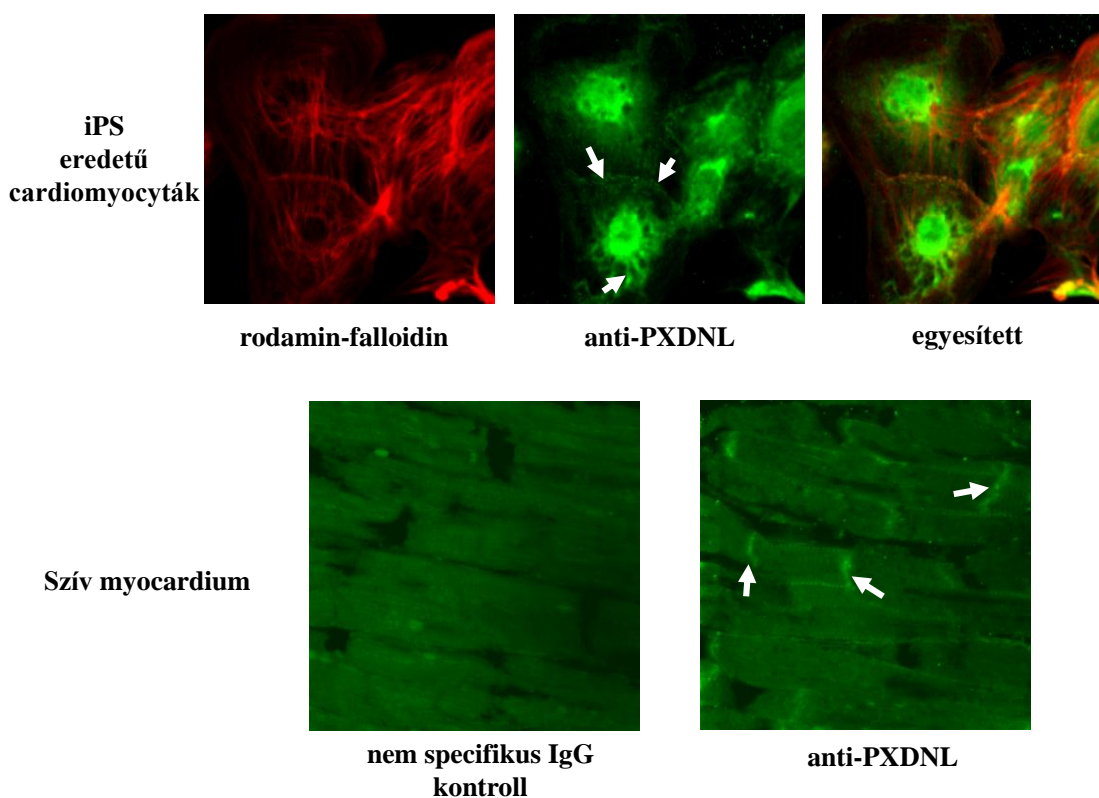
Ugyanilyen COS-7 heterológ expressziós rendszerben megvizsgáltuk a fehérje intracelluláris lokalizációját is. A 38. ábrán megfigyelhető, hogy a fehérje az endoplazmás retikulumban található, ahol kolokalizál egy endoplazmás retikulum targetszekvenciával ellátott fluoreszcens fehérjével, az ER-mCherry-vel.



38. ábra A PXDNL lokalizációja heterológ expressziós rendszerben A transzfektált PXDNL kolokalizál az endoplazmás retikulum retenciós szignállal ellátott mCherry fluoreszcens fehérjével COS-7 sejtekben.

6.3.5. Az endogén módon kifejeződő PXDNL lokalizációja

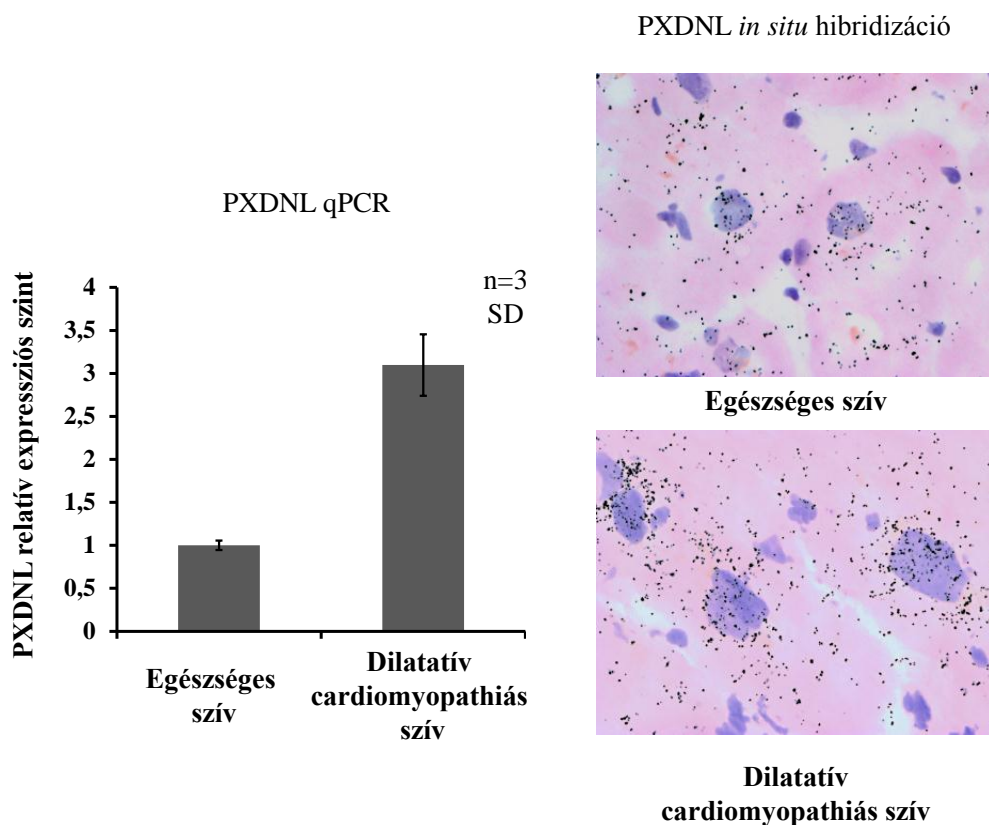
A heterológ expressziós rendszerben történt jellemzés után megvizsgáltuk, hogy a PXDNL hol helyezkedik el cardiomyocytákban. Először humán indukált pluripotens őssejt (iPS) eredetű cardiomyocytákon végeztünk immunfestést. A PXDNL-t ebben a sejttypusban a sejtek között a plazmamembránál detektáltuk, de egy igen jelentős hányada még mindig intracelluláris festődést mutatott. Ezek után a protein lokalizációját a természetes kifejeződési helyén, az emberi szívben tanulmányoztuk. Paraffinos metszeteken anti-PXDNL ellenanyaggal végeztünk festéseket, ahol a PXDNL-t a sejtek között, részben az Eberth vonalaknak megfelelően detektáltuk.



39. ábra Az endogénen kifejeződő PXDNL festődése Az iPS eredetű cardiomyocytában az endoplazmás retikulum festődés mellett a sejtek találkozásánál is jelölődött a fehérje. Emberi szívmetszeteken a PXDNL festődés főleg a cardiomyocyták összefekvő felületeinek megfelelően jelent meg.

6.3.6. A PXDNL expressziója fokozódik dilatatív cardiomyopathiában

A szívizom az emberi szervezet egyik legintenzívebb mechanikai stressznek kitett szövete. A fehérje kizárólagos szívbeli expressziója, doménszerkezete és az immunfestések által mutatott extracelluláris elhelyezkedés felveti a lehetőséget, hogy adhéziós molekulaként a szövet nagy mechanikai stresszhez történő adaptációjában lenne szerepe. Ezért kíváncsiak voltunk, hogy olyan körülmények között, amikor kritikussá válhat a mechanikai stressz a szív falában, hogyan változik a *pxdnl* gén expressziója. Ilyen a szívfalat terhelő súlyos fizikai stressz jelentkezik például dilatatív cardiomyopathiában. A 40. ábrán megfigyelhető, hogy a PXDNL mRNS-ének expressziójában körülbelül háromszoros növekedést tapasztaltunk a qPCR reakcióban. Referenciagénnek az *rpl32* riboszómális fehérjét kódoló gént használtuk, ugyanis irodalmi adatok alapján várhatóan nem változik a szintje különböző szívbetegségekben¹⁶⁸. A qPCR-rel kapott eredményeket az *in situ* hibridizáció is megerősítette. A képeken az is látszik, hogy ilyen körülmények között a PXDNL-t kódoló mRNS a cardiomyocytákban detektálható. Azért tartom ezt fontosnak megjegyezni, ugyanis ismert, hogy dilatatív cardiomyopathiára jellemző a szívizomszövet fibrotikus átalakulása¹⁶⁹, amelyben aktiválódnak a rezidens, kardiális fibroblasztok. A mi kísérleti eredményeink azonban azt mutatják, hogy a más fibrotikus folyamatokban megjelenő PXDN expressziófokozással szemben itt a jel forrása nem a differenciálódó myofibroblaszt, hanem a cardiomyocyta.

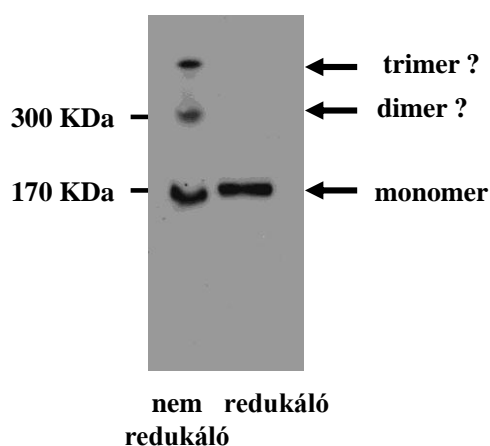


40. ábra A PXDNL expressziója jelentősen fokozódik dilatatív cardiomyopathiában. A bal oldali qPCR eredmény és jobb oldalon látható *in situ* hibridizáció is alátámasztja, hogy a génexpresszió fokozódik dilatatív cardiomyopathiában.

6.3.7. A PXDNL oligomerizációjának vizsgálata

A PXDNL fehérje több olyan domént tartalmaz, amely alkalmas lehet homofil vagy heterofil protein-interakciók kialakítására. A LRR doménekről ismert, hogy sok proteinben (például Toll-like receptorok, a nukleáris exportban szereplő TAP fehérjék vagy a spliceosome alkotásában résztvevő U2A' protein) biztosítanak strukturális alapot a protein interakciókhoz¹⁷⁰. Az immunoglobulin C2-szerű domén található például a T-limfocyták CD2 sejtfelszíni antigénjeiben, mely molekulák protein-protein kapcsolatokat kialakítása révén a sejtek adhéziójában fontosak¹⁷¹. Az oligomerizáció szempontjából mégis a legérdekesebbnek a vWF C-típusú domén tűnt, melyben a cisztein oldalláncok diszulfid hidakat képesek kialakítani más fehérjék hasonló doménjeivel. Ilyen interakciók figyelhetők meg például a thrombospondin molekulák trimerjeiben^{172, 173}.

