

Az epithel- és endothelsejtek plaszticitásának jellemzése és szabályozása egyes patológiás folyamatokban

Doktori értekezés

Dr. Gasparics Ákos

Semmelweis Egyetem

Elméleti és Transzlációs Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Sebe Attila PhD, tudományos munkatárs

Hivatalos bírálók: Dr. Antus Balázs PhD, DSc, osztályvezető főorvos
Dr. Tőkés Anna-Mária, PhD, tudományos főmunkatárs

Szigorlati bizottság elnöke: Prof. Dr. Reusz György,
MTA doktora, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Vörös Péter, PhD, osztályvezető
főorvos
Dr. Tory Kálmán, PhD, egyetemi
adjunktus

Budapest
2018

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	4
I.Bevezetés.....	8
I.1. Sejtplaszticitás, az epithelialis mesenchymalis transitio es az endothelialis mesenchymalis transitio folyamata.....	8
I.2. Vesefibrosis	19
I.3. Myofibroblastok	20
I.4. Kísérletes munkám közvetlen előzményei	23
I.4.1. A TGF- β 1 hatása proximalis tubularis epithelsejteken.....	23
I.4.2. A „kettős sérülés” modell	25
I.4.3. Szignalizációs útvonalak.....	26
I.5. A Myocardin Related Transcription Factors (MRTFs) általános jellemzése és szerepe EMT során	28
I.6. A hipotéziseinket megalapozó irodalmi előzmények.....	35
I.6.1. SCAI – Suppressor of Cancer cell Invasion	35
I.6.2. Metastasis és az EndMT	37
II. Célkitűzések.....	39
III. Módszerek	40
III.1. Sejtkultúra és kezelések	40
III.2. Plazmidok	42
III.3. Tranziens transzfekció, luciferáz promoteraktivitás assay	43
III.4. GFP-SCAI-t stabilan expresszáló sejtek.....	44
III.5. Antitestek és reagensek.....	44
III.6. Unilateralis ureter obstructio (UUO) egérmodell.....	45
III.7. Vesetranszplantáció rejekeciós modell.....	46
III.8. Kvantitatív real-time PCR vizsgálat	47

III.9. Western blot.....	48
III.10. Microarray alapú génexpressziós-analízis	49
III.11. Statisztikai elemzés.....	49
IV. Eredmények.....	50
IV.1. A SCAI-fehérje szerepe proximalis tubulus sejtek epithelialis mesenchymalis transitiójában.....	50
IV.2. A primer patkány agyi endothel sejtek EndMT-jének vizsgálata.....	62
V. Megbeszélés.....	70
VI. Következtetések.....	78
VII. Összefoglalás	81
VIII. Summary.....	83
IX. Irodalomjegyzék.....	85
X. Saját publikációk jegyzéke	118
X.1. A disszertációhoz kapcsolódó közlemények	118
X.2. A disszertációtól független közlemények.....	118
XI. Köszönetnyilvánítás	119

Rövidítések jegyzéke

Ang-II	Angiotensin II
bFGF	Basic fibroblast growth factor
BMP-7	Bone-morphogenic protein 7
BRCA1	Breast cancer 1
BSA	Bovine serum albumin
BSAC	N-terminal basic, SAP (SAF-A/B, Acinus, PIAS), and coiled-coil domains
CAF	Cancer-associated fibroblast
CCC	Cadherin-catenin complex
CD 31	Cluster of differentiation 31
CCM	Cerebral cavernous malformation
Cdc42	Cell division cycle 42
CEC	Cornea epithelial cell
CTC	Circulating tumor cell
CTGF	Connective tissue growth factor
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DN	Dominant negative
E-cadherin	Epithelial cadherin
ECM	Extracellular matrix
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EMT	Epithelial-mesenchymal transition
EndMT	Endothelial-mesenchymal transition

EPDC	Epicardium-derived cell
EPLIN	Epithelial protein lost in neoplasm/ Lima-1
Erk-5	Extracellular-signal-regulated kinase 5
ET-1	Endothelin-1
FGF	Fibroblast growth factor
FHL2	Four and a half LIM domain
FSP-1	Fibroblast-specific protein-1
FST	Follistatin
GFP	Green fluorescent protein
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HDAC1	Histone Deacetylase 1
HP1	Heterochromatin protein 1
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cell
JNK	c-Jun N-terminal kinase
KLF-4	Krüppel-like factor 4
KSHV	Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus
LLC-PK1	Lilly Laboratories Cell - Porcine Kidney 1
LTBP	Latent TGF- β binding protein
MAL	Megakaryocytic acute leukaemia
MEnt	Mesenchymal-to-endothelial transition
MET	Mesenchymal epithelial transition
MICAL-2	Microtubule associated monooxygenase, calponin and LIM domain containing 2
MKL	Megakaryoblastic leukaemia

MLC	Myosin light chain
MLCK	Myosin light chain kinase
MMP	Matrix metalloproteinase
MRTF	Myocardin-related transcription factor
N-cadherin	Neural cadherin
NMuMG	Normal murine mammary gland
NTD	N-terminal domain
OTT	One-twenty two protein
PAI	Plasminogen activator inhibitor
PAK	p21 activated kinase
PBS	Phosphate-buffered saline
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PDGF	Platelet derived growth factor
Rac1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
RBEC	Rat brain endothelial cell
RBM15	RNA binding motif protein 15
RhoA	Ras homolog gene family, member A
ROK	Rho kinase
SAP domain	Scaffold attachment domain
SDS	Sodium dodecyl sulfate
Smurf1, 2	SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 1, 2
SRE	Serum response element
SRF	Serum response factor

STAR	Steroidogenic acute regulatory protein
SWI/SNF	SWItch/Sucrose Non-Fermentable
TBS	Tris-buffered saline
TCE	TGF- β 1 control element
TCF/LEF	T-cell factor/lymphoid enhancer factor
TEM	Transendothelial migration
TGF- β	Transforming growth factor beta
TIF	Tubulointerstitial fibrosis
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
UUO	Unilateral ureter obstruction
VE-cadherin	Vascular endothelial cadherin
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR1	Vascular endothelial growth factor receptor 1
WSTF-SNF2H	Williams syndrome transcription factor-SNF homologue
ZO-1	Zonula occludens protein 1
α -SMA	α -Smooth muscle actin

I.Bevezetés

I.1. Sejtplaszticitás, az epithelialis mesenchymalis transitio es az endothelialis mesenchymalis transitio folyamata

A szomatikus sejtek érett fenotípusának változását sejtplaszticitásnak nevezzük (Zeisberg és mtsai 2009). Ennek során a sejtek olyan átalakulásokon mennek keresztül, amik megváltoztatják a sejtek morfológiáját, funkcióját. Tágabb értelemben idetartoznak a különböző őssejt típusok átalakulásai differenciációjuk során, illetve a fakultatív őssejtek aktivációja. A már elkötelezett, differenciált sejtek dedifferenciációja, transzifferenciációja, vagy csak fenotípus változása is a sejtplaszticitás egy-egy formája. A sejtplaszticitás célja, hogy a különböző káros hatások ellenére fenntartsák a szervezet homeosztázisát, azonban a nem megfelelő módon zajló folyamatok a sejtek malignus átalakulását, valamint alkalmazkodását is segíthetik. A tumorsejteket nemcsak saját szabályozó mechanizmusaik, hanem az őket körülvevő citokinek is alakítják, a tumor őssejtek és környezetük között az egymásra hatás kölcsönös (Plaks és mtsai 2015).

A béltraktusban kétféle őssejt populációt írtak le, melyek közül az egyik csoport felelős a differenciált sejtek létrehozásáért, míg a nyugvó populáció sérülés esetén aktiválódik, és átalakulhat az előbbi típusba (Tian és mtsai 2011, Beumer és mtsai 2016).

A bőr regenerációs mechanizmusában a későbbiekben részletesen tárgyalt epithelialis mesenchymalis transitio mellett az őssejteknek szintén fontos szerepe van. Egészséges állapotban a különböző őssejt típusok meghatározott bőr-kompartmentek létrehozásáért felelnek (Blanpain és mtsai 2014, Donati és mtsai 2015), sérülés esetén azonban eredettől függetlenül a sérült rész sejtjeit kezdik el pótolni (Ito és mtsai 2005, Ito és mtsai 2007, Page és mtsai 2013). Ezekben az esetekben a már differenciált sejtek is képesek voltak dedifferenciálódni az elpusztult őssejtállomány pótlására. Ugyanilyen mechanizmusokat más szervrendszerekben is megfigyeltek. A bél különböző progenitor sejtjei sérülés hatására őssejt állapotba kerültek (van Es és mtsai 2012, Buczacki és mtsai 2013, Tetteh és mtsai 2016), egértracheában a szekretoros Clara-sejtek az őssejt populáció pusztulását követően mind megjelenésükben, mind funkciójukban a basalis őssejtekhez váltak hasonlóvá (Tata és mtsai 2013).

A dedifferenciálódás számos esetben nem szükséges új funkciók megjelenéséhez, a

májsejtek regenerációjuk során új májsejteket hoztak létre (Schaub és mtsai 2014, Yanger és mtsai 2014). A hepatocyták ráadásul egyes hatásokra epeúti epithel sejtekké alakultak (Fan és mtsai 2012, Yanger és mtsai 2013). A hasnyálmirigyen a korábbiakban a regeneratív folyamatokban az őssejtek szerepét feltételezték, a közelmúltban azonban károsodást követően az acinus sejtek fenotípusának változását írták le. A sejtek acinusokra és ductalis sejtekre jellemző markereket is termeltek (Kopp és mtsai 2016).

Az epithelialis és mesenchymalis sejtek fenotípusa különböző esetekben (pl. embrionális fejlődés) megváltozhat, a két állapot egymásba átalakulhat, ezt a jelenséget epithelialis-mesenchymalis transitióknak (EMT), illetve mesenchymalis-epithelialis transitióknak (MET) nevezzük. Ezeket a folyamatokat elsőként Elizabeth Hay írta le ötven évvel ezelőtt (Hay 1968), az akkoriban használt „transformatio” elnevezést a folyamat pontosabb jellemzésekként később a „transitio” kifejezés váltotta fel.

Az epithelialis-mesenchymalis transitio fiziológiásan az embrionális fejlődésben, sebgyógyulásban, patológiás esetben a metastasisképzésben, és fibrotikus folyamatokban jelenik meg.

Az EMT az embrionális fejlődés során több ponton is kulcsfontosságú, már az implantáció (Pijnenborg és mtsai 1980), majd a gastrulatio során is; így alakulnak ki az endodermalis és mesodermalis sejtek. Ezek a későbbi differenciálódás során további EMT-n, illetve MET-en esnek át (Perez-Pomares és mtsai 2002). A velősánc is EMT segítségével alakul ki, ennek megfelelően az EMT-t szabályozó gének defektusa esetén súlyos fejlődési rendellenességek (pl. végtag deformitások) jöhetnek létre (Acloque és mtsai 2009). Az organogenesisben EMT-t a szívfejlődés során írták le, így az epicardiumból ún. epicardium-derived cells (EPDCs) létrejöttét, melyek különböző fajokban eltérő mértékben járulhatnak hozzá a coronariák, vascularis pericyták kialakulásához (Dettman és mtsai 1998).

A sebgyógyulás során a széli sejtek a sebzés helye felé vándorolnak. Az epithelialis sejtek immobilitásuk miatt nem tudják bevonni a sebfelszínt, így fenotipikus változáson kell keresztülmenniük, hogy helyreállíthassák a szöveti integritását. A folyamatban a basalis és suprabasalis sejtek is részt vesznek (Shaw és mtsai 2016), egér- keratinocytákban a folyamat az EGFR-Erk5 (Epidermal growth factor receptor - Extracellular-signal-

regulated kinase 5) kaszkádon keresztül, a Slug-promoter aktivitásának szabályozásával megy végbe (Arnoux és mtsai 2008).

A tumoros megbetegedések egy részét az epithel eredetű carcinomák jelentik. Ilyenkor az ép, differenciálódott epithelsejtek tumoros átalakuláson mennek keresztül, EMT-vel invazív, malignus fenotípust vehetnek fel (Thiery és mtsai 2006). A heterogenitás, genetikai instabilitás miatt a kulcsfontosságú EMT-markereken (lásd később) kívül a tumorsejtek az EMT-markerek változatos jelenlétét mutatják (De Craene és mtsai 2013). Az EMT-nek szerepe lehet a tumorok invazivitásában, az érfalba törésben, metastasisképzésben is. Számos tumortípusban aktiválódhat az EMT-program, de ritkán van szükség a transitio teljes folyamatára, a parciális EMT segítségével is növekszik a tumorsejtek motilitása és invazivitása. Vastagbél carcinomás minták vizsgálatakor a centrális tumor területére jellemző epithel növekedési mintázat a tumorfronton nem volt megfigyelhető, kevésbé differenciált, E-cadherint nem expresszáló mintázatot mutatott (Brabletz és mtsai 2001). A motilitás növekedésén kívül az EMT asszociált transzkripciós faktorok (így pl. a Snail TWIST, ZEB) növelik a proinflammatorikus, immunszuppresszív citokinek kifejeződését. A metasztázisok létrejöttéhez a tumoros sejteknek alkalmazkodniuk kell a helyi mikroköznyezethez, így a sejtek fenotípusa folyamatos változást mutathat (Brabletz mtsai 2001). Nehezíti az EMT szerepének megértését az egyes tumorokban, hogy a különböző transzkripciós faktorok - tumortípustól függően - más-más hatással bírhatnak. Így pl. a Snail emlőtumoros modellben hozzájárult a metastasisképzéshez (Tran és mtsai 2014), míg pancreas carcinomában a ZEB1-gyel ellentétben (Krebs és mtsai 2017) nem befolyásolta azt (Zheng és mtsai 2015). Érdekes módon ugyanazon tumor esetében is előfordul, hogy ugyanannak a transzkripciós családnak a tagjai eltérően hatnak annak terjedésére, így pl. a ZEB1 csökkentette, a ZEB2 pedig növelte a melanoma agresszivitását (Caramel és mtsai 2013, Denecker és mtsai 2014). A tumorok „EMT-státuszára” vonatkozóan létrehoztak egy pontrendszert, ami a tumor eredete és génexpressziós mintázat alapján akár a prognózis megítélésében is segítséget nyújthat (Tan és mtsai 2014). A keringő tumorsejteken (Circulating Tumor Cells – CTC) epithelialis és mesenchymalis markerek (Yu és mtsai 2013, Khoo és mtsai 2015) is megtalálhatóak, ami valószínűsíti, hogy a tumoros terjedés során ezekben a sejtekben EMT-program aktiválódik. Emlő epithelsejtekben ez olyan egyedi génexpressziós mintázattal járt együtt, ami őssejtekre volt jellemző (Schmidt és mtsai

2015). Immortalizált emberi emlő epithelsejtekben EMT indukció hatására mesenchymalis, őssejt markereket észleltek, az így létrejövő sejtek nagyobb eséllyel hoztak létre mammosphere-eket, ami szintén őssejtekre jellemző tulajdonság (Mani és mtsai 2008). Snail1 hatásra a tumorőssejtek mennyisége megnőhet, az aszimmetrikus osztódást (egy őssejt – egy differenciált sejt) szimmetrikus osztódás (két őssejt) váltja fel (Hwang és mtsai 2014), ez mind primer mind metasztatikus környezetben megvalósulhat.

Az ún. CAF (cancer-associated fibroblast) sejtek hozzájárulnak a tumoros sejtek környezetének átalakításához, melyek így agresszívebben terjedhetnek. A tumoros sejtek termelte citokinek, így pl. TGF- β hatásra (Calon és mtsai 2014) alakulhatnak ki nyugvó fibroblastokból, vagy egyéb, lokális mesenchymalis sejtekből (Polanska és mtsai 2013, Kuzet és mtsai 2016). Az EMT-n kívül az EndMT (Endothelialis-mesenchymalis transitio) is részt vehet CAF- sejtek kialakításában (Zeisberg és mtsai 2007, Ostman és mtsai 2009). Jellemüket tekintve ezek a sejtek myofibroblastoknak felelnek meg, α -SMA-t (α -Smooth muscle actin) expresszálnak (Sappino és mtsai 1988). Emlőtumoros (Yu és mtsai 2014) és hólyagtumoros (Zhuang és mtsai 2015) modellben a CAF-sejtek TGF- β 1 termelésük révén maguk is elősegítették a tumoros sejtek EMT-jét. Ezenkívül az őssejtekre jellemző jelátviteli útvonalak aktiválásához, így a Wnt, Notch, NF- κ B, YAP/TAZ-hoz is hozzájárulnak (Zanconato és mtsai 2016). A Snail-, ZEB-, Twist-expresszió tumortípustól függően változhat a CAF-sejtekben, (Baulida 2017) és a tumorok viselkedését alapvetően befolyásolhatja.