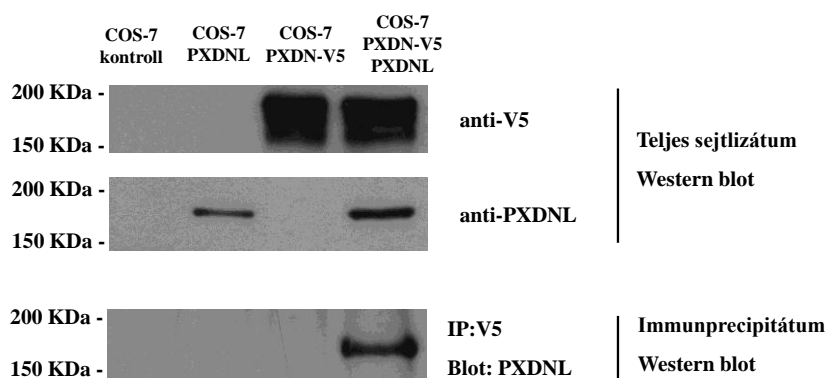
PXDNL-lel transzfektált sejtek lizátumát megfuttattuk SDS-gélen redukáló és nem redukáló (merkaptóetanol-mentes) körülmények között, majd nitrocellulóz membránra blotoltuk, és az előhíváshoz PXDNL elleni antitestet használtunk. A 41. ábrán látszik, hogy a fehérjére specifikus jel nem redukáló körülmények között megjelenik körülbelül 300 kDa magasságban és egy jelentősen nagyobb molekulatömeegnél is. A merkaptóetanol tartalmazó mintapufferben felvett minták esetén azonban csak a monomer magasságában detektáltunk jelet. Az eredményeink arra utalnak, hogy a PXDNL diszulfid hidak kialakításával képes más fehérjéssel vagy önmagával asszociálni. Az oligomerek molekulatömege alapján felmerül az esetleges dimerizáció és trimerizáció lehetősége is.



41. ábra A PXDNL oligomerizációja A PXDNL-t tartalmazó sejtek lizátumát nem redukáló (β -merkaptóetanol mentes) körülmények között SDS-PAGE-n megfuttatva, magasabb molekulatömegeknél is jelentkeznek diszkrét, specifikus csíkok a Western bloton.

6.3.8. Fehérjekapcsolat a PXDN és a PXDNL között

Korábbi kísérleteink alapján egyértelmű volt, hogy mind a PXDN, mind a PXDNL kifejeződik az emberi szívben. Mivel az előbb ismertetett protein-interakciós domének mindkét fehérjében megtalálhatóak, kézenfekvő volt megvizsgálni, hogy a két fehérje képes-e egymással is kapcsolatot létesíteni. Ehhez egy immun-precipitációs kísérletet végeztünk. COS-7 sejteket transzfektáltunk külön PXDNL-lel és PXDNV5-tel (a humán PXDN C-terminálisan lett egy V5 epitóppal megjelölve) valamint PXDNV5-tel és PXDNL-lel egyszerre, negatív kontrollként pedig nem transzfektált sejtek lizátumát használtuk. Az első két Western blot kép a sikeres transzfekeciót igazolja. Az ilyen módon transzfektált sejtek lizátumának felhasználásával, anti-V5 antitesttel immun-precipitációt végeztünk. A protokoll végi mosások után az eluátumba csak azok a fehérjék kerültek, amelyek vagy V5 epitóppal rendelkeznek, vagy valamilyen módon kihorganyzódtak a V5 epitópot tartalmazó fehérjéhez, jelen esetben a PXDN-hez. Az eluátum Western blot analízise során primer antitestnek PXDNL elleni antitestet használtunk. A Western képen látható, hogy a PXDNL csak abban az eluátumban van jelen, amely sejteket kotranszfektáltunk PXDNL-lel és PXDNV5-tel. Ezzel indirekt módon bizonyítottuk, hogy a PXDN és a PXDNL között létrejön molekuláris kapcsolat.



42. Ábra A PXDN és PXDNL képes komplexet alkotni. A PXDNL fehérje kimutatható a PXDNV5 immun-precipitátumából, amennyiben mindkét fehérjét kódoló plazmidot transzfektáltunk COS-7 sejtekbe.

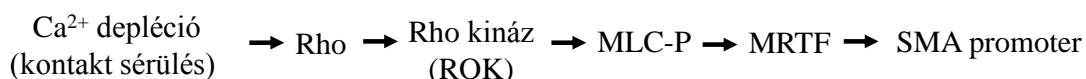
7. Megbeszélés

7.1. Új szereplők az epitheliális mesenchymális tranzícióban

Az előzetes irodalmi adatok, valamint laborunk korábbi eredményei ismeretében munkánk során tulajdonképpen arra kerestük a választ, hogy a miozin aktivitása milyen mechanizmussal regulálja a kontaktsérülés dependens SMA expressziót. Ha az MRTF-B-t LLC-PK1 sejtekbe transzfektáltuk citoszolikus festődést mutatott, majd kontaktsérülést követően azt tapasztaltuk, hogy az a magba transzlokálódott. Amennyiben kísérleteink során interferáltunk a Rho-ROK-MLC-P jelátviteli útvonallal, akkor ez a nukleáris akkumuláció jelentősen mérséklődött. A dolgozatban ismertetett, valamint a publikációban olvasható további eredmények alapján úgy tűnt, hogy ezeknek az epithel sejteknek a kontraktilitása (mivel a folyamat során a miozin könnyű lánc foszforilációja jelentősen fokozódik) vagy feszülése kritikus reguláló eleme az MRTF-általi génszabályozásnak. Ezzel jól egybecseng az az irodalmi adat is, hogy *Drosophilában* a sejtek aktív vagy passzív feszülése az MRTF homológ MAL nukleáris transzlokációját hozza létre¹⁷⁴, és hogy a feszülés a simaizom aktin génexpresszióját képes regulálni¹⁷⁵. Ezek után azt kezdtük vizsgálni, hogy a miozin foszforiláció és az MRTF transzlokáció között még milyen további elemei lehetnek a jelátviteli útnak. Ismert, hogy az MRTF lokalizációt befolyásolja a G/F aktin arány. Ha a G-aktin az MRTF-hez kötődik, megakadályozza annak nukleáris transzlokációját. Aktin polimerizáció esetén a G-aktin F-aktin filamentumokban épül be, melynek hatására az MRTF szabaddá válik, és a sejtmagba jut^{66, 176}. Ezt a modellt jól alátámasztották a dolgozatban bemutatott jaspakinolide-dal végzett kísérletek. Habár azt fontos megjegyezni, hogy korábbi munkák azt találták, hogy a latrunculin B (aktin-monomer szekvesztráló drog) gátolja, a cytochalasin D (az aktin filamentumok szakállas végét fedi) pedig jelentősen serkenti az MRTF sejtmagba történő mozgását, noha mindkét drog elősegíti az F-aktin filamentumok szétesését⁶⁶. Ezek a megfigyelések azt sugallják, hogy a kritikus tényező nem feltétlenül a G-aktin mennyisége vagy pedig G/F-aktin arány, hanem sokkal inkább a G-aktin más fehérjékkel és inhibitorokkal

történő interakciója, ami meghatározza az MRTF kötést és ezáltal a lokalizáció szabályozását.

Egy másik lehetőség, hogy a miozin, mint egy erő-generáló enzim, szükséges lehet az MRTF nukleáris transzportjához vagy retenciójához. Egyre több olyan publikáció jelenik meg, amely szerint a mikrotubulus és mikrofilament citoskeleton fontos szerepet játszik bizonyos proteinek sejtmagba szállításában ¹⁷⁷. Endothel sejtekben pedig leírták, hogy a miozin könnyű lánc kináz (MLCK) szabályozza az Nfκβ nukleáris transzportját, és ezáltal célgénjeinek expresszióját ¹⁷⁸. A szabályozás pontos mechanizmusa még nem ismert, de elképzelhető, hogy az LLC-PK1 sejtekben is hasonló szabályozási folyamatok játszódnak le, azzal a különbséggel, hogy ezekben a sejtekben a miozin könnyű lánc foszforilálásért a miozin könnyű lánc kináz helyett valószínűleg a ROK felelős ¹⁷⁹. Ne feledkezzünk meg arról sem, hogy a miozin aktivitás más, az MRTF-től független jelátviteli útvonalakat is befolyásolhat, mint ahogy ezt más munkacsoportok és laborunk is bizonyította korábbi munkáiban ^{59, 180, 181}. Kiegészítve a dolgozatban szereplő eredményeket a csatolt közleményben bemutatott adatokkal, elmondható, hogy a kontaktsérülés indukálta Rho, ROK, pMLC mediálta MRTF transzlokáció egy új jelátviteli mechanizmus az epitheliális mesenchymális átalakulás komplex szabályozásában.



43. Ábra A kontaktsérülés és az SMA promoter közötti jelátviteli út A kontaktsérülés indukálta Rho - Rho-kináz - pMLC mediálta MRTF transzlokáció egy új, központi mechanizmus az epitheliális mesenchymális átalakulásban.

7.2. A myofibroblasztok egy új extracelluláris mátrix képző mechanizmusa

A myofibroblasztok kialakulásuk során kontraktilis fenotípust vesznek fel, amely a főleg a simaizom aktin expresszió következménye, valamint extracelluláris mátrix fehérjék, például fibronectin és különböző kollagén típusok szintézisébe kezdenek. Eredményeink arra utalnak, hogy a myofibroblasztok egy emlős peroxidázt a

peroxidazint is szekretálják, ami beépülve az extracelluláris mátrixba egy új, korábban nem ismert módja az extracelluláris mátrix szintézisnek. A peroxidazin egyedi tagja a peroxidázok családjának, ugyanis aktív katalitikus doménje mellett extracelluláris mátrix fehérjékre jellemző doméneket is tartalmaz. A protein N-terminálisan tartalmaz leucin gazdag ismétlődéseket, C-terminálisan pedig egy von Willebrand C-típusú domént. A peroxidazint először *Drosophila melanogaster* fajban írták le, ahol az expressziós mintázat alapján az extracelluláris mátrix szintézisében fontos szerepet játszó hemocyták fejezik ki¹⁴⁶. Ugyanebben a publikációban azt találták, hogy a szintén *Drosophila* eredetű Kc sejtek az extracelluláris mátrixba szekretálják fehérjét, ahol trimerek formájában van jelen. A humán peroxidazinnal kapcsolatban azonban lényegesen kevesebb információ áll rendelkezésre. Horikoshi és munkatársai vizsgálták a gén expresszióját és megállapították, hogy az mRNS szövetek széles körében megtalálható, és egy rövid izoformájának kifejeződése jelentősen fokozódik egy apoptózis modellben¹⁴⁷. Egy másik publikációban mint melanoma asszociált antigént (MG50) jellemzik a fehérjét, amely csak melanomákban fordul elő¹⁴⁸. Laborunk korábbi eredményei inkább az első publikációban foglaltakat erősítik meg, ugyanis egy korábban végzett Northern blot kísérletben a vizsgált szövetek nagy részében kimutattuk a PXDN-t kódoló mRNS-t. Mi is vizsgáltuk a Horikoshi munkacsoport által leírt rövid izoformát és bár EB1 sejtekben kapott eredményeiket képesek voltunk reprodukálni, azonban más apoptózis modellekben és fiziológiás szövetekből származó RNS mintákban nem detektáltuk ezt a splice variánst (nem bemutatott eredmény). Így valószínűleg egy ebben a sejtben egyedileg előforduló, a peroxidáz domént kódoló mRNS-ről lehet szó.