A fibrotikus folyamatok valamilyen káros hatás következményei, így pl. gyulladásos folyamatok, hypoxia, reaktív oxigénradikálok, sérülések, metabolikus tényezők (Fan JM 2001, Oldfield és mtsai 2001, Manotham és mtsai 2004, Tanaka és mtsai 2004, Rhyu és mtsai 2005). Az epithelsejtek a noxák hatására EMT-n mehetnek keresztül. Munkacsoportunk a vesét érintő tubulointerstitialis fibrosist (TIF) részletesen vizsgálta, ezért ez a téma külön fejezetben kerül kifejtésre. A májfibrosis során kialakuló fibroblastok eredetéről az irodalomban megoszlanak az eredmények. Egyes szerzők szerint TGF- β 1 hatásra a hepatocytákból alakulnak ki fibroblastok (Zeisberg és mtsai 2007). Más források a májcsillagsejteket jelölik meg a myofibroblastok eredeteként (Mederacke és mtsai 2013).

A tüdőfibrosis többféle modelljében, *in vivo* is igazolták a myofibroblastok és az EMT

jelenlétét (Kim és mtsai 2006, Larsson és mtsai 2008, Tanjore és mtsai 2009). Az epithelsejtek mellett megfigyelték a mesothelialis sejtek TGF- β közvetített mesenchymalis transitióját (Zolak és mtsai 2013, Chen és mtsai 2015). Egy friss kutatás a Krüppel like factor 4 (KLF4) szerepét vizsgálta tüdőfibrosisban. A KLF4 TGF- β 1 útvonalon hatva gátolta az EMT-t, csökkentette a fibrosis súlyosságát (Lin és mtsai 2017).

Myocardialis sérülést követően az epicardiumból származó sejtek interstitialis fibroblastok és koronária simaizomsejtek létrehozásával elősegíthetik a sérült szívizom regenerációját (Limana és mtsai 2007, Winter és mtsai 2007). A TGF- β ilyen esetben is részt vesz a szignalizációban (Compton és mtsai 2006).

Az endothelsejtek az erek, nyirokerek belső felszínét képezik. Az epithelsejtekhez hasonlóan jellemző rájuk az apicobasalis polaritás, valamint a szoros kapcsolódás (adherens junctions, tight junctions). Az endothelsejtek transitióval szintén mesenchymalis sejtekké alakulhatnak, EndMT útján. A jelenséget elsőként a szívfejlődés kialakulásában írták le (Markwald és mtsai 1975). Az EndMT – az EMT-hez hasonlóan – nem minden esetben jelent végleges átalakulást, a folyamatok reverzibilisek lehetnek, ezt MEnT-nek (mesenchymal-to-endothelial-transition) nevezzük (Miettinen és mtsai 1994, Ubil és mtsai 2014).

Az EndMT során végbemenő változások szoros hasonlóságot mutatnak az epithelialis-mesenchymalis transitióval, az események egy meghatározott sorrendet követnek. Ezek az endothelialis jellemzők megszűnésével, mesenchymalis jellemzők kialakulásával járnak (Medici és mtsai 2012). Tekintettel az őket érő hatásokra, a homeostasis fenntartásához az endothelsejtek plaszticitása elengedhetetlen.

Az EndMT a szívfejlődés során részt vesz az endocardialis párnák kialakításában. Ezek két helyen is megfigyelhetőek, a kiáramlási pálya területe a későbbi semilunaris billentyűk prekuzora. Az atrioventricularis régió párnáiból később az AV septum, valamint a ventricularis septum membranosus része és a mitralis-, tricuspidalis billentyűk alakulnak ki (Eisenberg és mtsai 1995, Kisanuki és mtsai 2001, Combs és mtsai 2009).

Patológias folyamatok során is találkozhatunk EndMT-vel. A különböző szervrendszerek esetében a sejtmorfológia változása, a megváltozott szekréció sokféle problémát okozhat, ezek közül például a népbetegségnek számító atherosclerosis kialakulásakor a plakkok részben az endothelsejtekből származhatnak. Egérmodellben a magas zsírtartalmú diéta EndMT-t hozott létre az aorta endothelsejtjeiben (Chen és mtsai 2015).

Az EndMT jelenlétét cardialis fibrosisban is kimutatták, egérmodellekben a BMP-7 (Bone morphogenic protein 7) szisztémás adása keringésterheléses modellekben és krónikus allograft rejekeció esetén gátolta az EndMT-t (Zeisberg és mtsai 2007). Érdekes módon az ischaemiás károsodás a fibroblastokban endothelhez hasonló fenotípusváltozást hozott létre (Ubil mtsai 2014).

A corneaepithel-sejtek (CEC) EndMT-je in vivo patkánymodellben sérülést követően TGF- β hatás mellett ment végbe (Sumioka és mtsai 2008). A TGF β -1 hatására humán CEC sejtekben is kimutatták EndMT jelenlétét, ennek gátlása mellett a sejtek nagyobb arányban mutattak endothel jelleget (Okumura és mtsai 2013). Az in vitro tenyésztett CEC-sejtek tenyésztése, transzplantálása a klinikusok számára is nagy fontossággal bírhat a cornea endothel diszfunkcióval járó betegségeiben.

Egérmodellben vizsgálva pulmonaris epithelsejtek bleomycin indukálta fibrosis hatására EndMT-n mentek keresztül (Hashimoto és mtsai 2010), sugárkezelés okozta tüdőfibrosisban a vascularis sejtek EndMT-jét (és az alveolaris epithelsejtek EMT-jét) figyelték meg (Choi és mtsai 2015).

Az autoimmun betegségek közül az EndMT a szisztémás szklerózis fibrogenesiséhez, vaszkuláris remodellingjéhez járul hozzá (Chrobak és mtsai 2013, Cipriani és mtsai 2015), gyulladássos bélbetegségben az intestinalis endothelsejtek EndMT-jét írták le (Rieder és mtsai 2011).

Tumoros megbetegedésekben az EndMT – egérmodellben – a CAF (cancer-associated fibroblast) -sejtek közel 40%-ának kialakulásáért felelt (Zeisberg mtsai 2007). Kaposi sarcomás laesiokban KSHV-fertőzött (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus) endothelsejtek Notch-on keresztüli EndMT-re jellemző markereket mutattak (Gasperini és mtsai 2012).

A CCM (cerebral cavernous malformation) egy ritka érrendszeri betegség, ami a retina és a központi idegrendszer vénás kisérhálózatának érintettségével jár. A betegség autoszomális domináns típusában három gén „loss of function” mutációja fordulhat elő (Draheim és mtsai 2014). Rágcsálómódelben a *Ccm1* és a *Ccm3* knockout állatokban CCM jött létre, a cavernomák EndMT-re jellemző markereket mutattak (Maddaluno és mtsai 2013, Bravi és mtsai 2015).

Vesefibrosis során a fibrotikus vesében található fibroblastok egy részét is endothelsejtekből származónak írták le (Zeisberg és mtsai 2008, LeBleu és mtsai 2013).

Fejlődéstanilag az epithelsejtek az endodermából származnak, míg az endothelsejtek mesoderma eredetűek. Az EMT és EndMT folyamata azonban sok hasonlóságot mutat.

Az EndMT és az EMT lépései is – fiziológiás és patológiás folyamatok során is ugyanolyan – finoman hangoltak. A folyamatot számos változás indukálhatja, így pl. növekedési faktorok, hypoxia, gyulladási kaszkádok. A legfontosabb, EMT-t befolyásoló tényező a növekedési faktorok TGF- β családja, melyről a későbbiekben lesz részletesen szó. Bár az EndMT-t jellemző szignalizációs útvonalak kevésbé ismertek, a TGF- β sejt kultúrák modellben EndMT-t indukáló hatású volt (Zeisberg mtsai 2007).

Az EMT fenotípus-változással járó folyamat, az epithelialis tulajdonságokat mesenchymalis fenotípus váltja fel. Az epithelsejtekre jellemző az apicobasalis polaritás, szerepüket tekintve határreteg-alkotó sejtek, permeabilitásuk korlátozott, szoros sejtkapcsoló struktúrák kötik össze őket (tight junctions, adherent junctions, gap junctions, dezmosómák). Ilyenek pl. az E-cadherin molekulák, melyek immunhisztokémiai vizsgálatokban az epithelsejtek azonosítására használatosak. Dinamikáját tekintve az EMT során az epithel jelleg csökkenését követően aktiválódik a mesenchymalis-fibrotikus, majd végül a myogen program (Masszi és mtsai 2011). A transzizio során létrejövő fibroblastok sejt szerkezete, szerepe ettől nagymértékben eltér. Nagy mennyiségű ECM-t termelnek, fenotípusuk motilissé, kontraktilissé válik. Nem tapadnak basalis membránhoz, nem alkotnak egybefüggő réteget sem, nincsenek sejtközötti kapcsolataik, nem polarizáltak (Thiery mtsai 2006). A sejtek vimentint expresszálnak, ami markerként követhető. Ezekből az aktivált sejtekből végül myofibroblastok jönnek létre, melyek nagy mennyiségű citokint, extracelluláris mátrixot

termelnek. Ez pl. szöveti sérülést követően szükséges az adott struktúra egyben tartásához, (seb)gyógyuláshoz. A myofibroblastok jellegzetes markere az α -SMA, amit a későbbiekben részletesen is bemutatok.

Az EndMT folyamata az EMT-hez képest kevésbé ismert. Zeisberg és munkatársai vesefibrosis során kialakuló fibroblastok eredetét vizsgálták, amelyeknek egy része az endothelsejtekre jellemző CD31 (Cluster of differentiation 31) marker mellett az FSP-1-et (Fibroblast-specific protein 1) és az SMA-t is expresszálta (Zeisberg mtsai 2008). Állatkísérletes modellben a diabétesz okozta kardiális fibrosisban az endothelin-1 (ET-1) elősegítette az EndMT létrejöttét (Widyantoro és mtsai 2010). Az EndMT szignáltranszdukciós szabályozói között a TGF- β mellett a Notch és a Slug is szerepet játszhat (Noseda és mtsai 2004, Niessen és mtsai 2008, Chang és mtsai 2011), csakúgy, mint az EMT esetében. Összességében a különböző megfigyelések a két transitio lépéseinek hasonlóságát valószínűsítik, az epithel (pl. E-cadherin) és endothel (pl. VE-cadherin) markerek különbségével (Miller 2017).

A cadherineknél a transzmembrán fehérjék nagy családját képezik, közülük az E-cadherin az epithelsejtek adherens junction típusú kapcsolatait Ca^{2+} -függően alkotja. Az extracelluláris részlet a szomszédos extracelluláris részletekhez kötődik, az intracelluláris domént az β -catenin illetve a p120 catenin képes megkötni. A β -catenin és az F-actin közti kapcsolatot az α -catenin biztosítja (van Roy és mtsai 2008). A közelmúltban azonban bebizonyosodott, hogy a β -catenin nem „horgonyozza le” a CCC komplexet (E-cadherin- β -catenin – α -catenin) a cytoskeletonhoz, hanem monomerként az E-cadherinhez/ β -catenin-hez, dimerként az F-actinhoz kötődik (Drees és mtsai 2005). Ezzel szemben az EPLIN (epithelial protein lost in neoplasm/ Lima-1) fehérje képest az α -catenin komplexet az F-actinhoz kötni (Abe és mtsai 2008). Az E-cadherin/catenin többféle szignalizációs útvonalon, így pl. a Wnt-n, PI3K-n, Rho- (Ras homolog gene family) GTP-ázokon, NF- κ B-n keresztül hathat. Wnt-szignalizáció mellett a β -catenin defoszforilált állapotban a nucleusban halmozódik fel, ahol a TCF/LEF-fel komplexet alkotva sejttípustól függő Wnt targeteket, így pl. profibrotikus géneket aktivál (Luo és mtsai 2004). Az EMT speciális természetének köszönhetően a sejtmakerek változása dinamikus folyamat, a transitio során az epithel fenotípusra jellemző molekulákat fokozatosan felváltják a mesenchymalis típusúak. Zeisberg felosztása szerint ezeket öt csoportba sorolhatjuk (Zeisberg mtsai 2009).

A sejtfelszíni fehérjék közül az E-cadherin, ZO-1 mennyisége csökken, ezzel párhuzamosan az N-cadherin, β 1-intgerin mennyisége nő. A sejtek E-cadherin-expresszióról N-cadherin-expresszióra való átállását „cadherin switch”-nek nevezzük. A cytoskeletonban a cytokeratin csökkenésével szemben az FSP-1-, α -SMA-, vimentin-, β -catenin-expresszió nő.

Az extracelluláris mátrix kollagén összetétele megváltozik, a IV-es típusú kollagén mennyisége növekszik. A fibrotikus EMT-ben megnő a fibronectin-kifejeződés.

A fentiek kívül az EMT folyamata során több transzkripciós faktor is aktiválódhat, így pl. a Snail, Twist, ZEB1. A Snail és a Twist fibrotikus EMT-ben betöltött szerepét a vesefibrosis modellnél tárgyalom részletesen.

A fentiek mellett egyes transformatiók során a sejtek mikroRNS mintázata is megváltozik.

Vizsgálataink során az SMA-t azért tartottuk jó markernek az EMT tekintetében, mert a transitio végén jelenik meg, illetve a myogen program aktiválódását is jelzi. Az actinnak hat különböző típusát írták le emlős sejtekben: két harántcsíkolt izom actint (α -skeletal, α -cardial), két simaizom actint (α -vascular, más néven SMA, γ -enteral), és két cytoplasmaticus típust (β , γ -actin) (Vandekerckhove és mtsai 1981). A különböző izoformák eltérő tulajdonságokkal rendelkeznek. Az egészséges felnőtt szervezetben az SMA a vascularis simaizomban és a myoepithelsejtekben van jelen (Gabbiani és mtsai 1981). Az SMA megjelenik a stresszrostokban, s ezáltal a többi actintípushoz viszonyítva nagyobb erő kifejtésére képes rostok jönnék létre (Follonier Castella L 2010, Hinz 2010). Az SMA-expressziót több különböző faktor szabályozza, amelyek közül az FGF-2, angiotensin-II, TGF- β 1 növeli, míg a PDGF-BB, EGF gátolja. Az SMA-promoter több, erősen konzervált szabályozó régiót tartalmaz. Egy TATA-box mellett CARG-A, CARG-B, CARG-C domént írtak le, két E-boxszal együtt, melyek az első exonhoz közel helyezkednek el. E domének mutációja simaizomsejtekben a promoter-aktivitás csökkenését eredményezi (Shimizu és mtsai 1995). A TATA-boxhoz közel egy TGF- β 1 control element (TCE) helyezkedik el (Martina B. Hautmann 1997). Ennek jelentőségét az mutatja, hogy patkány aorta simaizomsejtjeinek TCE-régióban mutáns SMA-promotere nem reagált TGF- β 1-kezelésre. Az SMA promoterben ezeken kívül leírtak Smad binding element (SBE) régiókat, melyek közül az egyik mutációja az SMA-

promoter aktivitását szignifikánsan csökkentette (Hu és mtsai 2003).

Az SMA-promoter aktivátorai közé tartozik többek között a serum response factor (SRF) (Kim JH 1993, Kim JH 1994), az SMA két SRE-szakaszt (Serum response element) is tartalmaz. A Rho az SMA-expressziót SRF-függően szabályozza (Masszi és mtsai 2003). Aktivátor még a Smad-2,3, a myocardin related transcription factor A és B (MRTF-A, MRTF-B). Ezek a Rho-actin-szignalizáció közvetítői. Az SRF és az MRTF-A komplexe CArG doménekhez köt, és erősíti az SRE hatását (Hinz és mtsai 2012).

Más faktorok visszaszorítják az SMA-expressziót, így pl. a Kruppel-like factor 4, mely versenghet a TCE-régió aktivátoraival, illetve interakcióba léphet a Smad3 Mad homology 2 (MH-2) doménjével. A myofibroblastok differenciációjában a Smad-útvonalon kívül szerepet játszanak mitogen-aktivált proteinkinázok (MAP), valamint Wnt, és Notch szignáltranszdukciós útvonalak.

A TGF- β 1 EMT-t kiváltó hatását már évtizedekkel korábban felismerték (Miettinen mtsai 1994), a kezelés hatására az epithelsejtek alakja megváltozott, ezzel párhuzamosan az epithelmarkerek visszaszorultak, a mesenchymalis markerek pedig megjelentek a sejteken, az actinrostok átrendeződtek.

A transzformáló növekedési faktor béta szupercsaládban több mint 35 féle fehérje ismert. Idetartozik – többek között – a TGF β 1, TGF β 2, TGF β 3, az activin, inhibin, bone morphogenic protein (BMP), growth differentiation factor (GDF) és az anti Müllerian hormon (AMH) (Piek és mtsai 1999). A TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3 isoformák szoros hasonlóságot mutatnak.

A TGF- β jelátvitel hatása széleskörű, így sejtípustól függően gátolhatja/serkentheti azok proliferációját, szabályozza az extracelluláris matrix termelődését, a szervezet immunválaszát, befolyásolhatja az apoptosist (Piek mtsai 1999).

A TGF- β ligand homodimer, prekursor formában szintetizálódik, és az ún. Latency Associated Peptidhez (LAP) kötődik. Ehhez a komplexhez a szekréció előtt még egy fehérje, a Latent TGF- β binding protein (LTBP) kapcsolódik (Miyazono és mtsai 1991). A szekréciót követően a pro-peptid és az LTBP az extracelluláris mátrix (ECM) elemeihez kötődve tárolódik, s így nem kötődik receptoraihoz (ten Dijke és mtsai 2007).

A TGF- β szupercsalád receptorait két fő csoportba oszthatjuk, a TGF és BMP receptorokéba.

A TGF családkhoz háromféle receptor tartozik (TGF β RI, TGF β RII, TGF β RIII), melyből az I-es és II-es típusú receptorok transzmembrán szerin-treonin kináz típusú receptorok, a III-as típus egy transzmembrán proteoglikán, aminek nincs intrinsic aktivitása, valószínűleg a TGF- β lokális koncentrációját növeli, s ezáltal segíti kötődését a II-es típusú receptorhoz. A kötődést követően a TGF β RII a TGF β RI-gyel heteromer komplexet hoz létre, ami a sejten belül különböző intracellularis folyamatokat indít el.

A sejten belüli, TGF- β által kiváltott jelátvitel egyik útvonala a Smad-fehérjéken át vezet. A Smad elnevezése az SMA és MAD fehérjékhez való hasonlóságból származik. Három csoportba oszthatók: a receptor szabályozott Smadok közé az 1,2,3,5,8-as altípusok tartoznak, a „közös” (Co-Smad) típus a 4-es, a gátló Smadok családja pedig a 6,7-es altípusból áll (Shi és mtsai 2003).

Az R-Smadok és a Co-Smad tartalmaznak egy konzervált MH1 (Mad-homolgy-1) domaint, valamint egy C-terminális MH2 (Mad-homolgy-2) domaint, ezek egy „linker”-rel kapcsolódnak egymáshoz (Liu és mtsai 1996). A C-terminális domain a heterológ DNS-kötő domainhez való kötődést követően elősegíti a transzkripció aktivitást. Az I-Smadok kizárólag az MH2 régiót tartalmazzák. Az MH1 domain képes a DNS-hez való kötődésre, a Smad3 és Smad4 fehérjék ezzel tudnak a DNS SBE (SMAD-binding elements) szakaszaihoz kapcsolódni. Az I-Smadok az MH2 régióval kötődnek a TGF β RI-hez, ezáltal versengenek az R-Smadokkal, gátolják a foszforilációt.

A TGF β RI felismeri és foszforilálja a hatást közvetítő Smad-fehérjéket, az R-Smad-kötés a TGF β RI-hez a cink dupla ujj FYVE domaint tartalmazó SARA (SMAD Anchor for Receptor Activation) segítségével valósul meg (Tsukazaki és mtsai 1998). Az aktivációt követően az R-Smad proteinek kötődnek egymáshoz, valamint a Smad4-hez, s az így kialakult komplex transzlokálódik a nucleusba.

A nucleusban a Smurf1 (SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 1) az R-Smadok ubiquitinációjával, degradációjával inaktiválja azokat (Zhu és mtsai 1999), a Smurf2, – valamint a Smurf1, BMP-Smad specifikusan – pedig a Smad7 nucleusból történő

exportjával az I-Smad inhibitorikus hatást segíti elő, ami így a TGF β receptorok degradációjában vehet részt (Kavsak és mtsai 2000).

A fenti hatásokon kívül a TGF β -szignalizáció közvetett módon részt vehet apoptotikus folyamatokban, epithelialis mesenchymalis transitióban, sejtmigrációban, ECM-kialakításban. A MAPK (mitogen-activated protein kinase) útvonal több ágát is aktiválhatja, így az ERK1/ERK2-t, JNK/p38 (Jun-N terminal kinase) és a phosphoinositide 3-kinázt (Andrei V. Bakin 2002). A JNK-aktivációt mind Smad dependens, mind pedig ettől független módon észlelték (Engel és mtsai 1999). Egéremlő-epithelsejtekben (NMuMG; Normal murine mammary gland) megfigyelték a mutáns TGF β RI Smad független p38 aktiválását (Yu és mtsai 2002). Szintén a TGF β nem Smad dependens hatásai közé tartozik a kis GTP-kötő fehérjék jelátvittele (Bhowmick és mtsai 2001, Edlund és mtsai 2002) és a NF- κ B és a Wnt / β -catenin útvonal befolyásolása is (Gingery és mtsai 2008).

I.2. Vesefibrosis

A krónikus vesebetegség (Chronic kidney disease, CKD) globális, illetve Egyesült államokbeli prevalenciája 13% (Thomas és mtsai 2008, Hill és mtsai 2016). A kiváltó októl, és a háttérben álló betegség(ek)től függetlenül a CKD legfontosabb jellemzője a progresszív vesefibrosis. A primer vesebetegségek (krónikus glomerulonephritis, policisztás vesebetegség) mellett a járványszerűen növekvő gyakoriságú hipertónia és diabetes a CKD két vezető oka.

A CKD hosszútávon végállapotú vesebetegséghez (ESRD) vezet(het), mely vesepótló kezelést, szervátültetést tehet szükségessé. Tekintve a betegség súlyosságát, valamint gyakori előfordulását, modellezése fontos a jobb megértéshez.

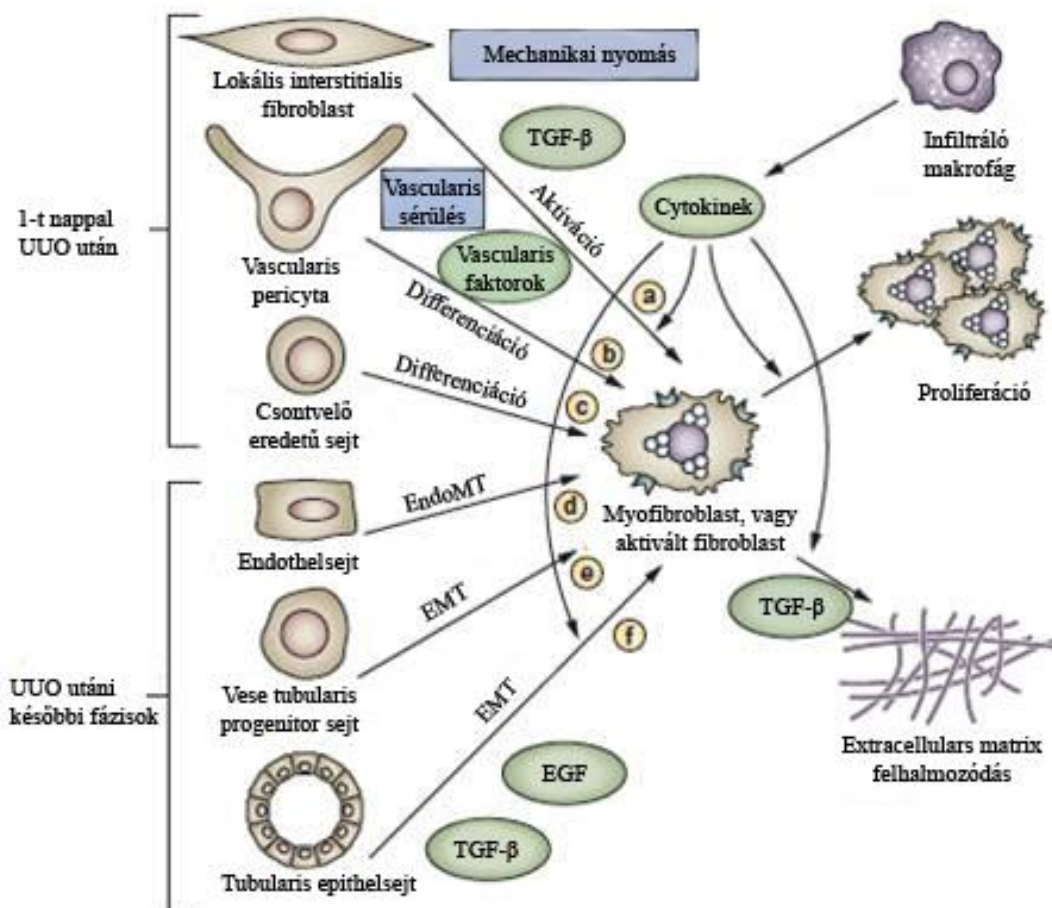
Szövetteni jellemzőit tekintve a krónikus vesebetegség tubulointerstitialis fibrosissal jár, a tubulusok mellett a glomerulusok és a kapillárisálózat is sérül (Zeisberg és mtsai 2010). A vesét károsító elemek több lépésben okozzák annak fibrosisát (Fogo 2007). A nefronok kezdetben adaptív, majd az ismételt noxáknak köszönhetően maladaptív válasza csökkenti a nefronok számát. Ez fokozza az Ang-II termelődést, ezen keresztül a TGF- β 1-expressziót, ami a tubulus sejtek hiperplasiájához vezet, felszaporodik a IV-es típusú kollagén (Wolf és mtsai 1996, Wolf és mtsai 1999).

A vese fibrogenesise során klasszikusan három lépést különíthetünk el (Zeisberg és mtsai

2001). Az indukciós fázisában fibrosis irányában ható citokinek termelődnek a tubulus sejteiben, s a nyugalomban lévő fibroblastok aktiválódnak. A gyulladásos szakaszban a fibrosist elősegítő citokinek termelődése folytatódik, extracelluláris matrix termelődik. A gyulladást kiváltó noxa megszűnését követően a fibroblast proliferáció, EMT jellemző. A tubulointerstitialis fibrosis effektor sejtjei a myofibroblastok.

I.3. Myofibroblastok

A vese fibrogenesisében fontos szerepet játszanak a myofibroblastok. Ezek legfontosabb markeréről, az SMA-ról a korábbiakban részletesen szóltam, ezenkívül az ilyen típusú sejtekre a vimentin, desmin filamentumok jelenléte is jellemző. Az interstitialis myofibroblastok száma pozitív korrelációt mutatott a vesefibrosis súlyosságával, valamint a veseelégtelenség kialakulásának gyorsaságával (Qi és mtsai 2006).



1. ábra: A myofibroblastok eredete (Grande és mtsai 2009)

Az utóbbi években számos hipotézis alakult ki a myofibroblastok eredetével kapcsolatban. A legelső adat a vesében fellépő EMT-t igazolva a Fibroblast Specific Protein 1 (FSP1) vesében történő expressziójának jellemzésekor jelent meg. Strutz és munkatársai megfigyelték, hogy az ép vesében látottaktól eltérően vesefibrosis során jelentős FSP1-expresszió jelenhet meg a vesetubulusokban. Ezért úgy gondolták, hogy szükség esetén a tubularis epithelium átalakulása révén fibroblastok keletkezhetnek (Strutz és mtsai 1995). E folyamatot később a vesetubulusok EMT-jeként jellemezték az irodalomban és megállapították, hogy tubulointerstitialis fibrosis során a myofibroblastok akár 40%-a is epithelsejtekből alakulhat ki (Iwano és mtsai 2002). Később az endothel származású myofibroblastok számát is 40%-nyira becsülték (Zeisberg mtsai 2008). További kutatások megállapították, hogy myofibroblastok számos további sejtől is kialakulhatnak (Grande mtsai 2009), ezáltal valamelyest csökkenni látszott az EMT jelentősége vesefibrosis során (1. ábra).

Legutóbb a sejtek eredetét egy lineage tracking módszer segítségével vizsgálva megállapították, hogy a myofibroblastok kb. 50%-a származott a nyugvó fibroblastokból, 35%-uk csontvelő eredetű, 10%-uk EndMT-vel, 5% pedig EMT-vel alakult át (LeBleu mtsai 2013).

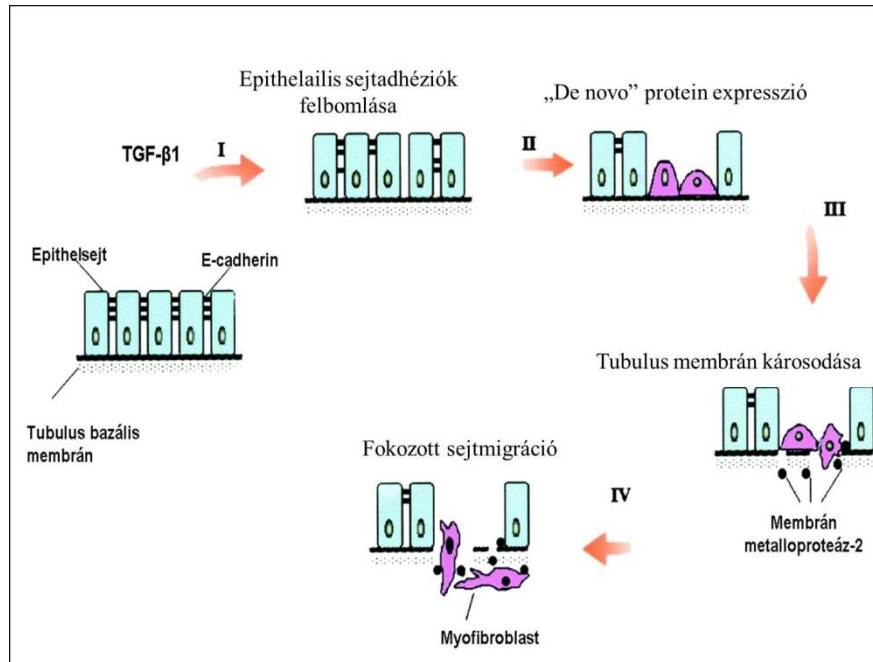
Egy további kísérletes munkában megfigyelték, hogy az EMT szerepe túlmutathat a myofibroblastos-átalakulás lehetőségén is. Grand és mtsai állatkísérletes modelljében a vese -epithelsejtek (részleges) EMT-je a myofibroblastok közvetlen kialakításában ugyan nem vett részt, de szignalizációjuk az interstitiumban segítette az egyéb forrásból származó myofibroblastok létrejöttét, valamint a fibrosis és a gyulladás fenntartását (Grande és mtsai 2015). A Snail1 fontos szabályozó szerepet tölt be ezekben a folyamatokban. A Snail1 expressziója a felnőtt, egészséges vese-epithelsejtekben downregulált (Boutet és mtsai 2006), különböző sérülések hatására azonban reaktiválódhat, fibrosist indukál. A Snail1-re többféle faktor hat, a fibrosis szempontjából a legfontosabb ezek közül a TGF- β 1. A Snail1 aktiváció fenntartja a gyulladásos választ, pozitív visszacsatolással hat a TGF- β 1-ra is. A Snail1 gátlása *in vivo* kísérletekben a vesefunkció és -morfológia részleges visszaállítását eredményezte (Grande mtsai 2015). A részleges EMT vesefibrosisban betöltött szerepét látszik igazolni egy további kutatás,

amelyben megállapították, hogy a vese fibrosisos elváltozásai során az EMT G2 fázisban sejtciklusgátlást idéz elő. Ez a mechanizmus jelentősen gátolja az epithelsejtek javító és regenerációs képességeit, aminek háttérében lép fel a fibrosist támogató képességük. A leírt folyamat TWIST- és Snail-függő módon következik be a sejtekben (Lovisa és mtsai 2015). A Twist egy helix-loop-helix típusú transzkripciós faktor, mely a sejtvonalak kialakulásában, majd patológiás állapotokban a tumorigenesisben, fibrosiban aktiválódhat (Nieto 2002).