Kísérleteinkben TGF- β 1 hatására a PXDN jelentős expresszió-fokozódást mutatott és megfigyeltük, hogy a sejtek a médiumba szekretálják a fehérjét. A sejtek TGF- β 1 kezelését általában szérumentes környezetben szokták végezni, ugyanis ilyenkor a növekedési faktor hatásai robusztusabb formában jelentkeznek⁵⁹. Azonban ilyen körülmények között felmerül a lehetősége annak, hogy a *de novo* hemszintézis nem elégséges az ismert hem tartalmú peroxidázok szintéziséhez. Ugyanerre az esetleges problémára hívta fel a figyelmet az a megfigyelés, hogy TGF- β 1 hatására megnő a NOX4 NADPH-oxidáz expressziója és aktivitása, ami egy ismert hem proszтетikus csoportot kötő fehérje¹⁶⁷. Az ebben a dolgozatban be nem mutatott

kísérleteink azt mutatták, hogy a NOX4 expressziója mintegy 100 szorosára nő, ami jelentős hem-szükséglet növekedést okozhat a myofibroblasztokban. Hogy elkerüljük az esetleges elégtelen hem termelésből adódó problémákat, a médiumot egy hem szintézis előanyaggal, δ -amino-levulináttal egészítettük ki. A médium ALA szuplementációja a PXDN elhelyezkedésében drámai változást hozott létre: A fehérje szekrécióna került, és a sejtek körül az extracelluláris mátrixban fibrilláris struktúrát hozott létre. Annak ellenére, hogy a heterológ módon kifejezett peroxidazin COS-7 sejtek sejtlizátumában detektálható peroxidáz aktivitást mutatott, myofibroblasztokban még ALA jelenlétében sem tudtunk PXDN-dependens enzimaktivitást mérni. Ez a tény magyarázható azzal, hogy humán peroxidazinnak más peroxidázokkal összehasonlítva valószínűleg kisebb az aktivitása. Erre utal Nelson és munkatársai¹⁴⁶ eredménye is, mely szerint a klasszikus peroxidáz szubsztrátokat a *Drosophila* peroxidazin jóval lassabban redukálja. Ezt a megfigyelést mi is kiegészítettük a humán enzimen, ugyanis transzfektált COS-7 sejtek sejtlizátumán végzett kísérleteink alapján a humán laktoperoxidázzal összehasonlítva csak mintegy 1%-át tapasztaltuk az LPO aktivitásának (nem bemutatott kísérlet). Másik magyarázat a peroxidáz aktivitás hiányára, hogy egy másik fehérjével van komplexben, amely gátolhatja az aktivitását. A korábban említett, Nelson és munkatársai által jegyzett publikáció is erre utal, ugyanis nem tudták aktív formában megtisztítani a fehérjét több olyan sejtől, amely magas expressziót mutatott. A kísérleti eredményeink alapján tehát egyelőre nem kizárható, hogy a peroxidazin aktív peroxidázként lenne jelen az endoplazmás retikulumban és ilyen formában kerül szekrécióna a myofibroblasztokban. Mivel nem tudtuk megmérni az aktivitását az endogéne kifejeződő enzimnek, nem állíthatjuk, hogy a médium δ -aminolevulináttal történő kiegészítése, a hipotézisünknek megfelelően segítené a fehérje érését. Így annak a lehetőségét sem lehet kizárni, hogy a szembetűnő lokalizációs különbség nem az ALA-nak közvetlenül a peroxidazinra kifejtett hatásának következménye lenne. Elképzelhető, hogy PXDN egy eddig nem ismert szekrécióna úton jut az extracelluláris mátrixba mely útvonal működéséhez esszenciális a megfelelő mennyiségben jelen lévő hem. Fontos azonban megjegyezni, hogy az *in vivo* vesefibrózis kísérleteink is megerősítették ezt az extracelluláris elhelyezkedést, ugyanis ebben a modellben a peritubuláris térbe lokalizálódott a fehérje. Az extracelluláris térben jelenlévő peroxidazin tartalmú rostok arra utaltak, hogy a fehérje képes lehet a multimerizációra és más fehérjékhez történő

asszociációra. Sejtkultúra modellünkben részleges kolokalizációt figyeltünk meg fibronectin és a PXDN között és ugyanez a festődés volt megfigyelhető a fibrotikus vesében is. A peroxidazin elsődleges szerkezetének analízise alapján is könnyen elképzelhető, hogy az extracelluláris mátrixban más fehérjékkal vagy önmagával képes asszociációra a fehérje. Ahogy azt már korábban is említettem, a *Drosophila* peroxidazintról ismert, hogy képes trimerizációra a fehérje C-terminusán található von Willebrand faktor (vWF) C-típusú doménjén keresztül. Ez a domén több más emlős fehérjében is megtalálható, mint például a thrombospondinokban, ahol a fehérjék trimerizációja zajlik ezen keresztül. Az N-terminálisan található leucin gazdag régió, valamint az immunoglobulin szerű domének is részt vehetnek más ECM proteinekkel történő interakcióban. A leucin gazdag régiókat több, igen különböző funkcióval rendelkező fehérjében írták le, ahol homofil és heterofil interakciók kialakításában vesznek részt¹⁷⁰. A C2 típusú immunoglobulin hurkok igen gyakran megfigyelhetőek különböző idegsejtek adhéziós molekuláiban, mint például a fascilin és a neuroglian¹⁸².

Ismert, hogy alacsonyabb rendű élőlényekben a peroxidázok gyakran vesznek részt az extracelluláris mátrix stabilizálásában tirozin-tirozin keresztkötések létrehozásával. Ezek a reakciók igen fontos szerepet játszanak a *Caenorhabditis elegans* kutikulájának szintézisében¹⁰¹, valamint a tengeri sün petesejt megtermékenyítését követően kialakuló fertilizációs burok megszilárdításában¹⁸³. Ez a ditirozin képző képesség általános tulajdonsága az emlős peroxidázoknak, azonban ennek az enzimaktivitásnak a biológiai jelentősége mindeztáig tisztázatlan. Ez az előbb említett reakció H_2O_2 -t igényel és azt a tényt már korábban több publikáció ismertette, hogy a fibroblasztok TGF- β 1 hatására H_2O_2 -t kezdenek termelni^{184, 185}. Ezt követő kísérletekben azt is bizonyították, hogy az így termelődött H_2O_2 egy külsőleg hozzáadott peroxidáz segítségével ditirozin képzésre fordítható. Ezen ismeretek tükrében azt feltételeztük, hogy a peroxidáz domén esetleges ditirozin formáló képessége szerepet játszhat a peroxidazin tartalmú extracelluláris rostok létrejöttében. Kísérletes eredményeink azonban nem támasztották alá ezt az elképzelést, ugyanis egyrészt nem detektáltunk PXDN dependens peroxidáz aktivitást a sejtekben, másrészt nem tapasztaltunk emelkedést a ditirozin mennyiségében a fibroblaszt-myofibroblaszt átalakulás során (nem bemutatott eredmény). Egy másik szemszögből is megközelítettük a problémát. Mivel a peroxidazin peroxidáz doménje aktív, kíváncsiak

voltunk, hogy a H_2O_2 -nak van-e bármilyen szerepe ezeknek az extracelluláris struktúráknak a képződésében. Kísérleteinkben azt tapasztaltuk, hogy a peroxidazin csendesítése nem befolyásolta a sejtek ROS termelését, arra utalva, hogy a H_2O_2 nem használódik fel a peroxidáz katalizálta reakciókban. Továbbá a reaktív oxigén származékok termelésének kinetikája sem támasztotta alá eredeti hipotézisünket. A H_2O_2 termelés maximuma 24 órával a TGF- β 1 indukciót követően, a fibroblaszt-myofibroblaszt átalakulás korai fázisában volt megfigyelhető, ami nem esett egybe a peroxidazin tartalmú rostok jóval későbbi megjelenésével. Ezek alapján elmondható, hogy a folyamat során termelődő H_2O_2 nem valószínű, hogy arra használódna fel, hogy a peroxidazin extracelluláris rostokba rendeződhessen, hanem sokkal inkább myofibroblasztok kialakulásában lehet szerepe, mely feltételezést már több publikáció is megerősít ^{167, 186}.

Mivel az emlős peroxidázok igen gyakran vesznek részt a szervezet védekező mechanizmusában, érdekes lenne megvizsgálni, hogy a PXDN-nek van-e ilyen immunfunkciója. A myeloperoxidáz és az eozinofil peroxidáz a fehérvérsejtek antimikrobiális folyamataiban játszanak fontos szerepet, a laktoperoxidázzal pedig ismert, hogy a nyálkahártya-felszín védelmében működik közre ^{73, 138}. Érdekes lenne vizsgálni a PXDN immunfunkcióit a sebgyógyulás során, ahol jelentős mennyiségben jelennek meg myofibroblasztok és termelnek extracelluláris mátrix komponenseket.

7.3. Egy új szívspecifikus fehérje jellemzése

A humán genomban azonosítottunk egy, a peroxidazinnal nagyfokú homológiát mutató gént, a *pxdnl*-t. Több elérhető állati genomon is végrehajtottunk homológiakeresést, hogy azonosítsuk más fajokban is a szekvenciát. A gént több emlős és madár genetikai állományában is detektáltuk. A feltételezett protein szekvenciák analízise azt mutatta, hogy a PXDNL-nek több speciesben is feltételezhetően van peroxidáz aktivitása. Több faj genomját megvizsgálva főemlősök közül (csimpánz, orangután, közönséges selyemmajom) azt találtuk, hogy hasonlóan a humán genomhoz olyan fehérjét kódolnak, amelyekben a peroxidáz aktivitáshoz elengedhetetlen aminosavak hiányoznak. Alacsonyabb rendű emlősökben (kutya, nyúl, oposzum, panda) a kódolt fehérjék még valószínűleg rendelkeznek enzimaktivitással. Érdekes azonban megjegyezni, hogy az egér és patkány genom nem tartalmazza a gént, valamint

hogy lóban is módosult formában van jelen. Itt a vélt aminosavszekvencia elemzése alapján nem lehet megítélni a peroxidáz aktivitást. Nemrégiben megjelent egy közlemény mely a PXDNL egy rövid izoformáját mint egy mRNS endonukleáz molekulát azonosítja¹⁸⁷. Ezt a rövid izoformát fehérje szinten több sejtvonalban is kimutatják, azonban az általunk végzett géncsendesítéses technikák nem erősítették még a publikációban talált eredményeket. A kódoló szekvencia analízise alapján ez a cDNS valószínűleg műtermék, amely a reverz transzkripció során, templát váltás (template switching) során képződhet^{188, 189}.

A kizárólagos szíven belüli expresszió, valamint a fehérje doménstruktúrája, szekrécións szignálszekvenciája, valamint immunfestéseink felvetik a lehetőségét, hogy a szíven a PXDNL-nek járulékos extracelluláris mátrix megerősítő funkciója lenne. Meglehet, hogy a fehérjéknek kettős, egy peroxidáz dependens és egy independens funkciója van, melyből a PXDNL esetén a szíven az utóbbi előnyös. Habár a peroxidáz fehérjék a nevüket az aktív peroxidáz domén jelenléte révén kapták, érdekes, összetett doménstruktúrájuk felveti a kérdést, hogy az ECM-ben betöltött funkciójukhoz mennyire fontos ez az enzimaktivitás. A dolgozatban korábban már említettem, hogy a peroxidáz enzimeknek igen gyakori funkciója alacsonyabb rendű élőlényekben az ECM enzimaktivitás stabilizálása. Azonban a peroxidáz egy *C. elegans*-ban megtalálható homológjának vizsgálata azt mutatta, hogy más domének is szükségesek lehetnek a folyamathoz. Amennyiben csak az LRR vagy az Ig doméneket törölték a PXN-2 fehérjéből, nagyon hasonló fenotípust kaptak, mint a teljes gén hiánya esetén. Ebben az esetben természetesen nem zárható ki, hogy a deléciók az egész fehérje funkciót úgy érintik, hogy végül a fenotípusban a peroxidáz aktivitás hiánya lesz megfigyelhető. Ugyanebben a közleményben ugyanakkor azt találták, hogy a génhányos fenotípust ugyan gyengén, de képes megmenteni egy a peroxidáz doménben található, az enzimaktivitást megszüntető pontmutációt tartalmazó géntermék.¹⁵⁰ Így úgy tűnik, hogy ebben a fajban a fehérje peroxidáz aktivitása fontos, de nem az egyedüli tényező a fehérje funkciójának betöltésében. Elképzelhető, hogy az emberi szíven a peroxidáz doménen kívüli részek funkciója kerül előtérbe és a peroxidáz aktivitással rendelkező PXDN mellett fontossá válik egy hasonló szerkezetű, de peroxidáz aktivitással nem rendelkező fehérje a PXDNL expressziója.