Az akut károsodást követően a vese epithelissetjeinek funkciója helyreállhat. Ebben a dedifferenciációs folyamatban a sejtplaszticitás egy kevésbé epithel jellegű eredményez, a sejtek bizonyos mesenchymalis tulajdonságokat vesznek fel (ezt az állapotot a vimentin expresszió jellemzi), egyfajta „hibrid” állapotba kerülnek (De Chiara és mtsai 2016). Ennek értelmében a vesetubulusok normál repair mechanizmusa az akut vesekárosodást követően egy folyamatos epithel-mesenchymalis-epithel ciklus, amit az epithelsejtek dedifferenciációja majd re-differenciációja jellemez, s ami elősegíti a vese gyógyulását (Ishibe és mtsai 2008). A szöveti fibrosis egy jól kiegyensúlyozott, védő mechanizmusból alakul ki, abban az esetben, ha a sérülésre adott válasz már nem korlátozott. Az ismétlődő szöveti károsodás a gyógyulási folyamat szabályozásának elvesztéséhez, és krónikus vesebetegséghez vezet (Schnaper 2017).

Az EMT tehát különböző mechanizmusok révén vesz részt a vesefibrosis, valamint a TIF létrejöttében. Így például a myofibroblastok kialakulhatnak közvetlenül EMT útján, de az EMT – vagy részleges EMT – során az átalakuló epithelsejtek egyéb sejtpopulációk myofibroblasztikus átalakulását is képesek szabályozni. Végül egy harmadik mechanizmust jelent a finomhangolt repair és regenerációs folyamatok eltérítése profibrotikus irányba.

A klasszikus megfigyelés szerint a tubulus epithelsejtek EMT-je TGF- β hatására indulhat el, majd szigorúan meghatározott sorrendben zajlik, amelynek során négy lépést különíthetünk el. Ennek megfelelően: 1. Az epithelsejtek adhéziójának felbomlása. 2. *De novo* SMA-expresszió, actin-reorganizáció. 3. A tubulus basalis membránjának felbomlása. 4. A károsodott basalmembránon keresztüli sejtmigráció (2. ábra).



2. ábra: Az epithelialis-mesenchymalis transitio folyamata (Yang és mtsai 2001).

A közelmúltban több kísérleti adat is született arra vonatkozóan, hogy a vese epithelsejtjei különböző noxák hatására csak parciális EMT-t „sz szenvednek el”. Grande és mtsai megfigyelései szerint (Grande mtsai 2015) a tubulus epithelsejtek nem veszítették el integritásukat, részleges EMT-n mentek keresztül, és hozzájárultak a fibrosis progressziójához. Lovisa és mtsai igazolták, hogy vesefibrosisban az epithelsejtek sejtciklusában p21 mediáltan a G2 fázisban elakadás jön létre, ez a transzporter gének depléciójához vezet. A sejtek funkciójukban károsodnak, képtelenek a regenerációra, ezáltal elősegítik a krónikus fibrózis kialakulását. Ezekben a folyamatokban a Snail1 és a Twist-fehérjék központi szerepe is igazolódott.

I.4. Kísérletes munkám közvetlen előzményei

I.4.1. A TGF-β1 hatása proximalis tubularis epithelsejteken

Munkacsoportunk korábbi kísérletei során (Masszi mtsai 2003) az EMT és a myofibroblastok eredetének vizsgálatához tubularis epithelsejtes modellt használt. Az in vitro kísérletes sejtmodellben sertés proximalis tubularis epithelsejteken történtek a kísérletek (LLC-PK1; Lilly Laboratories Cell - Porcine Kidney 1). A TGF-β1 EMT-t

indukáló hatását az SMA-expresszió mértékével vizsgáltuk. A kontrollsejtek szigetszerűen helyezkedtek el, az egyes sejtek poligonálisak voltak, és szorosan kapcsolódtak szomszédjaikhoz. TGF- β 1-kezelés hatására már 24 óra után morfológiai változások következtek be, melyek 72 óra elteltével a sejtek 80%-án megfigyelhetőek voltak. A sejtek megnyúltak, kötőszövetes jellegűvé váltak, fibroblasthoz hasonló morfológiai képet mutattak, valamint sok egymással szomszédos sejt között megszűnt a közvetlen kontaktus is. A sejtkapcsolatok reorganizációjának megjelenítésére a ZO-1-et, E-cadherint, és β -catenint immunjelöléssel vizsgáltuk. Míg a ZO-1 a kontrollsejtekben a sejthatárok mentén mutatott éles jelölődést, az a TGF- β 1 kezelés után a jelölődés a periférián egyenetlenné vált, illetve pálcaszerűen, a sejtmembránra merőlegesen akkumulálódott. A TGF- β 1-hatásra a β -catenin a membránból a cytosolba, nucleusba került, míg az E-cadherin a kezelés mellett szinte teljesen eltűnt.

A TGF- β 1-kezelés cytoskeletalis reorganizációt is eredményezett. A kontrollsejtek perifériáján markáns F-actin-gyűrű volt megfigyelhető vékony centrális stresszrostokkal. A kezelés hatására a marginális F-actin mennyisége csökkent, a centrális stresszrostok vastagabbá váltak. A TGF- β 1-ről leírták, hogy endothelsejtekben a reorganizáció során az MLC-t foszforilációval aktiválja, ezt LLC-PK1-sejtekben vizsgálták, s a következőt találták: az MLC a kontrollsejtekben enyhe háttér-, és nukleáris festést adott. Western blottal is alátámasztották, hogy a TGF- β 1-kezelés hatására megnőtt a foszforilált formák mennyisége.

A mesenchymalis átalakulás motilis fenotípushoz vezet. Ennek vizsgálatában a cortactin a cytoskeletalis-dinamika és az actin alapú motilitás egy szenzitív markere. Kontroll- és TGF- β 1-kezelt sejtek cortactinjelölődését vizsgálták: A kezelt sejtek cortactineloszlása a kontrollhoz képest erősen polarizálttá vált, sok sejtben lamellopodiumok alakultak ki.

Az SMA-expresszió a myofibroblastok jelenlétének egyik markere. A TGF- β 1 hatása e marker megjelenésére: míg a kontrollsejtekben nem volt megfigyelhető, a háromnapos kezelés jelentős SMA-expressziót eredményezett, ami a hatodik napra még tovább nőtt. Immunjelöléssel a kontrollsejteken gyenge háttérjelölődés volt megfigyelhető, míg TGF- β 1-hatásra a sejtek ~60%-ában erőteljes jelölődés mutatkozott. Az újonnan szintetizálódott SMA vastag rostokként volt megfigyelhető. Ezt alátámasztotta, hogy 756 bázispár hosszúságú patkány SMA-promoter (tranzien) transzfekciója után a 24 órás TGF- β 1-kezelés az SMA-promoter aktivitásának 3-6-szoros növekedését eredményezte.

I.4.2. A „kettős sérülés” modell

A továbbiakban kutatócsoportunk azt vizsgálta, hogy a sejtkapcsolatok milyen szerepet töltenek be az EMT szabályozásában. Tubularis epithelsejtekben a konfluencia mértékétől függetlenül SMA fehérje nem volt kimutatható, míg TGF- β 1-gyel kezelt epithelsejtekben 50%-ában SMA-pozitív jelölődés volt kimutatható 30%-os konfluencia esetén. Teljesen konfluens sejtkultúrában TGF- β 1-kezelés hatására sem volt kimutatható SMA-fehérjeexpresszió immunhisztokémiai és Western blot technikákkal. Szintén Western blot-analízissel az előbbieknél megfelelően 100%-os konfluencia és TGF- β 1-kezelés után az epithel marker E-cadherin fehérjeexpressziója sem csökkent. Ezek az eredmények jelezték, hogy a sejtek denzitása befolyásolja a TGF- β 1 mesenchymalis transitiót eredményező hatásait.

Annak meghatározására, hogy a TGF- β 1 mesenchymalis transitiót kiváltó hatásához szükséges-e a sejt-sejt közötti kapcsolatok hiánya, két modellt használtunk. Az első modellben az egyébként konfluens, egyrétegű sejttenyészetet mechanikai sebzést ejtettünk. A konfluens sejtcsoport részletekben nem jött létre SMA-expresszió, azonban a TGF- β 1-kezelés SMA-termelődést váltott ki az epithelsejtekben. Ez az SMA-expresszió csak a sebzés szélén jelent meg, olyan sejteken, melyek – részben – elvesztették kapcsolatukat a szomszédos sejtekkel. A második modellben az extracelluláris Ca^{2+} csökkenést alkalmaztuk, amely ismert eljárás a cadherineknél kapcsolatainak megszüntetésére. Ez önmagában nem okozott SMA-expressziót, bár az E-cadherin kifejeződését némileg csökkentette. A Ca^{2+} hiányában alkalmazott TGF- β 1-kezelés SMA-expresszióhoz és az E-cadherin teljes eltűnéséhez vezetett.

A β -cateninnek mint az adherens kapcsolatok egyik alkotójának és mint transzkripciós koaktivátornak kettős szerepe van. Korábbi kísérletekben kimutatták, hogy a TGF- β 1 β -catenin dependens transzkripciót indukál, melynek mértéke az intercelluláris kapcsolatok állapotától függ. Egyrétegű hámsejtkultúrában TGF- β 1-kezelés hatására a β -catenin és E-cadherin fehérjeexpressziója nem változott. Ca^{2+} -megvonást követően az E-cadherin-szint drámaian csökkent, és a β -catenin-expresszió is alacsonyabb volt. Ha a sejteket Ca^{2+} -mentes médiumban tenyésztették, a TGF- β 1 nem hatott az E-cadherin-degradációra, azonban a β -catenin-csökkenést erősen mérsékelte. További vizsgálatok során igazolást

nyert az is, hogy a β -catenin szerepet játszik az SMA-promoter-aktivációban, fehérjeexpresszióban.

Ezeknek az eredményeknek az alapján alakult ki az EMT „kettős sérülés” modellje, amely szerint az EMT folyamatához két lépés vezet: elsőként az epithelsejtek integritásának csökkenése szükséges (első sérülés), amelynek hátterében pl. mechanikai ártalom, immunkomplex lerakódás, hypoxia állhat. A károsodott helyeken a TGF- β 1-hatás (második sérülés) fokálisan EMT-t indukál, ez fokozott TGF- β 1- és ECM-termelődést eredményez, ami a környező területek károsításával és az EMT kiterjedésével járhat.

I.4.3. Szignalizációs útvonalak

A TGF- β 1-szignalizáció egy része a sejten belül a Smad fehérjecsaládon keresztül történik. Ezt vizsgálva bebizonyosodott, hogy a TGF-kezelés Smad-foszforilációt vált ki, és az aktiváló hatású Smad2 és 3 szerepet játszik az SMA-promoter-expresszió szabályozásában. A TGF- β 1 SMA-promoter aktiváló hatását a DN-Smad 3 és a Smad7 is gátolta.

Az SRF döntően befolyásolja az SMA-expressziót, és aktivitása a nukleáris-cytoplasmaticus áthelyeződéstől függ. Ezért azt vizsgálták, hogy a setjkapcsolatok károsodása befolyásolja-e az SRF-lokalizációt. A konfluens kultúrákban hangsúlyos volt az SRF nukleáris kimutathatósága, s míg a konfluencia növekedésével ez csökkent, addig az SRF mennyisége a cytosolban ezzel párhuzamosan nőtt. Azonban az SRF mennyisége a sejtmagban jellemzően nagyobb volt a cytosolhoz viszonyítva. Ca^{2+} -megvonás hatására az SRF mennyisége nőtt a nucleusban, ez immuncitokémiai vizsgálattal és Western blottal is detektálható volt.

Az SRF működését szabályozó fehérjék vizsgálata után, az SMA-expresszió további befolyásoló tényezői után kutatva az SRF kofaktorát, az MRTF-t vizsgáltuk. LLCPK-1 sejtekben az endogén MRTF-A kizárólag a cytosolban helyezkedett el, Ca^{2+} -megvonás után egy órával megjelent a nucleusban, 24 órával később pedig a sejtek 16%-ában csak a sejtmagban volt jelen, 74%-ban a nucleusban és a cytosolban hasonló mértékben, 10%-uk pedig csak a cytosolban mutatott jelölődést. Ez felvetette annak lehetőségét, hogy a TGF- β 1 EMT-t indukáló hatása függ a kontaktus-dependens MRTF-lokalizációtól. Konfluens kultúrában TGF- β 1-kezelés hatására az MRTF lokalizációja nem változott,

néhány esetben perinukleáris jelölődés volt megfigyelhető. Szubkonfluens kultúrában a sejtszigetek szélén lévő sejtek 75%-ában volt MRTF-jelölődés a cytosolban, 17%-ukban nukleáris, míg 8%-ukban párhuzamosan nukleáris és cytosol jelölődés látszott. TGF- β 1-kezelés hatására a szabad széleken levő sejtek 6 óra után 95%-ban erős nukleáris jelölődést mutattak, a szigetek közepén az MRTF továbbra is a cytosolban helyezkedett el. 24 órával a kezelés után azonban csak a sejtek negyedénél volt tapasztalható tisztán nukleáris MRTF-jelölődés, további 12%-ban egyenlő arányú, vagy perinukleáris jelölődés látszott. Ha a Ca^{2+} -megvonást és a TGF- β 1-kezelést kombinálták, az MRTF nukleáris transzlokációja majdnem minden sejtben megfigyelhető volt. Egy további kísérletben a konfluens sejtek mechanikai sértése a sebzés környékén lévő sejtekben az MRTF nukleáris felhalmozódását eredményezte. A sebzéstől távolodva a sejtek egyre kevésbé mutattak nukleáris MRTF-jelölődést.

Ezek után az MRTF és az SMA közötti kapcsolatot vizsgáltuk; a sejteket MRTF-A-val és MRTF-B-vel transzfektáltuk. Ez az SMA-promoter aktivitásának nagymértékű növekedéséhez vezetett, ami az MRTF-A esetében jelentősebbnek bizonyult. Az SMA-promoteraktivitás-növekedését követően az epithelsejtekben az SMA fehérje mennyiségének növekedése is kimutatható volt, ezt Western blot és immunfluoreszcens vizsgálat segítségével detektáltuk. Annak bizonyítására, hogy az MRTF-nek elengedhetetlen szerepe van a sejtkepcsolat-sérüléstől és TGF- β 1-hatástól függő SMA-promoter-válaszban, a sejteket egy domináns negatív mutáns myocardinnal transzfektálták (DN-MyoC). A DN-MyoC elsősorban a sejtmagban volt kimutatható, de a cytosolban is jelen volt. A DN-MyoC expressziója kivédte a Ca^{2+} -megvonás okozta promoteraktivitás-növekedést, és erősen csökkentette a szinergista módon ható kontaktusszétesés és TGF- β 1 okozta SMA-promoteraktivitás-növekedést.

Az MRTF nukleáris transzlokációját számos szignálmolekula szabályozza. Így MRTF nukleáris transzlokációt okoznak a RhoA, Rac1, Cdc42 kis G fehérjék, ezek effektorai (ROK illetve PAK), továbbá a p38, MLC, stb.

I.5. A Myocardin Related Transcription Factors (MRTFs) általános jellemzése és szerepe EMT során

A myocardin az SRF egy hatékony transzkripciós kofaktora, ami szívizom és simaizomsejtekben expresszálódik (Wang és mtsai 2001).

A transzkripciós faktorok e családjának a myocardin mellett két újabb tagját is leírták, a Myocardin Related Transcription Factor A-t és B-t (MRTF-A és MRTF-B), amelyeket az irodalom Megakaryocytic Acute Leukemia (MAL), BSAC (composed of N-terminal basic, SAP, and coiled-coil domains), illetve Megakaryoblastic Leukaemia 1 és 2 (MKL1 és MKL2) 1-2 néven is ismer. A myocardinnal ellentétben az MRTF-A és -B számos embrionális és felnőtt típusú sejtben jelen van, és hasonlóan a myocardinhoz, mindkét fehérje erősen stimulálja az SRF transzkripciós aktivitását (Wang és mtsai 2002, Du és mtsai 2004).

Az SRF a Serum Response Element-eknek (SRE) nevezett konszenzus DNS szakaszokhoz való kötődésen keresztül fejti ki hatását. Az SRE-k CArG domáineket tartalmaznak, amiket több szignálmolekula, transzkripciós faktor, proliferációt, migrációt, cytoskeletonot és izomdifferenciációt befolyásoló génszakasz promoter régiójában leírtak. Microarray és genomszintű vizsgálatok alapján több mint 150 SRF „target” gén azonosítható (Selvaraj és mtsai 2004, Sun és mtsai 2006).