Egy immun-precipitációs kísérletben megmutattuk, hogy a PXDNL és a PXDN képes komplexet alkotni. Jellemző a legtöbb állatfajra, hogy többféle peroxidazin fehérjét expresszál, melyek vagy több génről fejeződnek ki, vagy pedig egy géntermék érése során, alternatív splicinggal jönnek létre. Ezen fehérjék interakcióiról egyelőre viszonylag kevés információ áll rendelkezésre az irodalomban, de például *C. elegans*-ban a PXN-1 és PXN-2 fehérjék között kimutattak már funkcionális antagonizmust. A *pxn-2* mutáns állatok morfológiai és fejlődési defektusait a *pxn-1* gén részleges deléciója jelentősen csökkentette. Az eltérő biológiai funkciók feltérképezése, valamint pontos mechanizmus feltárása egyelőre várat magára, de ezek alapján az eredmények alapján a két fehérjének ellentétes funkciója valószínűsíthető a bazális membránok szervezésében. Egyelőre nem tudni, hogy a szívben, ahol mindkét gén, a *pxdn* és a *pxdnl* is expresszálódik, létrejön-e valamilyen funkcionális kapcsolat a fehérjék között. Érdekes kérdés például, hogy vajon a PXDNL heterológ expressziós rendszerben inaktívnak tűnő peroxidáz doménje képes-e a PXDN peroxidáz aktivitását valamilyen módon befolyásolni.

8. Következtetések

Az MRTF transzkripciós faktorokat vizsgáló kísérleteinkben kimutattuk, hogy az MRTF-A esetén jelentős lokalizációs különbség figyelhető meg epithel és fibroblaszt sejtek között. A fibroblaszt-szerű CHO sejteken az MRTF-A inkább citoszolikus, az LLC-PK1 sejtekben inkább nukleáris festődést mutatott, míg az MRTF-B mindkét sejtípusban döntően a citoszolban volt megtalálható. Amennyiben az LLC-PK1 sejtekben megnöveljük a Rho aktivitást, a heterológ módon kifejeződő MRTF-B a sejtmagba jut. Hasonló transzlokáció figyelhető meg, ha a sejteket egy aktin-polimerizációt serkentő vegyülettel, a jaspakinolide-del kezeljük. Ezekből az eredményekből arra következtethetünk, hogy hasonlóan más sejtípusokhoz, a Rho aktivitása és a G-aktin mennyisége fontos tényező az MRTF-B lokalizációjának szabályozásában. A sejtek intercelluláris kapcsolatainak elvesztését követően az MRTF-B Rho dependens módon a citoszolból a nukleuszba kerül, ami felveti a lehetőségét, hogy a kontaktsérülés indukálta jelátvitelben fontos szerepe lehet ennek az útvonalnak.

A PXDN-t vizsgáló munkánk során megállapítottuk, hogy az endogén módon kifejeződő fehérje fibroblasztokban endoplazmás retikulum festődést mutatott. Emberi tüdő- és bőrfibroblasztokban az expresszió indukálható, mind a PXDN-t kódoló mRNS, mind pedig a fehérje mennyisége jelentősen nő TGF- β 1 kezelés hatására. Kimutattuk, hogy a PXDN szekrécióra kerülhet TGF- β 1 stimulus hatására, és az extracelluláris mátrixban más rezidens proteinekkal kolokalizálva hálózatos struktúrát hoz létre. Az endogénon kifejeződő fehérjének nem detektáltuk peroxidáz aktivitását, valamint csendesítésének nem volt mérhető következménye a sejtek H₂O₂ termelésében, ennek ellenére mégsem zárható ki, hogy a peroxidazin aktív peroxidázként szekretálódik a differenciálódó fibroblasztokban. Egy egér vesefibrózis modellben, az unilaterális ureter obstrukcióban megemelkedik a PXDN expressziója a fibrotikus vesében. Immunfestések segítségével kimutattuk, hogy a fehérje a peritubuláris térbe kerül és ott kolokalizál a fibronektinnel. Az eredményekből arra lehet következtetni, hogy TGF- β 1 hatására létrejövő expressziófokozódás és szekréció nemcsak a sejt kultúra körülményei között, hanem *in vivo* is létrejön.

Azonosítottunk és megklónoztunk egy új emberi génterméket, a PXDNL-t, amely nagyban homológ a humán peroxidazinnal. Az mRNS expressziós mintázata szerint az emberi szervezetben csak a szívben fejeződik ki. Northern blot kísérleteink alapján a szívben belül egyenletesen oszlik el az expresszió, amely jó összhangban van az *in situ* hibridizációs eredményeinkkel, melyek szerint a cardiomyocyták expresszálják az mRNS-t. A gén expressziója jelentősen fokozódik dilatatív cardiomyopathiában, ami felveti esetleges szerepét ebben a kórfolyamatban. A szekvencia analízise alapján megállapítottuk, hogy a fehérje néhány, a peroxidáz domén hem kötéséhez elengedhetetlen konzervált aminosavat nem tartalmaz. Kimutattuk, hogy a PXDN-nel szemben a fehérjének nincs peroxidáz aktivitása, ami valószínűleg összefüggésben van a konzervált aminosavak hiányával. Immunfestéseket végeztünk PXDNL transzfektált sejteken és megállapítottuk, hogy a szignálunk kolokalizál a PDI jelölődéssel, ami arra enged következtetni, hogy a fehérje az endoplazmás retikulumban található. Emberi szívben és cardiomyocytákban a fehérje az endoplazmás retikulum mellett a sejtek membránjának találkozásánál az Eberth féle vonaloknak megfelelően is detektálható. Munkánk során megállapítottuk, hogy a PXDNL képes diszulfid hidakon keresztül fehérje-fehérje asszociációkat kialakítani. A protein komplexek molekulatömege alapján elképzelhető, hogy a PXDNL oligomerizálódik és azt is kimutattuk, hogy a fehérje képes a PXDN-nel összekapcsolódni.

9. Összefoglalás

A szöveti fibrózis vezető megbetegedési és halálozási okok közé tartozik világszerte. Függetlenül a pontos anatómiai lokalizációjától, a folyamatban esszenciális szereppel bírnak a kontraktilis, intenzív extracelluláris mátrix-képző tulajdonságokkal rendelkező myofibroblasztok. Jelenleg rengeteg kérdés tisztázatlan a fibrotikus szövet biológiájával kapcsolatban, valószínűleg ez az egyik oka annak, hogy nem rendelkezünk specifikus antifibrotikus terápiákkal.

A myofibroblasztok eredete sok esetben még kérdéses fibrózisban, azonban egyre több bizonyíték támasztja alá, hogy kialakulhatnak epitheliális mesenchymális tranzíció (EMT) során. A folyamat kiváltásában fontos szerepe van a transforming growth factor- β -nak (TGF- β), valamint a sejt-sejt kapcsolatok elvesztésének. Kísérleteink azt mutatták, hogy LLC-PK1 vesehámsejtekben kontaktsérülés hatására az MRTF-B transzkripciós faktor a Rho kis G-fehérje által szabályozott módon a magba transzlokálódott, ami felveti esetleges szerepét az átalakulás szabályozásában.

Munkánk során jellemeztünk egy új emberi peroxidázt, a PXDN-t. A PXDN kifejeződik humán primer fibroblasztokban, ahol az endoplazmás retikulumban helyezkedik el. Ha ezeket a sejteket TGF- β 1-gyel kezeltük, myofibroblaszokká alakulásuk során a PXDN expressziója jelentősen megnő és szekrécióna kerül. A fehérje beépül az extracelluláris mátrixba, ahol egy hálózatos struktúrát alkot. Ezt az *in vitro* megfigyelést egérben *in vivo* egy unilateralis ureter obstrukcióval kiváltott vesefibrózis-modellben is kiegészítettük. A génexpresszió itt is fokozódik és a fehérje nagy mennyiségben jelenik meg a peritubuláris térben a fibrotikus vesékben.

További kísérleteinkben azonosítottuk és megklónoztuk a PXDN egy közeli humán homológját, a PXDNL-t (peroxidasin-like). Megállapítottuk, hogy a gén emberben csak a szívben, a cardiomyocytákban fejeződik ki és dilatatív cardiomyopáthiában nő az expressziója. A PXDN-hez hasonló doménszerkezet ellenére a fehérjének nincs peroxidáz aktivitása. Immunfestéseken a fehérje részben az endoplazmás retikulumban, részben pedig a sejt-sejt kapcsolatoknak megfelelően jelölődött. Kimutattuk, hogy a PXDNL a PXDN-nel képes összekapcsolódni és valószínűleg oligomerként van jelen expressziós helyein.

10. Summary

Tissue fibrosis is a leading cause of morbidity and mortality world-wide. Regardless of the exact anatomical location of fibrosis, the contractile, extracellular matrix producing myofibroblasts have essential role in the process. Many questions of the fibrosis biology are yet to be answered, and probably that is the reason why medicine still lacks specialized anti-fibrotic treatments.

Although there is an ongoing debate about the origin of myofibroblasts, accumulating evidence supports that they can be derived from epithelial cells through epithelial-mesenchymal transition (EMT). It is well established that both transforming growth factor- β (TGF- β) and the loss of cell-cell contacts have important roles in the initiation of this transformation. Our experiments showed that contact-injury triggered the translocation of the transcription factor MRTF-B to the nucleus in LLC-PK1 cells. We found this process dependent on the activity of the small G-protein Rho. This observation raises the possibility that this transcription factor might play an important regulatory role in EMT.

In this work we characterized a novel mammalian peroxidase called PXDN. PXDN is expressed by human primary fibroblasts where it is localized to the endoplasmic reticulum. We detected increased expression and secretion of the protein during TGF- β 1 triggered myofibroblast differentiation. The protein forms fibril-like structures in the extracellular matrix. These *in vitro* studies were followed by a murine *in vivo* unilateral ureter obstruction triggered kidney fibrosis model, where we saw increased expression and peritubular accumulation of PXDN.

In further studies we identified and cloned a close human homologue of PXDN, called PXDNL (peroxidasin-like). The gene is expressed only in cardiomyocytes of the heart and its expression level is increased in dilated cardiomyopathy. Despite its very similar structure to PXDN, it does not have peroxidase activity. Immunostainings showed that the protein is present both in the endoplasmic reticulum and at cell-cell contacts of cardiomyocytes. We showed that PXDNL can associate with PXDN, and it presumably forms oligomers at the sites of its expression.