A RhoA közvetített actin cytoskeleton reorganizáció (a globuláris „G” actin csökkenése és a filamentózus „F” actin polimerizációja) és SRF párhuzamos aktivációja korábban is ismert volt. A RhoA és MRTF közötti kapcsolat azonban nem teljesen tisztázott, de az ismert, hogy az SRF transzkripciós aktivitásának befolyásolói a Ternary Complex Factor család tagjai (Elk-1, Sap-1, Net), illetve az MRTF-ek.

A myocardin/MKL géncsalád tagjai több, erősen konzervált génszakaszt tartalmaznak, így az N-terminális domaint (NTD), ami három RPEL-motívumot (RPxxxEL) tartalmaz, a basic doméneket (B1 és B2), egy glutamin-gazdag szakaszt (Q-box), egy SAP-domaint, egy coiled-coil-leucin cipzár-like régiót (LZ) és egy transcription activation domént (TAD).

A RPEL-domainek az actin-MRTF-kötődés és a Rho szignalizációjához szükségesek (Miralles F 2003). A B1 és B2 régió az MRTF sejtmagon belüli felhalmozásához szükséges. A B1 régió az SRF-kötődésben kulcsfontosságú. A Q-box erősíti az MRTF-SRF-kapcsolatot, valamint az MRTF cytoplasmában való visszatartásáért/nucleusból történő exportjáért felelős. Az SAP szakasz több sejtmagban lévő fehérjében van jelen, a sejtmag és a kromoszomális állomány szerveződésben vesz részt (L. Aravind 2000). Az MRTF képes kötődni a DNS-hez, mely kapcsolat megkönnyíti az MRTF-SRF komplex kialakulását (Zaromytidou és mtsai 2006). Az LZ-domain a myocardin család tagjainak homo/heterodimer képzéséhez szükséges (Selvaraj és mtsai 2003). A TAD-domain általános szerepet tölt be a transzkripció aktivációjában.

A sejtekben nyugalmi helyzetben az MRTF a G-actinhoz kapcsolódva elkülönül a cytoplasmában, mely kötések a RPEL-motívumok szabályozzák. Az MRTF-G-actin komplex a citoplazmában van, az actinpolimerizációt követően azonban az MRTF disszociál és transzlokálódhat (Miralles F 2003, Posern és mtsai 2004). A Rho két útvonalon is befolyásolja ezt, egyrészt a formin-fehérjék révén az actinpolimerizáció serkentésével (Copeland és mtsai 2002), másrészt a Lin-11, Isl-1 és Mec-3-kinase (LIMK)-cofilin útvonalon az F-actin felbontás csökkentésével. Az MRTF- és a G-actin szétválása felfed egy nukleáris lokalizációs szignált a RPEL-motívumon belül, ami az importin α/β szabályozott nukleáris transzportozáshoz szükséges (Pawlowski és mtsai 2010). Szérumhiányos környezetben a fibroblastokban az MRTF döntően a cytoplasmában helyezkedik el, szérum hozzáadásával gyors nukleáris transzlokáció figyelhető meg. A fenti mechanizmusokon kívül az MRTF nukleáris áthelyeződését egy izomspecifikus actin-kötő fehérje, a Striated Muscle Activator of Rho Signaling (STARS) is indukálhatja, ezzel aktiválva az SRF-t (Kuwahara és mtsai 2005).

A sejtmagon belüli actinhálózat dinamikus változása döntően befolyásolja az MRTF elhelyezkedését, aktivációját.

A nucleusban az MRTF a sejtmagi actinhoz kötődik, és az MRTF-SRF-target-gének kötése inaktív marad mindaddig, amíg az MRTF-actin kapcsolat fennáll. Az MRTF-actin kapcsolat felbomlását követően a G-actin és az MRTF kiürül a sejtmagból (Vartiainen és mtsai 2007). A szérumban található komplex fehérjék által kiváltott sejttstimulációs hatás következtében nő az actinfilamentumok száma a sejtmagban, és formin dependens

módon segíti az MRTF-SRF-aktivációt (Baarlink és mtsai 2013). A G-actin mennyiségét redox-dependens actin depolimerizációval a MICAL-2 (Microtubule associated monooxygenase, calponin and LIM domain containing 2) fehérje is (Lundquist és mtsai 2014) csökkentheti.

Az MRTF-ek sokféle fejlődéstani, fiziológiás folyamatban játszanak fontos szerepet. Az MRTF-ek szükségesek a harántcsíkolt izmok fejlődéséhez, a sarcomerek elrendeződéséhez, myoblastképződéshez (Cenik és mtsai 2016), elengedhetetlenek a kardiovaszkuláris rendszer fejlődésében és működésében (Mokalled és mtsai 2015). Az MRTF-ek jelenléte a vérképző rendszer több vonalához is szükséges, így a haematopoetikus őssejtek kialakításához (Costello és mtsai 2015), a megakaryocitákéréséhez, vérelemek kialakulásához (Smith és mtsai 2012). Az MRTF-A a lymphoid és myeloid sejtvonal megfelelő működéséhez is nélkülözhetetlen (Record és mtsai 2015). Emellett az MRTF-ek a neuronális migrációt, fejlődést is szabályozzák, valamint az MRTF-A elősegíti az idegsejtek túlélését a hypoxia/ischaemia okozta apoptosis során (Mokalled és mtsai 2010, Cao és mtsai 2011). A sebzésre adott válaszreakció, sebgyógyulás, gyulladásos válasz csökkentése is MRTF-szignalizációt indít el (Velasquez és mtsai 2013).

Az MRTF-A szabályozza a coronariaproliferációt, pericytatoborzást, egyes modellekben elősegíti a neovaszkularizációt (Hinkel és mtsai 2014), szükséges az emlő myoepithelsejtjeinek fejlődéséhez, a terhesség alatti átalakulásukhoz és a laktáció fenntartásához (Li és mtsai 2006, Sun mtsai 2006).

Az MRTF-ek az egészséges fejlődés, működés mellett a különböző patológiás állapotokban is központi szerepet tölthetnek be.

Idős egerek izomzatában az MRTF-A-expresszió csökkent, a kor előrehaladtával csökkenő MRTF-A szint muscularis atrophíát eredményezhet (Sakuma és mtsai 2008), ami inaktivitás következménye is lehet (Collard és mtsai 2014).

Szintén egérmodellben a szem endothelsejtjeinek csökkent MRTF-szintje hypovascularizációt (Weinl és mtsai 2013) okozott, emellett elősegítette vérzéses stroke kialakulását (Weinl és mtsai 2015).

Szívelégtelenségben, szívizom hypertrophiában a STARS-fehérje-mennyiség nő, ami ezt

követően a szívizomban az MRTF-A transzlokációjával káros remodellinghez vezet (Kuwahara és mtsai 2007).

Kutatócsoportunk egyik fő vizsgálati területe a fibrosis, mely folyamatokban az MRTF-ek főszerepet játszanak. A fibrosis folyamata valamennyi szervrendszerben kimutatható patológias folyamatokban.

Az MRTF-SRF szabályozott gének expressziója fokozott volt olyan betegek bőréből származó fibroblastokban, akik a scleroderma cutan formájában szenvedtek, az MRTF-ek befolyásolták a bőr vastagságát, a kollagénfelhalmozódást (Haak és mtsai 2014).

Májfibrosisban az MRTF-A overexpressziója növelte, míg depléciója csökkentette a TGF- β okozta transzkripciót (Tian és mtsai 2016), ezen kívül az MRTF-A fibrosist szabályozó szerepét diabeteses nephropathiában is megfigyelték (Xu és mtsai 2015).

Az MRTF-A egérmodellben a pulmonaris fibrosis szabályozásában is részt vett (Rahaman és mtsai 2014), az MRTF szignalizáció gátlása csökkentette a tüdőben kialakuló fibrosis súlyosságát, gátolva a myofibroblast differenciációt, és elősegítve a mesenchymalis sejtek apoptosist (Sisson és mtsai 2015).

A szívizomzat infarktust követő remodellingjében, myofibroblastok aktivációjában szintén leírták az MRTF-A szabályozó hatását (Small és mtsai 2010).

Az MRTF-ek tumoros megbetegedésekben is ismertek, az MRTF-A az RBM-15-el (RNA binding motif protein-15), más néven OTT-vel (one twenty-two) alkotott fúziós génje t(1;22) transzlokációval akut megakarioblasztos leukémiát okoz (Ma és mtsai 2001). Az MRTF-OTT fúziós fehérje a nucleusban az SRF-et konstitutívan aktiválja, elvesztve felsőbb szabályozását (Descot és mtsai 2008). Szolid tumorokban az MRTF-A és MRTF-B szerepét is igazolták a tumorsejtek inváziójában, metastasisképzésben (Medjkane és mtsai 2009). Az MRTF-ek depléciója viszont in vitro kísérletekben csökkentette a sejtek invazivitását, in vivo a tumorsejtek csökkent MRTF-tartalma mellett a sejtek a véráramból nem tudták kolonizálni a tüdőt, míg az aktivált MRTF-A növelte a kevésbé metasztatikus sejtek tüdőben történő kolonizációját. Emlőtumorokban a Rho-MRTF-SRF útvonal szerepe igazolódott (Hu és mtsai 2011), a TAZ-expresszió szabályozásával valamint a YAP-pal való kölcsönhatásával. A TAZ overexpressziója növeli az emlőből származó tumorsejtek migrációját, invázióját (Liu és mtsai 2016), míg az MRTF-YAP kölcsönhatás in vitro a tumoros sejtek invazivitásához, in vivo emlőtumorok

metastasisához szükséges (Kim és mtsai 2017). Az MRTF-A radioterápiát követően segítette az emlőtumorsejtek lokális relapszusát és metastasisát (Asparuhova és mtsai 2015). Egyes emlőtumoros sejtvonalból (MDA-MB231) származó sejtekben az MRTF-A JAK-STAT3 (Janus kinase és Signal transducer and activator of transcription proteins) útvonal közötti crosstalk fokozta a tumoros sejtmigrációt (Liao és mtsai 2014).

Melanomasejtekben, melyek RhoC-overexpressziót mutató metastasissal járnak, az MRTF farmakológiai gátlása a tumoros sejtek migrációjának és invazivitásának csökkenéséhez vezetett, így a tüdőben észlelt melanomasejtek száma és mérete is csökkent (Haak és mtsai 2017).

Sejtközi kapcsolataik elvesztése után tumoros sejtekben kimutatták a tumorfronton lévő sejtek MRTF-B okozta β 1-integrin felszaporodását (Kato és mtsai 2014).

Az előzőekben felvázolt MRTF-actin kölcsönhatáshoz hasonlóan a Rho-actin szignáltranszdukció is az MRTF nukleáris felszaporodásához vezet, azmi simaizom jellegű géneket aktivál, izomjellegű sejtek mellett fibroblastokban is (Wang mtsai 2002).

A simaizomsejtek kontraktilitásért felelős génjeinek expresszióját a RhoA-dependens-actin-polimerizáció szabályozza (Mack és mtsai 2001), a RhoA pedig a TGF- β indukálta EMT egyik kulcsfontosságú szereplője (Bhowmick mtsai 2001, Masszi mtsai 2003).

Vese-epithelsejtekben a TGF- β 1-hatás és a sejtközi kapcsolatok felbomlása az MRTF nukleáris transzlokációjához vezet (Fan és mtsai 2007). Ezek a hatások – amiket kutatócsoportunk is részletesen elemzett (Masszi A 2004) – erősítik egymást. A mechanikai feszülés (O'Connor és mtsai 2015) és mechanikai stressz (Gomez és mtsai 2010) is az MRTF nukleáris transzlokációján keresztül hat az EMT irányába.

A sejtkapcsolatok felbomlását követő, SRF-függő transzkripció az MRTF nukleáris transzlokációja a Rac, Cdc42, PAK, p38 fehérjék közreműködésével történik (Busche és mtsai 2008, Sebe és mtsai 2008, Sebe és mtsai 2010). A tight-junction kapcsolatok ebben az áthelyeződésben nem játszanak szerepet, a hatáshoz az adherent junction típusú proteinek felbomlása szükséges.

Az EMT markerei MRTF-függő módon jelennek meg, így az MRTF-A overexpresszió az E-cadherin downregulációjához és az N-cadherin kifejeződéséhez vezet, a TGF- β 1 indukálta folyamatot az MRTF funkciójának gátlásával vissza lehetett szorítani (Morita

és mtsai 2007). A β 1-integrin-szabályozás szintén MRTF-kontroll alá esik, mely fehérje az EMT fontos szabályozója, az actin cytoskeleton és az extracelluláris mátrix között teremt kapcsolatot.

Az MRTF-ek az EMT markereire is hatással vannak. Az EMT-re jellemző – a korábbiakban tárgyalt – cytoskeletonátrendeződés, ebben az MRTF a vimentinexpresszió szabályozásán keresztül vesz részt (Morita és mtsai 2007). A tenascin C-expresszió és mátrixlerakódás szintén az EMT-re jellemző (Maschler és mtsai 2004), a tenascin C-t az MRTF – SRF- független módon is – szabályozza (Asparuhova és mtsai 2011). Az MMP9, mint az EMT egyik markere, szintén MRTF-szabályozás alatt áll (Gilles és mtsai 2009). A TGF- β 1 kiváltotta fibronectin és PAI-1-expresszió szintén csökkenhet az MRTF-gátlással (Sisson mtsai 2015). Az MRTF szabályozza a CTGF-t, az MRTF-függő transzkripció gátlása csökkentette a CTGF-expressziót (Medjkane mtsai 2009, Sakai és mtsai 2013). A fibrosismodellekben vizsgált kollagén 1 α 2-szabályozás is MRTF-függő (Small mtsai 2010, Luchsinger és mtsai 2011).

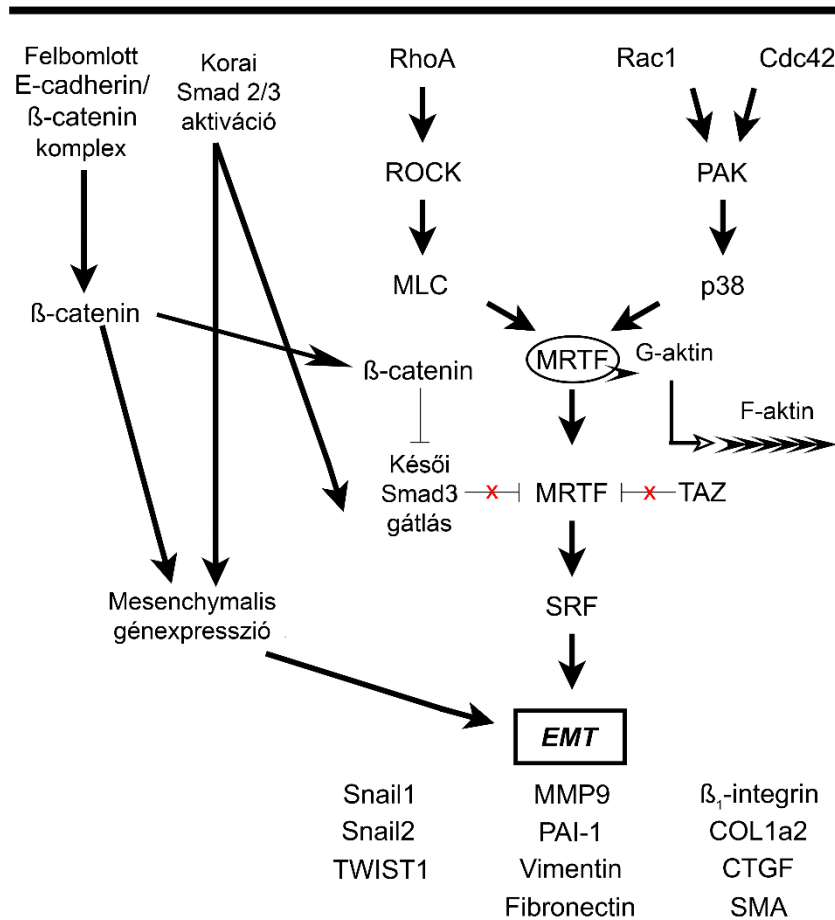
Az EMT-t szabályozó jelátviteli útvonalak, így a TGF β /Smad, a Wnt/ β -catenin és az integrin/ILK hatnak egymásra, (Liu 2010) és az MRTF-funkciót, -expressziót is befolyásolják.

A TGF- β -kezelés proximalis tubularis epithelsejtekben és tüdő-fibroblastsejtekben is növelte az MRTF-expressziót (Sandbo és mtsai 2011). Az MRTF-fehérje mennyisége SRF-függő módon változott, emellett a Four and a half LIM domain 2 (FHL2) az MRTF mennyiségét nem befolyásolta, de növelte a fehérje stabilitását (Hinson és mtsai 2008). Vastagbél-tumoros sejtekben a TGF- β 1 hatására nőtt az FHL2-expresszió, ami – a Smad útvonaltól függetlenül – EMT-t hozott létre (Zhang és mtsai 2010).

A korábbiakban az EMT jellemzése során a TGF- β /Smad-útvonalat részletesen bemutattam. A sebzés és a TGF- β 1-hatás elősegíti a felszabaduló β -catenin Smad3-hoz való kötődését, és a β -catenin-Smad3 komplex az MRTF-szignalizációt erősíti (3. ábra). A Smad3–MRTF kapcsolódás ugyanis gátolja az MRTF-SRF komplex kialakulását, valamint a β -catenin stabilizálja az MRTF-et, a Smad3 kiváltotta glikogén szintetáz kináz 3 β – mely az MRTF-hez köt – szintézis szuppressziójával (Charbonney és mtsai 2011). Az MRTF-overexpresszió a β -catenin szint csökkenéséhez vezethet, de a TGF- β 1 jelenléte meggátolja a β -catenin lebomlását (Masszi A 2004). Az MRTF-A SRF-

szignalizációt a nukleáris MRTF-A szintek szabályozásával a különböző integrinek ($\beta 1$, αV) is befolyásolják (Hermann és mtsai 2016). A $\beta 1$ -integrin-expressziót az MRTF is szabályozza, mely szintén fokozhatja az MRTF-hatást. A környezeti mechanikus hatások közvetítésében mechanoszenzitív szignáltranszdukciós útvonalak befolyásolásával a cytoskeleton aktív szerepet játszik. Idetartozik a Rho-MRTF-útvonal, valamint a Hippo-kináz kontrollja alatt álló YAP/TAZ. Nyugalmi helyzetben ez a két regulátor a cytoplasmában helyezkedik el, a sejtkecsolatok felbomlása esetén azonban kikerülnek a Hippo hatása alól, és defoszforilált állapotban a sejtmagba kerülnek. A TAZ elősegíti az MRTF nukleáris transzlokációját, az MRTF pedig növeli a TAZ expresszióját. A mechanikai stressz önmagában nem elegendő a fenotípus megváltozásához. TGF- $\beta 1$ és mechanikai sérülés jelenlétében viszont a TAZ és Smad3 kötődik egymáshoz, ezzel egyrészt aktiválják az SMA-promotert, másrészt az MRTF-ről való disszociációval növelik annak aktivitását (Speight és mtsai 2016). Az MRTF-YAP-kötés az actin cytoskeleton-sérülésekor az MRTF fokozhatja a YAP aktivitást, s ezzel elősegíti a metastasisképződést (Kim mtsai 2017).

TGF- β 1 és sérülés



3. ábra: Az MRTF és az EMT kapcsolata

I.6. A hipotéziseinket megalapozó irodalmi előzmények

I.6.1. SCAI – Suppressor of Cancer cell Invasion

Az MRTF felfedezését követően vizsgálni kezdték annak kóros szabályozását a tumorok invazív migrációjában. Az actin-polimerizációt, így a sejtek motilitását, alakját a RhoA effektor Dia1 befolyásolja (Kitzing és mtsai 2007), ehhez az SRF és MRTF-k jelenléte szükséges (Staus és mtsai 2007). A Dia1-re ható fehérjék keresése során sikerült igazolni egy 66 000 relatív molekulatömegű proteint, amit Suppressor of Cancer Cell Invasionnek, SCAI-nak neveztek el (Brandt és mtsai 2009). RT-PCR vizsgálattal meghatározták a különböző szövetminták SCAI-expresszióját. A legmagasabb SCAI-mRNS mennyiség az agyban, a lépben és a thymusban volt, legkevésbé a szívben és harántcsíkt izomban volt kimutatható. Sejten belüli elhelyezkedését tekintve a SCAI-t főleg a nucleusból írták

le, de kisebb mértékben a cytoplasmában is jelen volt. A továbbiakban azt vizsgálták, hogy a SCAI hogyan vesz részt a Dial jelátvitelében, hogyan hat az SRF funkciójára. A SCAI jelenléte önmagában nem befolyásolta az SRF-reporter aktivitását luciferáz assay-vel végzett kísérletek során, de a szérum által kiváltott SRF-aktivitást már gátolta. Ha egy N-terminálison trunkált SCAI-variánst használtak, a fenti hatás nem volt megfigyelhető. Tovább vizsgálva a SCAI lehetséges célpontját, aktív RhoA, Dial és β -actin koexpressziós modelleket hoztak létre, amelyekben szintén SRF-inhibíciót figyeltek meg. Ezek alapján a szignáltranszdukciós kaszkád későbbi pontját vizsgálták, az egyik lehetséges pont a MAL volt. A MAL és a SCAI kotranszfekciója során az SRF aktivitása csökkent, szinte teljesen eltűnt. További kísérletekkel bizonyították, hogy a SCAI a MAL-nak specifikus szabályozója, vizsgálták, hogy milyen kölcsönhatással éri el hatását. Az epitóp taggelt MAL-változatok, valamint a különböző SCAI deléciós mutánsok vizsgálatából kiderült, hogy a B/Q régióban a MAL két szomszédos – de különböző – kötőhellyel rendelkezik a SCAI és az SRF számára. Szintén fontos megfigyelés, hogy csak a sejtmagban elhelyezkedő SCAI volt képes gátolni a MAL közvetítette SRF-aktivációt. Igazolni lehetett azt is, hogy a SCAI nem a MAL szérumaktiváció okozta nukleáris transzlokációját, hanem a sejtmagon belüli működését gátolja. Kortikális neuronokban activin hatásra a SCAI-koncentráció a sejtmagban csökkent, a cytoplasmában ezzel párhuzamosan emelkedett. A SCAI kivédte az activin okozta SRF-aktivációt – ezt a kontrollsejtekben is észlelték –, ugyanezt a hatást CREB mediált transzkripció során nem tapasztalták. Emellett megfigyelték a SCAI szabályozó szerepét a dendritek megjelenésében (Ishikawa és mtsai 2010).

I.6.2. Metastasis és az EndMT

A tumoros betegek esetében a metastasis megjelenése az esetek túlnyomó többségében terminális megbetegedést jelent. Az egyesült államokbeli Cancer Institute adatait összevetve (Jemal és mtsai 2005, Siegel és mtsai 2015) látható, hogy az USA-ban 2005 és 2015 között az átlagos túlélés a lokalizált és regionális terjedésű tumorok esetében – a hólyag- és posztatumorok kivételével – javult. A metasztázissal szövődött esetekben a túlélés csak néhány tumortípusnál javult, ám csupán csekély (< 3%) mértékben (Steege 2016).

A metastasisképzés lépései meghatározott sorrendben zajlanak. Először a primer tumor sejtei betörnek a helyi extracellullaris matrix és alapszövet állományába. Bejutva az érpályába, majd túlélvén a transzportot, egy távoli szervben az ottani parenchymába extravazálnak. Az új környezetben saját extracelluláris mátrixot termelve mikrometasztázisokat hoznak létre, végül újraindul a proliferatív program, ami végül makroszkóposan is észlelhető tumortömeget hoz létre (Valastyan és mtsai 2011).

Az extravazáció főként paracellularis transendothelialis migrációval zajlik (TEM), a VE-cadherin-komplexeket a tumorsejtekből felszabaduló faktorok bontják fel. Az így kialakuló réseken keresztül jutnak ki a parenchymába a tumorsejtek (Heyder és mtsai 2002, Fazakas és mtsai 2011).

A tumorsejtek az útjukba kerülő sokféle határoló elem leküzdéséhez többféle molekulát termelnek. A TGF család számos izofomrájának részvételét írtaák le különböző daganatok kialakulásában és az áttétképzésben (Padua és mtsai 2008, Huang és mtsai 2009, Lin és mtsai 2018). Az egyik agresszív bőrdaganat (melanoma) esetében a TGF- β 1 és TGF- β 2 koncentrációja megemelkedett a sejtekben (Krasagakis és mtsai 1998). Emellett azt is megfigyelték, hogy a TGF- β 1-koncentráció a metastasis kialakulásának kezdetén hirtelen megemelkedik a szérumban (Kao és mtsai 2009).

A metastasisok között is egyedi kérdést jelentenek az idegrendszerben megjelenő rosszindulatú daganat áttétek. Az intracranialis metastasisok a felnőtt tumoros populáció kb. 10-20%-ban fordulnak elő, a primer agydaganatok incidenciája a teljes intracranialis térfoglalások között kb. 10% (Platta és mtsai 2010). Az agyi metastasisok esetében a primer daganat leggyakrabban a tüdőben, emlőben, vesében, illetve melanoma

formájában alakult ki (Barnholtz-Sloan és mtsai 2004).

A központi idegrendszerbe a tumorsejtek a véráram útján jutnak. A vér-agy gáton történő áthaladás módját egyelőre nem sikerült teljesen megismerni (Wilhelm és mtsai 2013).

Az endothelsejtek határoló funkcióját a tumorsejtekből származó citokinek – így pl. a TGF- β – rontják, valamint az endothelsejtekben olyan szignalizációs útvonalakat aktiválnak, amelyek pl. a VE-cadherin-komplexeket megszakítják (Weis és mtsai 2004, Fazakas mtsai 2011), ennek következtében az endothelsejtek morfológiája megváltozik (Heyder mtsai 2002). Az endothelsejtekben a cytoskeleton újraszerveződését, motilitás fokozódását szintén kiválthatják a tumorsejtek (Rousseau és mtsai 1997, Weis mtsai 2004).

Mindezen megfigyelések az EndMT folyamatában is követhetők, így azt a hipotézist állítottuk fel, hogy az endothelsejtek nem pusztán „elszenvedői” a tumoros metastasisképzésnek, hanem aktívan is részt vesznek a tumorsejtek extravazációjában.

Az endothelsejtek expressziós mintázata a metastasis során megváltozik, fenotípusuk mesenchymalis irányba tolódik, kontraktilitásuk fokozódik. A változások összessége alapján feltételezhető, hogy az extravazáció során EndMT segítségével küzdik le a metasztatikus sejtek a vér-agy gát jelentette akadályt.

II. Célkitűzések

Csoportunk korábbi munkája során néhány olyan új jelátviteli mechanizmust jellemezett, amelyek a TGF és a kettős sérülés hatására létrejövő EMT-t és a markerként használt SMA-expressziót szabályozzák. E folyamatok központi elemének az MRTF dependens szignalizáció és fehérjeexpresszió szabályozása igazolódott. A közelmúltban felfedezett SCAI-fehérje az MRTF-ek inhibitoraként vált ismertté tumoros modellekben. Ezek alapján felmerült annak lehetősége, hogy a SCAI-fehérjének az EMT folyamatában és a vesefibrosisban is fontos szerepe lehet. Munkám egyik célkitűzése a SCAI vizsgálata volt e modellekben:

1. *In vitro* modellben vizsgálni kívántuk, hogy a SCAI hogyan befolyásolja a TGF- β 1 és az Angiotensin II hatásait, illetve a különböző EMT-markerek expresszióját EMT során.
2. Vizsgálni kívántuk a SCAI az MRTF-A, MRTF-B, valamint a kis G-fehérjék közvetítette szignáltranszdukcióra való hatását EMT-modellben.
3. *In vitro* vizsgálni kívántuk, hogy a TGF- β 1 kezelés, illetve *in vivo* az UUU (Unilateral ureter obstruction), valamint az allograft rejekció kiváltotta fibrosis befolyásolja-e a SCAI- expressziót.
4. Vizsgálni kívántuk, hogy a SCAI az EndMT, illetve iPS-reprogramálás során jelezheti-e az endothel/epithel fenotípust.

A metasztatikus extravasatio során az endothelsejtekben számos változás jön létre. E változások egy EndMT-hez hasonlóak, ezért egy hipotézist állítottunk fel, ami szerint szorosan kapcsolódó endothelsejteket tartalmazó erekben – a tüdőben vagy az agyban – metasztatikus extravasatio során egy EndMT jön létre. E hipotézist vizsgáló modellünkben arra kerestük a választ, hogy a metastasisképzés során az extravasatióban szerepet játszhat-e ez a folyamat. Ezért vizsgálni kívántuk, hogy:

1. *In vitro* agyi endothelsejteken TGF- β 1-hatásra EndMT játszódik-e le.
2. Tumoros sejtek képesek-e TGF-dependens módon EndMT-t indukálni agyi endothelsejtekben.

III. Módszerek

III.1. Sejtkultúra és kezelések

A kísérleteink során használt sertés proximalis tubulus epithelsejtek (LLC-PK1) a nyúl angiotensin II 1-es típusú receptort (AT) stabilan expresszálják. A sejtek CL4 klónja dr. R. Harris ajándéka volt (Burns és mtsai 1995). A tenyésztéshez alkalmazott Dulbecco's modified Eagle's mediumot (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 10%-os magzati marhaszérummal (FBS) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) és 1% penicillinnel-streptomycinnel egészítettük ki. A sejteket 6 vagy 24 lyukú csészés sejttenyésztő tálcán tenyésztettük, majd a kísérletekben leírt módon kezeltük. A tartós Ca^{2+} -megvonáshoz a sejteket háromszor PBS-el (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) mostuk, majd alacsony Ca^{2+} -tartalmú Dulbecco's modified Eagle's mediumban inkubáltuk. A kontrollmintákat sérülésmentes, Ca^{2+} -ot tartalmazó Dulbecco's modified Eagle's mediumban tenyésztettük.

A primer patkány agyi endothelsejteket (RBEC) kéthetes Wistar patkányokból (Toxi-Coop, Budapest, Magyarország) izoláltuk. Ez a hazai és nemzetközi ajánlásoknak megfelelően történt. Az erre vonatkozó protokollt a Csongrád megyei Regionális Állategészségügyi és Élelmiszervizsgálati Felügyelet felülvizsgálta és engedélyezte (engedélyszám: XVI/2980/2012).

Az agyi kéregállományt szétbontottuk és két lépésben, kollagenázzal (Sigma, Budapest, Magyarország) és kollagenázzal/diszpázzal (Roche, Budapest, Magyarország) emésztettük. A mintákat 10 percig, 1000 g-vel Percollban (Sigma, Budapest, Magyarország) centrifugáltuk. A mikroér-töredékeket összegyűjtöttük, s fibronectin/kollagén fedett sejttenyésztő edényekbe helyeztük. Az endothelsejtek tenyésztéséhez DMEM/F12 (Sigma, Budapest, Magyarország) médiumot használtunk, amit 10%-os plazma eredetű szérummal (PDS, First Link, Wolverhampton, Egyesült Királyság), bFGF-fel (Basic fibroblast growth factor), heparinnal, insulin-transzferrin-selenite-tel (Sigma, Budapest, Magyarország) egészítettünk ki.

Az emberi köldökzsinór-vénából származó endothelsejteket (HUVEC) a korábbiaknak megfelelő módon izoláltuk (Bodor és mtsai 2012). A mintákat a Semmelweis Egyetem II. Sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikától kaptuk. A beleegyező nyilatkozatot és a

mintakezelést a Semmelweis Egyetem Regionális, Intézményi Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága (Budapest, Magyarország) hagyta jóvá (TUKEB 126/2014). A HUVEC-sejteket kollagenáz (Sigma, Budapest, Magyarország) kezeléssel különítettük el. Ezt követően 0.5%-os zselatinnal fedett sejttenyésztő flasksokban növesztettük ezeket. Az ehhez használt M199 médiumot (Sigma, Budapest, Magyarország) 15%-os borjúmagzat-szérummal (FBS, Sigma, Budapest, Magyarország), 100 IU/mL penicillinnel (Sigma, Budapest, Magyarország), 100 µg/mL streptomycinnel (Sigma, Budapest, Magyarország), 7.5 IU/mL heparinnal (Merckle, Ulm, Németország), 2 ng/mL EGF-fel (R&D Systems, Abbingdon, Egyesült Királyság), valamint 250 pg/ml – endothelsejt-növelő faktorról (R&D Systems, Abbingdon, Egyesült Királyság) komplettáltuk. A sejteket 2-4 passzálás után használtuk kísérleteinkhez.

A B16/F10, rágsáló-melanomasejteket RPMI-ben (Sigma, Budapest, Magyarország) tenyésztettük, a médiumot 5%-os FBS-sel (Lonza, Basel, Svájc) és Glutamax-szal (Sigma, Budapest, Magyarország) egészítettük ki.