11. Irodalomjegyzék

1. Wynn TA. Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *J Clin Invest.* 2007; 117: 524-9.
2. Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol.* 2008; 214: 199-210.
3. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C and Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002; 3: 349-63.
4. Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson AK and Flavell RA. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol.* 2006; 24: 99-146.
5. Wynn TA. IL-13 effector functions. *Annu Rev Immunol.* 2003; 21: 425-56.
6. Quan TE, Cowper SE and Bucala R. The role of circulating fibrocytes in fibrosis. *Curr Rheumatol Rep.* 2006; 8: 145-50.
7. Pardo A and Selman M. Matrix metalloproteases in aberrant fibrotic tissue remodeling. *Proc Am Thorac Soc.* 2006; 3: 383-8.
8. Quaggin SE and Kapus A. Scar wars: mapping the fate of epithelial-mesenchymal-myofibroblast transition. *Kidney Int.* 2011; 80: 41-50.
9. Grande MT and Lopez-Novoa JM. Fibroblast activation and myofibroblast generation in obstructive nephropathy. *Nat Rev Nephrol.* 2009; 5: 319-28.
10. Strutz F and Zeisberg M. Renal fibroblasts and myofibroblasts in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 2006; 17: 2992-8.
11. Lin SL, Kisseleva T, Brenner DA and Duffield JS. Pericytes and perivascular fibroblasts are the primary source of collagen-producing cells in obstructive fibrosis of the kidney. *Am J Pathol.* 2008; 173: 1617-27.
12. Humphreys BD, Lin SL, Kobayashi A, Hudson TE, Nowlin BT, Bonventre JV, Valerius MT, McMahon AP and Duffield JS. Fate tracing reveals the pericyte and not epithelial origin of myofibroblasts in kidney fibrosis. *Am J Pathol.* 2010; 176: 85-97.

13. Keeley EC, Mehrad B and Strieter RM. Fibrocytes: bringing new insights into mechanisms of inflammation and fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010; 42: 535-42.
14. Zeisberg EM, Potenta SE, Sugimoto H, Zeisberg M and Kalluri R. Fibroblasts in kidney fibrosis emerge via endothelial-to-mesenchymal transition. *J Am Soc Nephrol.* 2008; 19: 2282-7.
15. Li J and Bertram JF. Review: Endothelial-myofibroblast transition, a new player in diabetic renal fibrosis. *Nephrology (Carlton).* 2010; 15: 507-12.
16. Iwano M, Plieth D, Danoff TM, Xue C, Okada H and Neilson EG. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J Clin Invest.* 2002; 110: 341-50.
17. Iredale JP. Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ. *J Clin Invest.* 2007; 117: 539-48.
18. Wynn TA. Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm. *Nat Rev Immunol.* 2004; 4: 583-94.
19. Meneghin A and Hogaboam CM. Infectious disease, the innate immune response, and fibrosis. *J Clin Invest.* 2007; 117: 530-8.
20. Otte JM, Rosenberg IM and Podolsky DK. Intestinal myofibroblasts in innate immune responses of the intestine. *Gastroenterology.* 2003; 124: 1866-78.
21. Varga J and Abraham D. Systemic sclerosis: a prototypic multisystem fibrotic disorder. *J Clin Invest.* 2007; 117: 557-67.
22. Markiewicz M, Smith EA, Rubinchik S, Dong JY, Trojanowska M and LeRoy EC. The 72-kilodalton IE-1 protein of human cytomegalovirus (HCMV) is a potent inducer of connective tissue growth factor (CTGF) in human dermal fibroblasts. *Clin Exp Rheumatol.* 2004; 22: S31-4.
23. Wang Y, Fan PS and Kahaleh B. Association between enhanced type I collagen expression and epigenetic repression of the FLI1 gene in scleroderma fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 2006; 54: 2271-9.
24. Hasegawa M, Fujimoto M, Takehara K and Sato S. Pathogenesis of systemic sclerosis: altered B cell function is the key linking systemic autoimmunity and tissue fibrosis. *J Dermatol Sci.* 2005; 39: 1-7.

25. Ma B, Zhu Z, Homer RJ, Gerard C, Strieter R and Elias JA. The C10/CCL6 chemokine and CCR1 play critical roles in the pathogenesis of IL-13-induced inflammation and remodeling. *J Immunol.* 2004; 172: 1872-81.
26. Smith RE, Strieter RM, Zhang K, Phan SH, Standiford TJ, Lukacs NW and Kunkel SL. A role for C-C chemokines in fibrotic lung disease. *J Leukoc Biol.* 1995; 57: 782-7.
27. Belperio JA, Keane MP, Burdick MD, Lynch JP, 3rd, Xue YY, Berlin A, Ross DJ, Kunkel SL, Charo IF and Strieter RM. Critical role for the chemokine MCP-1/CCR2 in the pathogenesis of bronchiolitis obliterans syndrome. *J Clin Invest.* 2001; 108: 547-56.
28. Blease K, Mehrad B, Standiford TJ, Lukacs NW, Kunkel SL, Chensue SW, Lu B, Gerard CJ and Hogaboam CM. Airway remodeling is absent in CCR1^{-/-} mice during chronic fungal allergic airway disease. *J Immunol.* 2000; 165: 1564-72.
29. Chiamonte MG, Donaldson DD, Cheever AW and Wynn TA. An IL-13 inhibitor blocks the development of hepatic fibrosis during a T-helper type 2-dominated inflammatory response. *J Clin Invest.* 1999; 104: 777-85.
30. Fertin C, Nicolas JF, Gillery P, Kalis B, Banchereau J and Maquart FX. Interleukin-4 stimulates collagen synthesis by normal and scleroderma fibroblasts in dermal equivalents. *Cell Mol Biol.* 1991; 37: 823-9.
31. Pesce J, Kaviratne M, Ramalingam TR, Thompson RW, Urban JF, Jr., Cheever AW, Young DA, Collins M, Grusby MJ and Wynn TA. The IL-21 receptor augments Th2 effector function and alternative macrophage activation. *J Clin Invest.* 2006; 116: 2044-55.
32. Reiman RM, Thompson RW, Feng CG, Hari D, Knight R, Cheever AW, Rosenberg HF and Wynn TA. Interleukin-5 (IL-5) augments the progression of liver fibrosis by regulating IL-13 activity. *Infect Immun.* 2006; 74: 1471-9.
33. Wynn TA, Cheever AW, Jankovic D, Poindexter RW, Caspar P, Lewis FA and Sher A. An IL-12-based vaccination method for preventing fibrosis induced by schistosome infection. *Nature.* 1995; 376: 594-6.
34. Gorelik L and Flavell RA. Transforming growth factor-beta in T-cell biology. *Nat Rev Immunol.* 2002; 2: 46-53.

35. Letterio JJ and Roberts AB. Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annu Rev Immunol.* 1998; 16: 137-61.
36. Roberts AB, Russo A, Felici A and Flanders KC. Smad3: a key player in pathogenetic mechanisms dependent on TGF-beta. *Ann N Y Acad Sci.* 2003; 995: 1-10.
37. Kaviratne M, Hesse M, Leusink M, Cheever AW, Davies SJ, McKerrow JH, Wakefield LM, Letterio JJ and Wynn TA. IL-13 activates a mechanism of tissue fibrosis that is completely TGF-beta independent. *J Immunol.* 2004; 173: 4020-9.
38. Bataller R and Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest.* 2005; 115: 209-18.
39. Fallowfield JA, Kendall TJ and Iredale JP. Reversal of fibrosis: no longer a pipe dream? *Clin Liver Dis.* 2006; 10: 481-97, viii.
40. Issa R, Zhou X, Constandinou CM, Fallowfield J, Millward-Sadler H, Gaca MD, Sands E, Suliman I, Trim N, Knorr A, Arthur MJ, Benyon RC and Iredale JP. Spontaneous recovery from micronodular cirrhosis: evidence for incomplete resolution associated with matrix cross-linking. *Gastroenterology.* 2004; 126: 1795-808.
41. Duffield JS, Forbes SJ, Constandinou CM, Clay S, Partolina M, Vuthoori S, Wu S, Lang R and Iredale JP. Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair. *J Clin Invest.* 2005; 115: 56-65.
42. Berk BC, Fujiwara K and Lehoux S. ECM remodeling in hypertensive heart disease. *J Clin Invest.* 2007; 117: 568-75.
43. Shirwany A and Weber KT. Extracellular matrix remodeling in hypertensive heart disease. *J Am Coll Cardiol.* 2006; 48: 97-8.
44. Rosenkranz S, Flesch M, Amann K, Haeuseler C, Kilter H, Seeland U, Schluter KD and Bohm M. Alterations of beta-adrenergic signaling and cardiac hypertrophy in transgenic mice overexpressing TGF-beta(1). *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002; 283: H1253-62.
45. Watanabe T, Barker TA and Berk BC. Angiotensin II and the endothelium: diverse signals and effects. *Hypertension.* 2005; 45: 163-9.
46. Rosenkranz S. TGF-beta1 and angiotensin networking in cardiac remodeling. *Cardiovasc Res.* 2004; 63: 423-32.

47. Pauschinger M, Knopf D, Petschauer S, Doerner A, Poller W, Schwimmbeck PL, Kuhl U and Schultheiss HP. Dilated cardiomyopathy is associated with significant changes in collagen type I/III ratio. *Circulation*. 1999; 99: 2750-6.
48. Li G, Li RK, Mickle DA, Weisel RD, Merante F, Ball WT, Christakis GT, Cusimano RJ and Williams WG. Elevated insulin-like growth factor-I and transforming growth factor-beta 1 and their receptors in patients with idiopathic hypertrophic obstructive cardiomyopathy. A possible mechanism. *Circulation*. 1998; 98: II144-9; discussion II9-50.
49. el Nahas AM. Renal scarring: a multi-organ approach to fibrosis. *Exp Nephrol*. 1995; 3: 69-70.
50. Remuzzi G and Bertani T. Pathophysiology of progressive nephropathies. *N Engl J Med*. 1998; 339: 1448-56.
51. Essawy M, Soylemezoglu O, Muchaneta-Kubara EC, Shortland J, Brown CB and el Nahas AM. Myofibroblasts and the progression of diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*. 1997; 12: 43-50.
52. Liu Y. Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention. *J Am Soc Nephrol*. 2004; 15: 1-12.
53. Viebahn C. Epithelio-mesenchymal transformation during formation of the mesoderm in the mammalian embryo. *Acta Anat (Basel)*. 1995; 154: 79-97.
54. Potts JD and Runyan RB. Epithelial-mesenchymal cell transformation in the embryonic heart can be mediated, in part, by transforming growth factor beta. *Dev Biol*. 1989; 134: 392-401.
55. Newgreen DF and Minichiello J. Control of epitheliomesenchymal transformation. I. Events in the onset of neural crest cell migration are separable and inducible by protein kinase inhibitors. *Dev Biol*. 1995; 170: 91-101.
56. Fitchett JE and Hay ED. Medial edge epithelium transforms to mesenchyme after embryonic palatal shelves fuse. *Dev Biol*. 1989; 131: 455-74.
57. Janda E, Lehmann K, Killisch I, Jechlinger M, Herzig M, Downward J, Beug H and Grunert S. Ras and TGF[beta] cooperatively regulate epithelial cell plasticity and metastasis: dissection of Ras signaling pathways. *J Cell Biol*. 2002; 156: 299-313.