Az A2058 humán melanomasejtek MEM-médiumához (Sigma, Budapest, Magyarország) 5%-os FBS-t 8 (Lonza, Basel, Svájc) és Glutamaxot (Sigma, Budapest, Magyarország) adtunk.

Az SK-BR3, MCF-7 és MDA-MB231 humán emlőtumor-sejteket DMEM-ben tenyésztettük, amihez 10%-os FBS-t (Lonza, Basel, Svájc) adtunk.

A TGF-β1 kezeléseket az egyes kísérleteknél leírtaknak megfelelően 10 ng/mL koncentrációban, illetve a kontrollsejteknél vivőanyaggal végeztük. Az angiotensin II (Sigma, Budapest, Magyarország) kezeléseket az egyes kísérleteknél leírtaknak megfelelően 10⁻⁷M koncentrációban, vagy a kontrollsejteknél vivőanyaggal folytattuk le. Inhibitoros kísérleteinknél a sejteket 10⁻⁷M koncentrációban egy órán keresztül candesartannal (Astra Zeneca, Mölndal, Svédország), vagy az MRTF szignalizációt gátló CCG-1423-mal (Evelyn és mtsai 2007) (Merck Chemicals, Darmstad, Németország) kezeltük elő.

A RBEC-sejtek kezeléséhez a tumorsejtekkel kondicionált, szérummentes DMEM/F12-médiomot 24 órás inkubálást követően gyűjtöttük. A látens TGF- β -t hőaktiváltuk (80°C, 10 perc). A PDS-t a nem aktivált, illetve aktivált, kondicionált médiummal való kezelés előtt adtuk hozzá a RBEC-sejtekhez. A HUVEC sejtek kondicionálásához M199 médiomot használtunk, melyet szérummentesen, 24 óra inkubálást követően gyűjtöttünk. Az FBS-t a nem aktivált, illetve aktivált, kondicionált médiummal való kezelés előtt adtuk hozzá a HUVEC-sejtekhez.

A humán iPS-sejtek reprogramálását a korábbiakban leírtaknak megfelelően végeztük (Grabundzija és mtsai 2013, Sebe és mtsai 2016). Matrigellel (Corning Incorporated Life Sciences, Tewksbury, MA, USA) fedett, 6 csészés sejtenyésztő edényekben, MTeSR1 (Stem Cell Technologies) médiumban három iPS sejt vonalat növesztettünk. A sejteket 37°C-os, párasított sejtenyésztő inkubátorban tenyésztettük, 5%-os CO₂ koncentráció mellett.

III.2. Plazmidok

A 765 bázispár hosszúságú patkány-SMA-promotert tartalmazó PA3-Luc-vektor dr. Raphael Nemenoff (University of Colorado, Denver, CO, USA) ajándéka volt. A fenti szakaszt a PA3-Luc szentjánosbogár luciferáz plazmidba szubklónozták (Garat és mtsai 2000). A 765 bázispár (-713+/52) hosszúságú patkány SMA-promoter cis-elemei között SRE- kötő motívumok vannak (CArG A és CArG B boxok), egy TCE-t, egy TATA box, valamint két E box.

A p152-SMA-Luc-reporter-konstrukció az SMA promoter 152 bázispár hosszúságú szakaszát tartalmazza pGL3 vektorba klónozva, ami Sem H. Phannak (University of Michigan Medical School, Ann Arbor, MI, USA) ajándéka. A transzfekciós hatékonyság mérésére belső kontrollként (Promega; Madison, WI, USA) timidin-kináz hajtotta Renilla luciferáz vektort (pRL-TK) használtunk.

A Green fluorescent proteinnel (GFP) taggelt, vad típusú SCAI-t (GFP-SCAI) és a szintén GFP-taggelt, N-terminálison csonkolt SCAI-variánst (GFP-SCAI Δ nt) dr. Robert Grosse-nak (University of Heidelberg, Heidelberg, Németország) köszönhetjük (Brandt mtsai 2009).

A FLAG-gel jelölt MRTF-A-t és MRTF-B-t dr. Eric N. Olson (University of Texas,

Dallas, TX) bocsátotta rendelkezésünkre (Wang mtsai 2001).

A GFP-taggelt, konstitutívan aktív Rac1-et (Q61L, CA-Rac1), valamint konstitutívan aktív Cdc42-t (Q61L-Cdc42) Dr. Gary M. Bokochnak (The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA) köszönhetjük (Subauste és mtsai 2000).

III.3. Tranziens transzfekció, luciferáz promoteraktivitás assay

Az LLC-PK1 sejteket 6 csészés sejttenyésztő tálcán növesztettük, és közel konfluens állapotban FuGene 6 reagens (Roche, Mannheim, Németország) használatával transzfektáltuk 1 µg DNS / 2.5 µL reagens arányban. A promoteraktivitás meghatározásához 0.5 µg promoter konstruktot, 0.05 µg pRL-TK-t és 2 µg üres vektort (pcDNA3.1), vagy a vizsgált konstruktot kotranszfektáltuk. A transzfekció előtt a szükséges mennyiségű FuGene 6-ot szérumból és antibiotikummentes OptiMEM médiummal kevertük, majd 5 percig inkubáltuk. Ehhez hozzáadtuk az elkészített plazmidkeverékeket, majd az oldatot további 15 percig pihentettük. A sejttenyésztő edényeket az így elkészült DNS-FuGene6-OptiMEM-koktéllal kezeltük csészénként 100 µL mennyiségben. 24 órás inkubációs idő után a sejteket háromszor mostuk PBS-sel, majd – kalciumot tartalmazó vagy kalciummentes – szérumból és antibiotikummentes médiumban a sejteket négy óráig inkubáltuk. Ezután a sejteket TGF-β1-el (10 ng/mL), vagy vivőanyaggal kezeltük, és további 16 órán keresztül inkubáltuk. Ezt követően a sejteket hideg PBS-szel mostuk, végül csészénként 150 µL Passive Lysis Bufferrel lekapartuk ezeket. Mintáinkat fagyasztás (-80 °C) / olvasztás (+37 °C) ciklusokat követően centrifugálással tisztítottuk (12000 RPM, 5 perc, 4°C). A szentjánosbogár- és Renilla luciferáz-aktivitást Dual-Luciferase Reporter Assay Kit (Promega, Madison, WI, USA) segítségével határoztuk meg, a gyártó protokolljának megfelelően. A mérésekhez Victor X3 2030 Multilabel Plate Reader (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) luminométert használtunk. A 20 µl-es mintákhoz a mérés során mindkét pufferből egyenként 100-100 µl-t adtunk. A minták szentjánosbogár- luciferáz-aktivitását elosztottuk azok Renilla-luciferáz aktivitásával, ezzel standardizálva a sejtszámkülönbségből és a transzfekciós hatékonyságból adódó szórást. Minden kezelés esetén duplikátumokat mértünk, és minden kísérletet legalább háromszor végeztünk el. Az eredmények átlagot és standard hibát jeleznek.

III.4. GFP-SCAI-t stabilan expresszáló sejtek

Az LLC-PK1 sejteket 1 μ g GFP-SCAI-plazmival és 3 μ L FuGene6 (Roche, Mannheim, Németország) reagenssel transzfektáltuk. Három nappal a transzfekció után a sejtek szétválogatását a GFP-fluoreszcencia alapján Aria High Speed Cell Sorter (Becton-Dickinson, San Jose, CA, USA) rendszerrel végeztük. A kisselektált GFP-t expresszáló sejteket tovább tenyésztettük, majd 4 és 8 héttel a transzfekció után ismét szétválogattuk. Három ciklus után a megmaradt sejtpopuláció szinte kivétel nélkül GFP-SCAI-t stabilan expresszáló sejtekből állt, ezt flow cytometriával igazoltuk FACSCalibur flow cytometer és CellQuest szoftver (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA) segítségével. Propidium-jodid-festéssel szűrtük ki az életképtelen sejteket.

III.5. Antitestek és reagensek

A kísérleteink során használt anti- α SMA, anti- β -actin, anti- α -tubulin antitestek a Sigma (Budapest, Magyarország) termékei voltak. Az anti-E-cadherin, anti-calponin, és a peroxidáz-konjugált, kecskében termeltetett antitestek a Dako (Glostrup, Dánia) termékei. Az anti-CTGF-antitest a Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) terméke. Az anti-glyceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz (GAPDH) a Millipore-től (Billerica, MA, USA) származott. Az UUO-modellből származó veseminták Western blot vizsgálatához használt anti-SCAI-t az Abcam-től (Cambridge, MA, USA) szereztük be. A peroxidáz konjugált antieger másodlagos antitest a Jackson Immunoresearch Laboratories Inc. (West Grove, PA, USA) és az antinyúl másodlagos antitest a Cell Signaling (Danvers, MA, USA) terméke.

Az agyi endothelsejtek vizsgálatához a következő antitesteket és reagenseket használtuk: claudin-5 (Zymed/Life Technologies), occludin (Transduction Laboratories, Franklin Lakes, NJ, USA), VE-cadherin (Cell Signaling, Danvers, MA, USA), N-cadherin (Transduction Laboratories, Lexington, KY, USA), β 1-integrin (Santa Cruz Biotechnologies, CA, USA), fibronectin (Sigma, Budapest, Magyarország), calponin (DAKO, Glostrup, Dánia), SMA (Sigma, Budapest, Magyarország), α -tubulin (Sigma, Budapest, Magyarország), SRF (Santa Cruz Biotechnologies, CA, USA), phospho-Smad2/Smad3 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), Smad2/Smad3 (Cell

Signaling Technology, Danvers, MA, USA). A peroxidáz-konjugált antiegér és antinyúl szekunder antitestek a Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA) termékei. Cy3-jelölt antiegér és antinyúl antitesteket a Jackson ImmunoResearchtől (Newmarket, Egyesült Királyság) szereztük be. Az SB-431542 Sigma, az Y-27632 Tocris (Bristol, Egyesült Királyság) termék.

A gátló hatású anyagot tartalmazó kísérletekhez a kontrollsejteket vivőanyaggal kezeltük.

III.6. Unilateralis ureter obstructio (UUO) egérmodell

Az ureter obstructio kísérleteket C57BL/6 hím egereken dr. Hamar Péter csoportja végezte a Semmelweis Egyetem Kórélettani Intézetében. Az állatokat a Charles Rivertől (Munich, Németország) rendelték, és a Semmelweis Egyetem állatházában tenyésztették. Tartásuk során szokványos rágcsálótáplálékot kaptak és vizet pedig ad libitum. Minden állatkísérlet a Semmelweis Egyetem szabályainak és a jogszabályi előírásoknak (1198/XXVIII tv. Az állatok védelméről és kíméletéről, 243/1998(XII.31) Kormányrendelet az állatkísérletek végzéséről) megfelelően történt.

Az egerek tömege átlagosan 25.5 (SD \pm 2.0) gramm volt, anesztéziájukhoz intraperitonealis injekció formájában ketamin (100 mg/ttkg) és xylazine (8mg/kg) koktélt használtak. UUO-t 8 egyedben alkalmaztak, a veséket median laparotomián keresztül közelítették meg. A bal uretert a vesekapu alatt 6.0-ás selyem varrattal ligálták, így teljes obstrukciót hoztak létre. A hasi seb zárását követően 14 napig figyelték meg az állatokat. Ezután éter (Reanal, Budapest, Magyarország) anesztézia, heparinizáció (Sandoz, Holzkirchen, Németország) mellett feláldozták őket. Vérmintát a vena cava superiorból nyertek, a heparinizált vérből centrifugálással (4°C-on, 400 x g, 10 perc) különítették el a plazmafrakciót. Az állatokat 20 ml-es fecskendő és 18 G-s tű segítségével 20 milliliter jéghideg HBSS-szel (Sigma, Budapest, Magyarország) perfundálták. Az obstruált bal és az érintetlen jobb vesét eltávolították, a veseszövetet összegyűjtötték. Az így nyert mintákat előkészítés után Western blottal vizsgáltuk.

III.7. Vesetranszplantáció rejekciós modell

A vesetranszplantációs kísérleteket Dr. Hamar Péter csoportja végezte a Semmelweis Egyetem Kórélettani Intézetében.

A hím Lewis (LEW, RT1^l) és hím Brown-Norway (BN, RT1ⁿ) patkányokat a Charles Rivertől (Munich, Németország) szerezték be az Akronom Kft.-n (Budapest, Magyarország) keresztül. A patkányok keresztezésével Lew-is-Brown-Norway (LEW x BN F1, LBN) hibrid állatokat tenyésztettek a Semmelweis Egyetem állatházában. A hibrid állatok tartása során szokványos rágcsálótáplálékot kaptak és vizet pedig ad libitum. Az LBN patkányok szolgáltak vesegraft-donorként, a Lewis-patkányok recipiensként. Minden kísérleti eljárást a hatályos magyar jogszabályoknak, valamint az amerikai Nemzeti Egészségügyi Intézet laboratóriumi állatok tartásáról és felhasználásáról szóló irányelveinek megfelelően végeztek. A kísérleti protokollt a Semmelweis Egyetem Etikai Tanácsa (Budapest, Magyarország) a laboratóriumi állatok tartásáról és felhasználásáról szóló törvényi előírások alapján hagyta jóvá (XIV-I-001/2012-4/2012).

Az állatok anesztéziáját Na-pentobarbitállal (Euthasol 40%, Produlab Pharma, Raamsdonksveer, Hollandia) 60 mg/ttkg dózisban végezték. A transzplantációt a korábbiakban leírtaknak megfelelően folytatták le (Hamar és mtsai 2000, Hamar és mtsai 2005).

A nem transzplantált, intakt jobb oldali vese szolgált kontrollként az LBN állatokban. A bal oldali vese ereit izolálás és lefogás után 4°C-os hideg transzplantációs puffer oldattal perfundálták. Ezt követően a vesét eltávolították, és ortotopikus helyzetben a recipiens bal oldali veséjének helyére – amit előzőleg a veseerek izolálása és lefogása után eltávolítottak – ültettek be. Az arteria renalis, vena renalis és az ureter end-to-end anastomosisát 10-0-s prolén varrattal készítették el. A teljes graft ischaemiát 30 percben határozták meg. Immunszuppressziót nem alkalmaztak. A posztoperatív fájdalomcsillapítást 2.5 mg/ttkg dózisban, subcutan beadással morfin-hidrokloriddal (Buprenorphine, Alstoe Limited, Sheriff Hutton, York, Egyesült Királyság) végezték. A fertőzéses szövődmények kivédésére 25 mg/ttkg dózisban ceftriaxont (Rocephine, Roche Hungary Ltd., Budaörs, Magyarország) alkalmaztak. A második posztoperatív napon a jobb oldali, érintetlen veséket eltávolították. Ezt követően naponta megmérték az állatok testtömegét, összegyűjtötték az ürített vizeletet, és a farokvénából vérmintát vettek. A

szérum és vizeletmintákat a további mérésekig -80°C-on tárolták. Isofluran narcosis mellett az aorta abdominalis szakaszából a patkányokat kivéreztték, és a szíven keresztül az állatokat fiziológias sóoldattal perfundálták. A vesegraftokat ezután eltávolították és folyékony nitrogénben hirtelen fagyasztották, majd a későbbi Western blot vizsgálatokhoz -80°C-on tárolták. A kísérleteket a negyedik és a hetedik posztoperatív napokon zárták le.

III.8. Kvantitatív real-time PCR vizsgálat

A vizsgálatokhoz a HUVEC-, illetve iPS-sejteket PBS-szel egyszer mostuk, majd – a gyártó előírásainak megfelelően – az RNS-t TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) segítségével izoláltuk. 2 µg RNS került reverz transzkripcióra (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), random primerekkel. A PCR-reakciókat BioRad CFX thermalcyclerrel (BioRad, Hercules, CA, USA) végeztük, amihez Maxima SYBR Green PCR Master Mixet (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) használtunk, 95 °C-on 15 másodperces, 60°C-on 60 másodperces időtartamokat alkalmaztunk 40 cikluson keresztül. A reakció specificitását és hatékonyságát olvadási és standardgörbe-analízissel igazoltuk. Az átlagértékeket a 2- $\Delta\Delta C_t$ segítségével írtuk le. Minden kísérletet párhuzamosan három mintával végeztünk, és minden kísérletet két alkalommal ismételtünk meg. A primer szekvenciák a következők voltak: mSCAI forward: acccctgtcatcgttg, mSCAI reverse: cgagtggctgtccaaaca, mGAPDH forward: cttgtcaagctcattcctgg, mGAPDH reverse: tcttgctcagtgctcctgc, hSCAI forward: cgggaaacacgaaattatcc, hSCAI reverse: gcttctggagatgaggattctc, hE-cadherin forward: ggctggaccgagagagtttc, hE-cadherin reverse: cctgaccctgtacgtggtg, hNanog forward: acctcagctacaacaggtgaag, hNanog reverse: agagtaaaggctgggtaggt, hGAPDH forward: cccttcattgacctcaacta; hGAPDH reverse: ccaaagttgtcatgtagac, h18S forward: ccccatgaacgaggaatt, h18S reverse: gggacttaatacaacgcaagctt.