58. Masszi A, Di Ciano C, Sirokmany G, Arthur WT, Rotstein OD, Wang J, McCulloch CA, Rosivall L, Mucsi I and Kapus A. Central role for Rho in TGF-beta1-induced alpha-smooth muscle actin expression during epithelial-mesenchymal transition. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2003; 284: F911-24.
59. Masszi A, Fan L, Rosivall L, McCulloch CA, Rotstein OD, Mucsi I and Kapus A. Integrity of cell-cell contacts is a critical regulator of TGF-beta 1-induced epithelial-to-myofibroblast transition: role for beta-catenin. *Am J Pathol.* 2004; 165: 1955-67.
60. Yang J and Liu Y. Dissection of key events in tubular epithelial to myofibroblast transition and its implications in renal interstitial fibrosis. *Am J Pathol.* 2001; 159: 1465-75.
61. Hill CS, Wynne J and Treisman R. The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF. *Cell.* 1995; 81: 1159-70.
62. Wang D, Chang PS, Wang Z, Sutherland L, Richardson JA, Small E, Krieg PA and Olson EN. Activation of cardiac gene expression by myocardin, a transcriptional cofactor for serum response factor. *Cell.* 2001; 105: 851-62.
63. Selvaraj A and Prywes R. Megakaryoblastic leukemia-1/2, a transcriptional co-activator of serum response factor, is required for skeletal myogenic differentiation. *J Biol Chem.* 2003; 278: 41977-87.
64. Sotiropoulos A, Gineitis D, Copeland J and Treisman R. Signal-regulated activation of serum response factor is mediated by changes in actin dynamics. *Cell.* 1999; 98: 159-69.
65. Mack CP, Somlyo AV, Hautmann M, Somlyo AP and Owens GK. Smooth muscle differentiation marker gene expression is regulated by RhoA-mediated actin polymerization. *J Biol Chem.* 2001; 276: 341-7.
66. Miralles F, Posern G, Zaromytidou AI and Treisman R. Actin dynamics control SRF activity by regulation of its coactivator MAL. *Cell.* 2003; 113: 329-42.
67. Du KL, Chen M, Li J, Lepore JJ, Mericko P and Parmacek MS. Megakaryoblastic leukemia factor-1 transduces cytoskeletal signals and induces smooth muscle cell differentiation from undifferentiated embryonic stem cells. *J Biol Chem.* 2004; 279: 17578-86.

68. Copeland JW and Treisman R. The diaphanous-related formin mDial controls serum response factor activity through its effects on actin polymerization. *Mol Biol Cell*. 2002; 13: 4088-99.
69. Geneste O, Copeland JW and Treisman R. LIM kinase and Diaphanous cooperate to regulate serum response factor and actin dynamics. *J Cell Biol*. 2002; 157: 831-8.
70. Camoretti-Mercado B, Liu HW, Halayko AJ, Forsythe SM, Kyle JW, Li B, Fu Y, McConville J, Kogut P, Vieira JE, Patel NM, Hershenson MB, Fuchs E, Sinha S, Miano JM, Parmacek MS, Burkhardt JK and Solway J. Physiological control of smooth muscle-specific gene expression through regulated nuclear translocation of serum response factor. *J Biol Chem*. 2000; 275: 30387-93.
71. Liu HW, Halayko AJ, Fernandes DJ, Harmon GS, McCauley JA, Kocieniewski P, McConville J, Fu Y, Forsythe SM, Kogut P, Bellam S, Dowell M, Churchill J, Lesso H, Kassiri K, Mitchell RW, Hershenson MB, Camoretti-Mercado B and Solway J. The RhoA/Rho kinase pathway regulates nuclear localization of serum response factor. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2003; 29: 39-47.
72. Cen B, Selvaraj A and Prywes R. Myocardin/MKL family of SRF coactivators: key regulators of immediate early and muscle specific gene expression. *J Cell Biochem*. 2004; 93: 74-82.
73. O'Brien PJ. Peroxidases. *Chem Biol Interact*. 2000; 129: 113-39.
74. Davies MJ, Hawkins CL, Pattison DI and Rees MD. Mammalian heme peroxidases: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxid Redox Signal*. 2008; 10: 1199-234.
75. Furtmuller PG, Zederbauer M, Jantschko W, Helm J, Bogner M, Jakopitsch C and Obinger C. Active site structure and catalytic mechanisms of human peroxidases. *Arch Biochem Biophys*. 2006; 445: 199-213.
76. Gajhede M, Schuller DJ, Henriksen A, Smith AT and Poulos TL. Crystal structure of horseradish peroxidase C at 2.15 Å resolution. *Nat Struct Biol*. 1997; 4: 1032-8.
77. Welinder KG, Justesen AF, Kjaersgard IV, Jensen RB, Rasmussen SK, Jespersen HM and Duroux L. Structural diversity and transcription of class III peroxidases from *Arabidopsis thaliana*. *Eur J Biochem*. 2002; 269: 6063-81.

78. Passardi F, Cosio C, Penel C and Dunand C. Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant Cell Rep.* 2005; 24: 255-65.
79. Sum A. A peroxidazin fehérjék működése. *Egyetemi szakdolgozat.* 2006.
80. Kimura S and Ikeda-Saito M. Human myeloperoxidase and thyroid peroxidase, two enzymes with separate and distinct physiological functions, are evolutionarily related members of the same gene family. *Proteins.* 1988; 3: 113-20.
81. Taurog A. Molecular evolution of thyroid peroxidase. *Biochimie.* 1999; 81: 557-62.
82. Landino LM, Crews BC, Gierse JK, Hauser SD and Marnett LJ. Mutational analysis of the role of the distal histidine and glutamine residues of prostaglandin-endoperoxide synthase-2 in peroxidase catalysis, hydroperoxide reduction, and cyclooxygenase activation. *J Biol Chem.* 1997; 272: 21565-74.
83. Zeng J and Fenna RE. X-ray crystal structure of canine myeloperoxidase at 3 Å resolution. *J Mol Biol.* 1992; 226: 185-207.
84. Jacquet A, Garcia-Quintana L, Deleersnyder V, Fenna R, Bollen A and Mognilevsky N. Site-directed mutagenesis of human myeloperoxidase: further identification of residues involved in catalytic activity and heme interaction. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994; 202: 73-81.
85. Balaban RS, Nemoto S and Finkel T. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell.* 2005; 120: 483-95.
86. Schrader M and Fahimi HD. Peroxisomes and oxidative stress. *Biochim Biophys Acta.* 2006; 1763: 1755-66.
87. Gonzalez FJ. Role of cytochromes P450 in chemical toxicity and oxidative stress: studies with CYP2E1. *Mutat Res.* 2005; 569: 101-10.
88. Bedard K and Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 2007; 87: 245-313.
89. Han CH, Freeman JL, Lee T, Motalebi SA and Lambeth JD. Regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase. Identification of an activation domain in p67(phox). *J Biol Chem.* 1998; 273: 16663-8.
90. Abo A, Pick E, Hall A, Totty N, Teahan CG and Segal AW. Activation of the NADPH oxidase involves the small GTP-binding protein p21rac1. *Nature.* 1991; 353: 668-70.

91. De Deken X, Wang DT, Many MC, Costagliola S, Libert F, Vassart G, Dumont JE and Miot F. Cloning of two human thyroid cDNAs encoding new members of the NADPH oxidase family. *Journal of Biological Chemistry*. 2000; 275: 23227-33.
92. Dupuy C, Ohayon R, Valent A, Noel-Hudson MS, Deme D and Virion A. Purification of a novel flavoprotein involved in the thyroid NADPH oxidase. Cloning of the porcine and human cdnas. *J Biol Chem*. 1999; 274: 37265-9.
93. Donko A, Peterfi Z, Sum A, Leto T and Geiszt M. Dual oxidases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2005; 360: 2301-8.
94. Donko A, Ruisanchez E, Orient A, Enyedi B, Kapui R, Peterfi Z, de Deken X, Benyo Z and Geiszt M. Urothelial cells produce hydrogen peroxide through the activation of Duox1. *Free Radic Biol Med*. 2010; 49: 2040-8.
95. Grasberger H and Refetoff S. Identification of the maturation factor for dual oxidase. Evolution of an eukaryotic operon equivalent. *J Biol Chem*. 2006; 281: 18269-72.
96. Morand S, Ueyama T, Tsujibe S, Saito N, Korzeniowska A and Leto TL. Duox maturation factors form cell surface complexes with Duox affecting the specificity of reactive oxygen species generation. *FASEB J*. 2009; 23: 1205-18.
97. Moreno JC, Bikker H, Kempers MJ, van Trotsenburg AS, Baas F, de Vijlder JJ, Vulsma T and Ris-Stalpers C. Inactivating mutations in the gene for thyroid oxidase 2 (THOX2) and congenital hypothyroidism. *N Engl J Med*. 2002; 347: 95-102.
98. Coburn M, Schuel H and Troll W. A hydrogen peroxide block to polyspermy in the sea urchin *Arbacia punctulata*. *Dev Biol*. 1981; 84: 235-8.
99. Wong JL, Creton R and Wessel GM. The oxidative burst at fertilization is dependent upon activation of the dual oxidase Udx1. *Dev Cell*. 2004; 7: 801-14.
100. Deits TL and Shapiro BM. Conformational control of ovoperoxidase catalysis in the sea urchin fertilization membrane. *J Biol Chem*. 1986; 261: 12159-65.
101. Edens WA, Sharling L, Cheng G, Shapira R, Kinkade JM, Lee T, Edens HA, Tang X, Sullards C, Flaherty DB, Benian GM and Lambeth JD. Tyrosine cross-linking of extracellular matrix is catalyzed by Duox, a multidomain

- oxidase/oxidase with homology to the phagocyte oxidase subunit gp91phox. *J Cell Biol.* 2001; 154: 879-91.
102. Hansson M, Olsson I and Nauseef WM. Biosynthesis, processing, and sorting of human myeloperoxidase. *Arch Biochem Biophys.* 2006; 445: 214-24.
 103. Klebanoff SJ. Myeloperoxidase: contribution to the microbicidal activity of intact leukocytes. *Science.* 1970; 169: 1095-7.
 104. Furtmuller PG, Burner U and Obinger C. Reaction of myeloperoxidase compound I with chloride, bromide, iodide, and thiocyanate. *Biochemistry.* 1998; 37: 17923-30.
 105. van Dalen CJ, Whitehouse MW, Winterbourn CC and Kettle AJ. Thiocyanate and chloride as competing substrates for myeloperoxidase. *Biochem J.* 1997; 327 (Pt 2): 487-92.
 106. Hazen SL, Hsu FF, Duffin K and Heinecke JW. Molecular chlorine generated by the myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride system of phagocytes converts low density lipoprotein cholesterol into a family of chlorinated sterols. *J Biol Chem.* 1996; 271: 23080-8.
 107. Heinecke JW. Mechanisms of oxidative damage by myeloperoxidase in atherosclerosis and other inflammatory disorders. *J Lab Clin Med.* 1999; 133: 321-5.
 108. Heinecke JW. Pathways for oxidation of low density lipoprotein by myeloperoxidase: tyrosyl radical, reactive aldehydes, hypochlorous acid and molecular chlorine. *Biofactors.* 1997; 6: 145-55.
 109. Kagan VE, Yalowich JC, Borisenko GG, Tyurina YY, Tyurin VA, Thampatty P and Fabisiak JP. Mechanism-based chemopreventive strategies against etoposide-induced acute myeloid leukemia: free radical/antioxidant approach. *Mol Pharmacol.* 1999; 56: 494-506.
 110. Goldman R, Claycamp GH, Sweetland MA, Sedlov AV, Tyurin VA, Kisin ER, Tyurina YY, Ritov VB, Wenger SL, Grant SG and Kagan VE. Myeloperoxidase-catalyzed redox-cycling of phenol promotes lipid peroxidation and thiol oxidation in HL-60 cells. *Free Radic Biol Med.* 1999; 27: 1050-63.
 111. Pongracz K, Pathak DN, Nakamura T, Burlingame AL and Bodell WJ. Activation of the tamoxifen derivative metabolite E to form DNA adducts: comparison with

- the adducts formed by microsomal activation of tamoxifen. *Cancer Res.* 1995; 55: 3012-5.
112. Pathak DN, Pongracz K and Bodell WJ. Microsomal and peroxidase activation of 4-hydroxy-tamoxifen to form DNA adducts: comparison with DNA adducts formed in Sprague-Dawley rats treated with tamoxifen. *Carcinogenesis.* 1995; 16: 11-5.
 113. Day BW, Tyurin VA, Tyurina YY, Liu M, Facey JA, Carta G, Kisin ER, Dubey RK and Kagan VE. Peroxidase-catalyzed pro- versus antioxidant effects of 4-hydroxytamoxifen: enzyme specificity and biochemical sequelae. *Chem Res Toxicol.* 1999; 12: 28-37.
 114. Tsuruta Y, Subrahmanyam VV, Marshall W and O'Brien PJ. Peroxidase-mediated irreversible binding of arylamine carcinogens to DNA in intact polymorphonuclear leukocytes activated by a tumor promoter. *Chem Biol Interact.* 1985; 53: 25-35.
 115. Kalyanaraman B and Sohnle PG. Generation of free radical intermediates from foreign compounds by neutrophil-derived oxidants. *J Clin Invest.* 1985; 75: 1618-22.
 116. Uetrecht JP. Current trends in drug-induced autoimmunity. *Toxicology.* 1997; 119: 37-43.
 117. Uetrecht JP, Shear NH and Zahid N. N-chlorination of sulfamethoxazole and dapsone by the myeloperoxidase system. *Drug Metab Dispos.* 1993; 21: 830-4.
 118. Uetrecht JP, Ma HM, MacKnight E and McClelland R. Oxidation of aminopyrine by hypochlorite to a reactive dication: possible implications for aminopyrine-induced agranulocytosis. *Chem Res Toxicol.* 1995; 8: 226-33.
 119. Fischer V, Haar JA, Greiner L, Lloyd RV and Mason RP. Possible role of free radical formation in clozapine (clozaril)-induced agranulocytosis. *Mol Pharmacol.* 1991; 40: 846-53.
 120. Michael SL, Pumford NR, Mayeux PR, Niesman MR and Hinson JA. Pretreatment of mice with macrophage inactivators decreases acetaminophen hepatotoxicity and the formation of reactive oxygen and nitrogen species. *Hepatology.* 1999; 30: 186-95.

121. Olsson I, Persson AM, Stromberg K, Winqvist I, Tai PC and Spry CJ. Purification of eosinophil peroxidase and studies of biosynthesis and processing in human marrow cells. *Blood*. 1985; 66: 1143-8.
122. Carlson MG, Peterson CG and Venge P. Human eosinophil peroxidase: purification and characterization. *J Immunol*. 1985; 134: 1875-9.
123. Klebanoff SJ and Coombs RW. Virucidal effect of stimulated eosinophils on human immunodeficiency virus type 1. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1996; 12: 25-9.
124. Kroegel C, Warner JA, Virchow JC, Jr. and Matthys H. Pulmonary immune cells in health and disease: the eosinophil leucocyte (Part II). *Eur Respir J*. 1994; 7: 743-60.
125. Kroegel C, Virchow JC, Jr., Luttmann W, Walker C and Warner JA. Pulmonary immune cells in health and disease: the eosinophil leucocyte (Part I). *Eur Respir J*. 1994; 7: 519-43.
126. Samoszuk MK, Petersen A, Gidianian F and Rietveld C. Cytophilic and cytotoxic properties of human eosinophil peroxidase plus major basic protein. *Am J Pathol*. 1988; 132: 455-60.
127. Carr AC, Winterbourn CC and van den Berg JJ. Peroxidase-mediated bromination of unsaturated fatty acids to form bromohydrins. *Arch Biochem Biophys*. 1996; 327: 227-33.
128. Pastori RL, Moskaitis JE and Schoenberg DR. Estrogen-induced ribonuclease activity in *Xenopus* liver. *Biochemistry*. 1991; 30: 10490-8.
129. Dompenciel RE, Garnepudi VR and Schoenberg DR. Purification and characterization of an estrogen-regulated *Xenopus* liver polysomal nuclease involved in the selective destabilization of albumin mRNA. *J Biol Chem*. 1995; 270: 6108-18.
130. Znamenskaya LV, Gabdrakhmanova LA, Chernokalskaya EB, Leshchinskaya IB and Hartley RW. Phosphate regulation of biosynthesis of extracellular RNases of endospore-forming bacteria. *FEBS Lett*. 1995; 357: 16-8.
131. Karginov FV, Cheloufi S, Chong MM, Stark A, Smith AD and Hannon GJ. Diverse endonucleolytic cleavage sites in the mammalian transcriptome depend

- upon microRNAs, Drosha, and additional nucleases. *Molecular Cell*. 2010; 38: 781-8.
132. Ueda T, Sakamaki K, Kuroki T, Yano I and Nagata S. Molecular cloning and characterization of the chromosomal gene for human lactoperoxidase. *Eur J Biochem*. 1997; 243: 32-41.
 133. Fragoso MA, Torbati A, Fregien N and Conner GE. Molecular heterogeneity and alternative splicing of human lactoperoxidase. *Arch Biochem Biophys*. 2009; 482: 52-7.
 134. Ratner AJ and Prince A. Lactoperoxidase. New recognition of an "old" enzyme in airway defenses. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2000; 22: 642-4.
 135. Conner GE, Salathe M and Forteza R. Lactoperoxidase and hydrogen peroxide metabolism in the airway. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002; 166: S57-61.
 136. Oram JD and Reiter B. The inhibition of streptococci by lactoperoxidase, thiocyanate and hydrogen peroxide. The oxidation of thiocyanate and the nature of the inhibitory compound. *Biochem J*. 1966; 100: 382-8.
 137. Ihalin R, Loimaranta V and Tenovuo J. Origin, structure, and biological activities of peroxidases in human saliva. *Arch Biochem Biophys*. 2006; 445: 261-8.
 138. Geiszt M, Witta J, Baffi J, Lekstrom K and Leto TL. Dual oxidases represent novel hydrogen peroxide sources supporting mucosal surface host defense. *FASEB J*. 2003; 17: 1502-4.
 139. Reiter B, Marshall VM, BjorckL and Rosen CG. Nonspecific bactericidal activity of the lactoperoxidases-thiocyanate-hydrogen peroxide system of milk against *Escherichia coli* and some gram-negative pathogens. *Infect Immun*. 1976; 13: 800-7.
 140. Ruf J and Carayon P. Structural and functional aspects of thyroid peroxidase. *Arch Biochem Biophys*. 2006; 445: 269-77.
 141. Medeiros-Neto GA, Knobel M, Yamamoto K, Cavaliere H and Kallas W. Deficient thyroid peroxidase causing organification defect and goitrous hypothyroidism. *J Endocrinol Invest*. 1979; 2: 353-7.
 142. Pommier J, Tourniaire J, Rahmoun B, Deme D, Pallo D, Bornet H and Nunez J. Thyroid iodine organification defects: a case with lack of thyroglobulin iodination

- and a case without any peroxidase activity. *J Clin Endocrinol Metab.* 1976; 42: 319-29.
143. Grasberger H. Defects of thyroidal hydrogen peroxide generation in congenital hypothyroidism. *Mol Cell Endocrinol.* 2010.
 144. Picot D, Loll PJ and Garavito RM. The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H2 synthase-1. *Nature.* 1994; 367: 243-9.
 145. Smith WL, DeWitt DL and Garavito RM. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem.* 2000; 69: 145-82.
 146. Nelson RE, Fessler LI, Takagi Y, Blumberg B, Keene DR, Olson PF, Parker CG and Fessler JH. Peroxidasin: a novel enzyme-matrix protein of Drosophila development. *EMBO J.* 1994; 13: 3438-47.
 147. Horikoshi N, Cong J, Kley N and Shenk T. Isolation of differentially expressed cDNAs from p53-dependent apoptotic cells: activation of the human homologue of the Drosophila peroxidasin gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999; 261: 864-9.
 148. Mitchell MS, Kan-Mitchell J, Minev B, Edman C and Deans RJ. A novel melanoma gene (MG50) encoding the interleukin 1 receptor antagonist and six epitopes recognized by human cytolytic T lymphocytes. *Cancer Res.* 2000; 60: 6448-56.
 149. Tindall AJ, Pownall ME, Morris ID and Isaacs HV. *Xenopus tropicalis* peroxidasin gene is expressed within the developing neural tube and pronephric kidney. *Dev Dyn.* 2005; 232: 377-84.
 150. Gotenstein JR, Swale RE, Fukuda T, Wu Z, Giurumescu CA, Goncharov A, Jin Y and Chisholm AD. The *C. elegans* peroxidasin PXN-2 is essential for embryonic morphogenesis and inhibits adult axon regeneration. *Development.* 2010; 137: 3603-13.
 151. Brandes RP. Vascular peroxidase 1/peroxidasin: a complex protein with a simple function? *Cardiovasc Res.* 2011; 91: 1-2.
 152. Li H, Cao Z, Moore DR, Jackson PL, Barnes S, Lambeth JD, Thannickal VJ and Cheng G. Microbicidal Activity of VPO1 in Human Plasma via Generation of HOCl. *Infect Immun.* 2012.

153. Bai YP, Hu CP, Yuan Q, Peng J, Shi RZ, Yang TL, Cao ZH, Li YJ, Cheng G and Zhang GG. Role of VPO1, a newly identified heme-containing peroxidase, in ox-LDL induced endothelial cell apoptosis. *Free Radic Biol Med.* 2011; 51: 1492-500.
154. Cheng G, Salerno JC, Cao Z, Pagano PJ and Lambeth JD. Identification and characterization of VPO1, a new animal heme-containing peroxidase. *Free Radic Biol Med.* 2008; 45: 1682-94.
155. Khan K, Rudkin A, Parry DA, Burdon KP, McKibbin M, Logan CV, Abdelhamed ZI, Muecke JS, Fernandez-Fuentes N, Laurie KJ, Shires M, Fogarty R, Carr IM, Poulter JA, Morgan JE, Mohamed MD, Jafri H, Raashid Y, Meng N, Piseth H, Toomes C, Casson RJ, Taylor GR, Hammerton M, Sheridan E, Johnson CA, Inglehearn CF, Craig JE and Ali M. Homozygous mutations in PXDN cause congenital cataract, corneal opacity, and developmental glaucoma. *Am J Hum Genet.* 2011; 89: 464-73.
156. Tauber S, Jais A, Jeitler M, Haider S, Husa J, Lindroos J, Knofler M, Mayerhofer M, Pehamberger H, Wagner O and Bilban M. Transcriptome analysis of human cancer reveals a functional role of heme oxygenase-1 in tumor cell adhesion. *Mol Cancer.* 2010; 9: 200.
157. Hillig RC, Renault L, Vetter IR, Drell Tt, Wittinghofer A and Becker J. The crystal structure of rna1p: a new fold for a GTPase-activating protein. *Molecular Cell.* 1999; 3: 781-91.
158. Homma S, Shimada T, Hikake T and Yaginuma H. Expression pattern of LRR and Ig domain-containing protein (LRRIG protein) in the early mouse embryo. *Gene Expr Patterns.* 2009; 9: 1-26.
159. Gray-Owen SD and Blumberg RS. CEACAM1: contact-dependent control of immunity. *Nat Rev Immunol.* 2006; 6: 433-46.
160. Maness PF and Schachner M. Neural recognition molecules of the immunoglobulin superfamily: signaling transducers of axon guidance and neuronal migration. *Nat Neurosci.* 2007; 10: 19-26.
161. Voorberg J, Fontijn R, van Mourik JA and Pannekoek H. Domains involved in multimer assembly of von willebrand factor (vWF): multimerization is independent of dimerization. *EMBO J.* 1990; 9: 797-803.

162. Gupta MC, Graham PL and Kramer JM. Characterization of alpha1(IV) collagen mutations in *Caenorhabditis elegans* and the effects of alpha1 and alpha2(IV) mutations on type IV collagen distribution. *J Cell Biol.* 1997; 137: 1185-96.
163. Woo WM, Berry EC, Hudson ML, Swale RE, Goncharov A and Chisholm AD. The *C. elegans* F-spondin family protein SPON-1 maintains cell adhesion in neural and non-neural tissues. *Development.* 2008; 135: 2747-56.
164. Burns KD and Harris RC. Signaling and growth responses of LLC-PK1/C14 cells transfected with the rabbit AT1 ANG II receptor. *Am J Physiol.* 1995; 268: C925-35.
165. Hull RN, Cherry WR and Weaver GW. The origin and characteristics of a pig kidney cell strain, LLC-PK. *In Vitro.* 1976; 12: 670-7.
166. Konczol K, Bodnar I, Zelena D, Pinter O, Papp RS, Palkovits M, Nagy GM and Toth ZE. Nesfatin-1/NUCB2 may participate in the activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in rats. *Neurochem Int.* 2010; 57: 189-97.
167. Cucoranu I, Clempus R, Dikalova A, Phelan PJ, Ariyan S, Dikalov S and Sorescu D. NAD(P)H oxidase 4 mediates transforming growth factor-beta1-induced differentiation of cardiac fibroblasts into myofibroblasts. *Circ Res.* 2005; 97: 900-7.
168. Brattelid T, Winer LH, Levy FO, Liestol K, Sejersted OM and Andersson KB. Reference gene alternatives to Gapdh in rodent and human heart failure gene expression studies. *BMC Mol Biol.* 2010; 11: 22.
169. Khan R and Sheppard R. Fibrosis in heart disease: understanding the role of transforming growth factor-beta in cardiomyopathy, valvular disease and arrhythmia. *Immunology.* 2006; 118: 10-24.
170. Kobe B and Kajava AV. The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Curr Opin Struct Biol.* 2001; 11: 725-32.
171. Yang H and Reinherz EL. Dynamic recruitment of human CD2 into lipid rafts. Linkage to T cell signal transduction. *J Biol Chem.* 2001; 276: 18775-85.
172. Adams JC and Lawler J. The thrombospondins. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011; 3: a009712.
173. Bornstein P. Thrombospondins: structure and regulation of expression. *FASEB J.* 1992; 6: 3290-9.

174. Somogyi K and Rorth P. Evidence for tension-based regulation of Drosophila MAL and SRF during invasive cell migration. *Dev Cell*. 2004; 7: 85-93.
175. Hinz B, Mastrangelo D, Iselin CE, Chaponnier C and Gabbiani G. Mechanical tension controls granulation tissue contractile activity and myofibroblast differentiation. *Am J Pathol*. 2001; 159: 1009-20.
176. Posern G, Miralles F, Guettler S and Treisman R. Mutant actins that stabilise F-actin use distinct mechanisms to activate the SRF coactivator MAL. *EMBO J*. 2004; 23: 3973-83.
177. Campbell EM and Hope TJ. Role of the cytoskeleton in nuclear import. *Adv Drug Deliv Rev*. 2003; 55: 761-71.
178. Wadgaonkar R, Linz-McGillem L, Zaiman AL and Garcia JG. Endothelial cell myosin light chain kinase (MLCK) regulates TNFalpha-induced NFkappaB activity. *J Cell Biochem*. 2005; 94: 351-64.
179. Szaszi K, Sirokmany G, Di Ciano-Oliveira C, Rotstein OD and Kapus A. Depolarization induces Rho-Rho kinase-mediated myosin light chain phosphorylation in kidney tubular cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2005; 289: C673-85.
180. Ivanov AI, McCall IC, Parkos CA and Nusrat A. Role for actin filament turnover and a myosin II motor in cytoskeleton-driven disassembly of the epithelial apical junctional complex. *Mol Biol Cell*. 2004; 15: 2639-51.
181. Avizienyte E, Fincham VJ, Brunton VG and Frame MC. Src SH3/2 domain-mediated peripheral accumulation of Src and phospho-myosin is linked to deregulation of E-cadherin and the epithelial-mesenchymal transition. *Mol Biol Cell*. 2004; 15: 2794-803.
182. Walsh FS and Doherty P. Neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily: role in axon growth and guidance. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1997; 13: 425-56.
183. Heinecke JW and Shapiro BM. The respiratory burst oxidase of fertilization. A physiological target for regulation by protein kinase C. *J Biol Chem*. 1992; 267: 7959-62.

184. Thannickal VJ and Fanburg BL. Activation of an H₂O₂-generating NADH oxidase in human lung fibroblasts by transforming growth factor beta 1. *J Biol Chem.* 1995; 270: 30334-8.
185. Larios JM, Budhiraja R, Fanburg BL and Thannickal VJ. Oxidative protein cross-linking reactions involving L-tyrosine in transforming growth factor-beta1-stimulated fibroblasts. *J Biol Chem.* 2001; 276: 17437-41.
186. Hecker L, Vittal R, Jones T, Jagirdar R, Luckhardt TR, Horowitz JC, Pennathur S, Martinez FJ and Thannickal VJ. NADPH oxidase-4 mediates myofibroblast activation and fibrogenic responses to lung injury. *Nat Med.* 2009; 15: 1077-81.
187. Gu SQ, Bakthavachalu B, Han J, Patil DP, Otsuka Y, Guda C and Schoenberg DR. Identification of the human PMR1 mRNA endonuclease as an alternatively processed product of the gene for peroxidasin-like protein. *RNA.* 2012; 18: 1186-96.
188. Geiszt M, Lekstrom K and Leto TL. Analysis of mRNA transcripts from the NAD(P)H oxidase 1 (Nox1) gene. Evidence against production of the NADPH oxidase homolog-1 short (NOH-1S) transcript variant. *J Biol Chem.* 2004; 279: 51661-8.
189. Mader RM, Schmidt WM, Sedivy R, Rizovski B, Braun J, Kalipciyan M, Exner M, Steger GG and Mueller MW. Reverse transcriptase template switching during reverse transcriptase-polymerase chain reaction: artificial generation of deletions in ribonucleotide reductase mRNA. *J Lab Clin Med.* 2001; 137: 422-8.

12. Saját közlemények jegyzéke

A dolgozat alapjául szolgáló közlemények és kézirat:

Peterfi Z, Donko A, Orient A, Sum A, Prokai A, Molnar B, Vereb Z, Rajnavolgyi E, Kovacs KJ, Muller V, Szabo AJ, Geiszt M
Peroxidasin is secreted and incorporated into the extracellular matrix of myofibroblasts and fibrotic kidney
AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY 175:(2) pp. 725-735. (2009)
IF: 5.673

Fan LZ, Sebe A, Peterfi Z, Masszi A, Thirone ACP, Rotstein OD, Nakano H, McCulloch CA, Szaszi K, Mucsi I, Kapus A
Cell contact-dependent regulation of epithelial-myofibroblast transition via the Rho-Rho kinase-phospho-myosin pathway
MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL 18:(3) pp. 1083-1097. (2007)
IF: 6.028

Zalán Péterfi, Zsuzsanna E. Tóth, Adrienn Sum, Hajnal A. Kovács, Ágnes Donkó, Ajay M. Shah and Miklós Geiszt
Identification of a cardiac specific form of cell adhesion in the human heart
2012 (publikációra előkészítve)

Egyéb közlemény

Lanyi A, Barath M, Peterfi Z, Bogel G, Orient A, Simon T, Petrovszki E, Kis-Toth K, Sirokmany G, Rajnavolgyi E, Terhorst C, Buday L, Geiszt M
The Homolog of the Five SH3-Domain Protein (HOFI/SH3PXD2B) Regulates Lamellipodia Formation and Cell Spreading
PLOS ONE 6:(8) Paper e23653. (2011)
IF: 4.411

Donko A, Ruisanchez E, Orient A, Enyedi B, Kapui R, Peterfi Z, de Deken X, Benyo Z, Geiszt M
Urothelial cells produce hydrogen peroxide through the activation of Duox1
FREE RADICAL BIOLOGY AND MEDICINE 49:(12) pp. 2040-2048. (2010)
IF: 5.707

Donko A, Peterfi Z, Sum A, Leto T, Geiszt M.
Dual oxidases
PHILOSOPHICAL TRANSACTIONS B BIOLOGICAL SCIENCES 360:(1464) pp. 2301-2308. (2005)
IF: 6,325

13. Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani Dr. Geiszt Miklósnak, aki témavezetőként TDK-s éveimtől kezdve e disszertáció megszületéséig irányított. Köszönöm neki, hogy kritikus tudományszemléletével, kiapadhatatlan ötleteivel, töretlen optimizmusával igazán inspiráló közeget teremtett a munkához.

Szeretném megköszönni Dr. Kapus Andrásnak, hogy egyetemi éveim alatt két nyarat a laborjában tölthettem. Nem lehetek elég hálás a tőle kapott szakmai és emberi támogatásért, mely azóta is elkísér pályámon.

Köszönettel tartozom Dr. Spät András és Dr. Hunyady László korábbi és jelenlegi intézetigazgatóknak, akik lehetővé tették, hogy az Élettani Intézetben dolgozhassak. Köszönöm Dr. Ligeti Erzsébetnek, hogy a Celluláris és molekuláris élettan program vezetőjeként, támogatta és figyelemmel kísérte tudományos munkámat.

Hálás köszönettel tartozom laborunk asszisztenseinek, Molnár Beátának és Szosznyák Tündének, akik precíz munkavégzésükkel, példás hozzáállásukkal rengeteg segítséget nyújtottak az elmúlt években. Köszönöm laborunk korábbi és jelenlegi munkatársainak, Dr. Enyedi Balásznak, Donkó Ágnesnek, Orient Annának, Dr. Sirokmány Gábornak, Dr. Sum Adriennek, Dr. Petheő Gábornak, Dr. Kovács Istvánnak, Dr. Lázár Enikőnek, Zana Melindának a szakmai eszmecseréket, a labor vidám légkörét. Köszönöm diákkörös hallgatóim, Fábry Szabolcs, Homola Zsuzsanna, Juhász Imre, Kapui Réka, Kovács Hajnal Anna, Németh Éva, Tóth Szilvia kísérletekben nyújtott segítségét és motiváló lelkesedését.

Köszönöm a Kapus labor minden munkatársának, külön kiemelve Dr. Szászi Katalint és Lingzhi Fan-t, a szakmai segítséget és a professzionális légkört, amelyben öröm volt dolgozni.

Köszönöm Peti-Peterdi Jánosnak, hogy laborjában elsajátíthattam a multifoton mikroszkópia alapjait.

Köszönettel tartozom az Élettani Intézet minden munkatársának, hogy az elmúlt 10 év során ilyen baráti légkörben dolgozhattam.

Végül, de nem utolsósorban köszönettel és hálával tartozom családomnak, barátaimnak és menyasszonyomnak, ugyanis támogatásuk, szeretetük, biztatásuk nélkül ez a munka nem valósulhatott volna meg.