III.9. Western blot

A sejteket 3 cm-es csészékben 100%-os konfluencia eléréséig növesztettük, TGF- β 1-gyel vagy kalciummegvonással stimuláltuk. A sejteket jéghideg PBS-szel mostuk, majd Triton Lizis Pufferban (30 mmol/L HEPES (pH 7,4), 100 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EGTA, 20 mmol/L NaF, 1% Triton X-100, 1 mmol/L Na₃VO₄, 1 mmol/L Fenil-metil-szulfonil-fluorid (PMSF), és 20 mL/mL proteázgátló koktélaban (Pharmingen, San Diego, CA, USA) felkapartuk. A sejtlizátum fehérjekoncentrációját BCA Protein Assayvel (Pierce Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) határoztuk meg, ennek során 10 mL mintához 1 ml bicinkoniniksavas (BCA) reagenst adtunk, majd 37 °C-on 30 percig inkubáltuk, és ezt követően abszorbanciát Beckton Dickinson spektrofotométerrel 562 nm-en mértünk. Az egyes abszorbanciaértékekhez tartozó fehérjekoncentrációt marhaszérum-albumin hígítási sorral készített standard görbe alapján állapítottuk meg.

A sejtlizátumot ezután 1:1 arányban kétszeres koncentrációjú Laemmli-pufferral (375 mM TRIS (pH 6,8), 10% SDS, 20% glicerin, 0,005% brómfenilkék és 2% β -merkapoetanol) összekevertük, majd 5 percig 100 °C-on forraltuk.

A mintákat Mini Protean II és III apparátussal (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) 10-12%-os redukáló SDS-poliakrilamid géleken szeparáltuk. A mintákból azonos mennyiségű (20 mg) fehérjét töltöttünk a gélekre, majd 70 V és 100 V feszültségen futtattuk (50 mM TRIS (pH 8,3), 196 mM glicin, 0,1% SDS). A fehérjéket szeparálódás után Towbin-féle transzfer pufferben (25 mM TRIS, 192 mM glicin, 20% metanol, pH 8,3) 350 mA áramerősséggel, 90 percig nitrocellulóz membránra (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) transzferáltuk. A transzferálás minőségét a membrán Ponceau S (Sigma, Budapest, Magyarország) festésével ellenőriztük. A membránokat 1 órán keresztül 5% albumint (Sigma, Budapest, Magyarország) tartalmazó T-TBS oldatban (0,1% Tween 20, 20 mM TRIS, 137 mM NaCl) blokkoltuk. Ezután rövid T-TBS-sel végzett mosás következett, majd a membránokat hűtőgépből +4 °C-on egy éjszakán át elsődleges antitestet tartalmazó oldatban inkubáltuk. Az antitesteket 0,5% albumint tartalmazó TBS oldatban hígítottuk (általában 1:1000 hígítást használtunk). Ezt követően a membránokat 3-szor 10 percig T-TBS-oldattal mostuk, majd a megfelelő torma-peroxidázzal konjugált másodlagos antitesttel inkubáltuk újabb 90 percig (általában 1:2000 hígítást használtunk). Végül a membránokat T-TBS-sel alaposan mostuk, és a

peroxidáz-pozitív csíkokat elektrolumineszcens érzékelő rendszerrel (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) jelenítettük meg.

III.10. Microarray alapú génexpressziós-analízis

A génexpressziós profilokat a Gene Expression Omnibus (GEO) adatbázisából használtuk, ami a National Center for Biotechnology Information (NCBI, USA) részét képezi. Az adatok a HUVEC-sejtek, illetve HUVEC és 1205LU melanoma sejtek kultúrák vizsgálataiból származnak (elérési szám: GSE8699). A génexpressziós szintek különbségét kizárólag HUVEC valamint a HUVEC és 1205LU melanoma sejt kultúrája között vizsgáltuk. A két adatcsoport vizsgálatakor azokat a géneket figyelembe véve, melyek detektálási p értéke kisebb, mint 0.05 volt, és expressziós szintjük legalább másfélszeres változást mutatott.

III.11. Statisztikai elemzés

A transzfekciós kísérletek során minden mérést duplikátumban végeztünk, és legalább három alkalommal ismételtünk. Az eredmények feltüntetésekor az átlagot és a standard deviációt jelöltük. A kezelt és kezeletlen csoportok luciferáz aktivitását (relatív promoteraktivitást hasonlítottuk össze).

A kvantitatív RT-PCR vizsgálatainkban biológiai triplikátumokat használtunk, az eredmények elemzéséhez Mann-Whitney U tesztet használtunk.

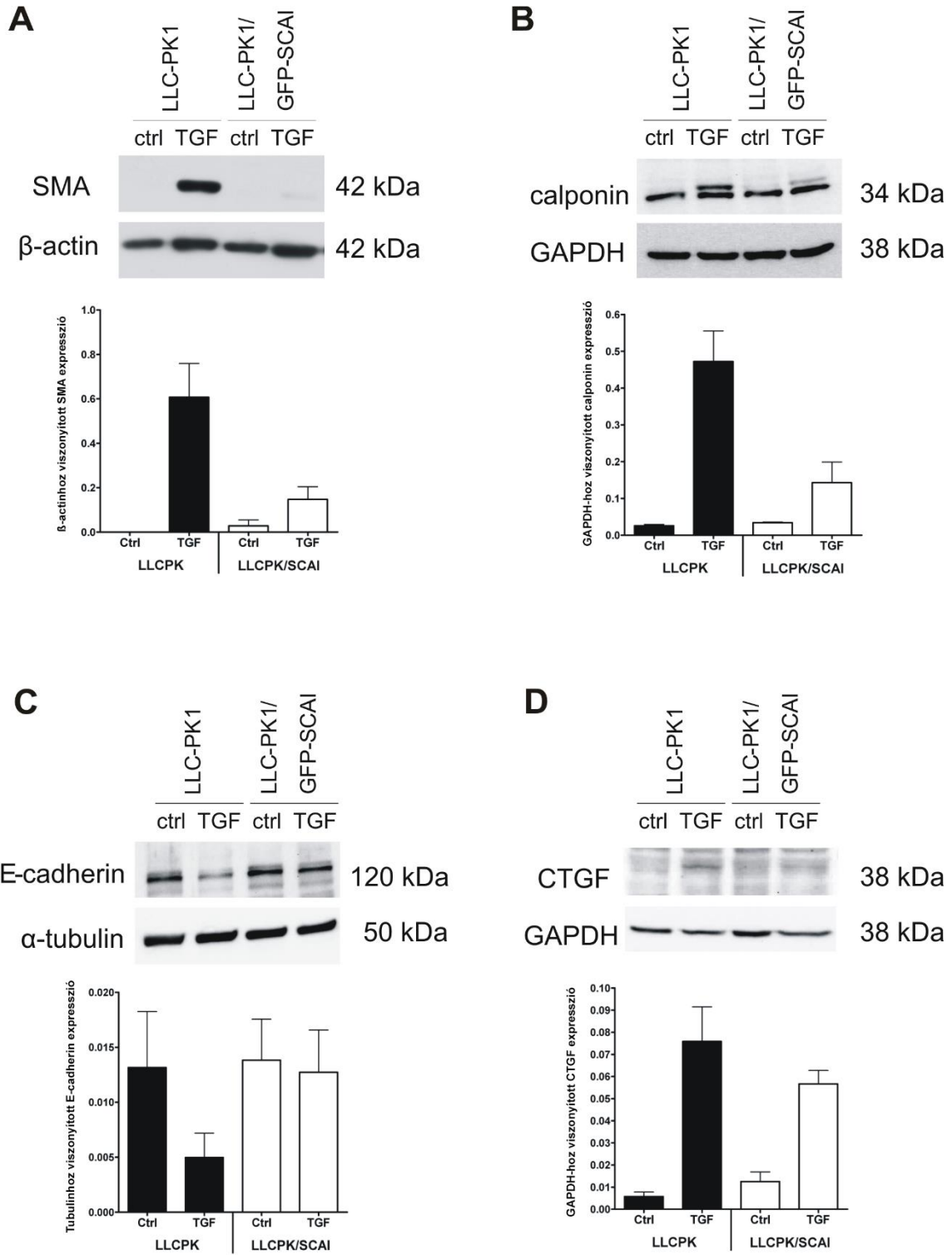
Western blot vizsgálatainkat legalább három alkalommal ismételtük, az eredményeket egy-egy reprezentatív képpel mutatom be.

IV. Eredmények

IV.1. A SCAI-fehérje szerepe proximalis tubulus sejtek epithelialis mesenchymalis transitiójában

Kutatócsoportunk korábbiakban részletesen vizsgálta az EMT-t LLC-PK1 (proximalis tubulus) sejteken. Tumoros *in vitro* modellekben ismert volt a SCAI MRTF-et gátló szerepe. Kísérleteink során arra szeretnénk volna fényt deríteni, hogy a SCAI milyen szerepet játszik az EMT fibrosishoz vezető folyamatában.

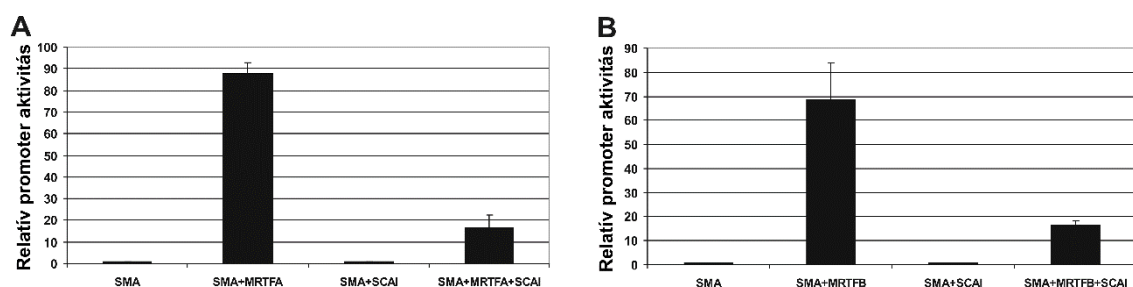
A SCAI-fehérje korábbi ismereteink alapján gátolta a TGF- β 1-kezelés okozta SMA-promoteraktivációt, a pontosabb hatásmechanizmus megismeréséhez további *in vitro* kísérleteket végeztünk. GFP-SCAI-t stabilan expresszáló LLC-PK1-sejteket hoztunk létre, melyeket TGF- β 1-kezelést követően Western blottal vizsgáltunk (4. ábra). A TGF- β 1-kezelés nagyfokú SMA-expressziót eredményezett, míg a SCAI-t tartósan expresszáló sejtekben SMA-expresszió alig volt észlelhető (4. ábra, A). CArG promoter-szekvencia általt szabályozott EMT marker calponin-expressziót is megvizsgáltuk ebben a modellben. A SCAI-t stabilan expresszáló LLC-PK1 sejtekben (LLC-PK1/GFP-SCAI) háromnapos TGF- β 1-kezelést követően a calponinexpresszió kisebb volt a kontroll LLC-PK-sejtek calponinexpressziójához hasonlítva (4. ábra, B). Ezzel párhuzamosan a SCAI gátolta az E-cadherin-expresszió csökkenését is (4. ábra, C). A TGF- β 1-kezelés hatására CTGF-expresszió következett be, ami az LLC-PK/SCAI-sejtekben kisebb mértékű volt (4. ábra, D).



4. ábra: A SCAI gátolja a TGF- β 1 kiváltotta SMA-, calponin- és CTGF-expressziót. Emellett a SCAI-t stabilan expresszáló sejtek megőrizték az E-cadherin kifejeződést. **A:** SMA-expresszió LLC-PK1/GFP-SCAI sejtekben 3 napos TGF- β 1-kezelését követően. Western blot analízis. Az SMA-fehérje-expressziót a SCAI gátolta. (LLC-PK + TGF- β 1

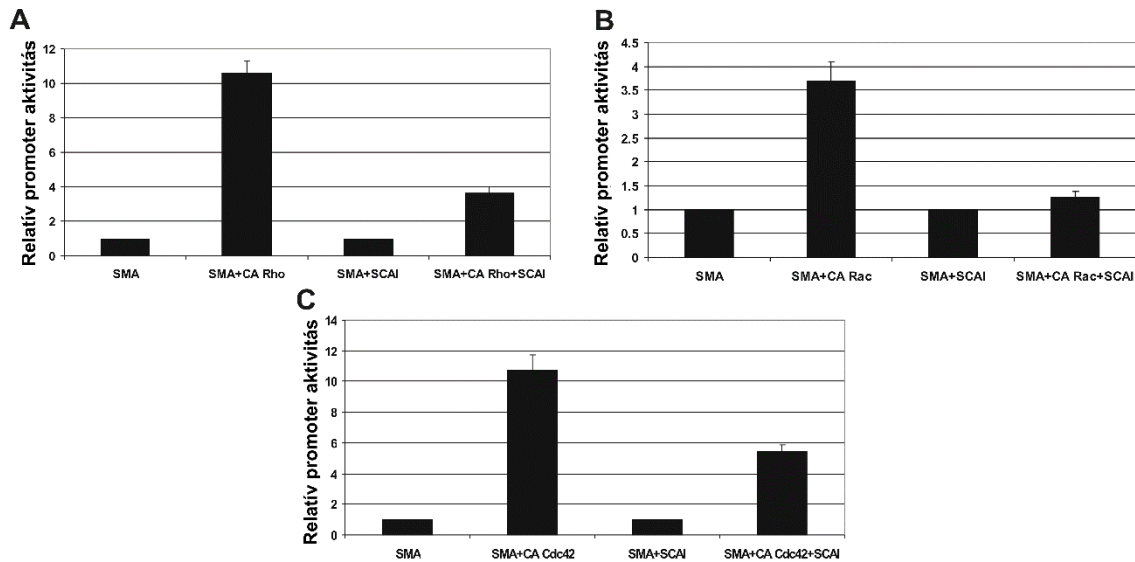
vs. LLC-PK/SCAI + TGF- β 1, $0,6 \pm 0,15$ vs. $0,15 \pm 0,05$) **B:** 3 napos TGF- β 1-kezelés calponinexpressziót hozott létre LLC-PK1 sejteken. A calponinexpressziót a SCAI jelenléte gátolta (LLC-PK + TGF vs. LLC-PK/SCAI + TGF, $0,47 \pm 0,08$ vs. $0,14 \pm 0,05$). **C:** A TGF- β 1-kezelés LLC-PK1 sejtekben az E-cadherin-expressziót csökkentette, ezt a hatást a SCAI jelenléte gátolta (LLC-PK + TGF vs. LLC-PK/SCAI + TGF, $0,005 \pm 0,002$, vs. $0,01 \pm 0,003$). **D:** A TGF- β 1-kezelés LLC-PK1 sejtekben CTGF-expressziót hoz létre, mely hatást a SCAI csökkentette. (LLC-PK + TGF- β 1, $0,07 \pm 0,01$ vs. $0,05 \pm 0,006$). Western blot, kvantifikáció digitális képanalízissel.

Az ezt követő kísérletekkel a SCAI és az MRTF SMA-promoterre gyakorolt hatását tanulmányoztuk. Az MRTF-A és MRTF-B az SMA-promoter ismert aktivátora, azonban SCAI-t tartósan expresszáló sejtekben a kifejezett SMA-promoteraktiváció nem jelentkezett (5. ábra).



5. ábra: A SCAI-fehérje gátolja az MRTF-A és MRTF-B okozta SMA-promoter-aktivitás növekedését. **A:** Az LLC-PK1 sejteket SMA-promotert tartalmazó luciferáz konstrukttal és MRTF-A-t expresszáló vektorral kotranszfektáltuk. **B:** A sejteket SMA-promotert tartalmazó luciferáz konstrukttal és MRTF-B-t expresszáló vektorral kotranszfektáltuk. Az ábrák a luciferáz assayvel mért relatív promoteraktivitást jelzik \pm SD (MRTF-A; $87,97 \pm 5,04$ vs. $16,53 \pm 5,78$, MRTF-B; $68,61 \pm 15,33$ vs. $16,43 \pm 1,54$). ($p < 0,05$)

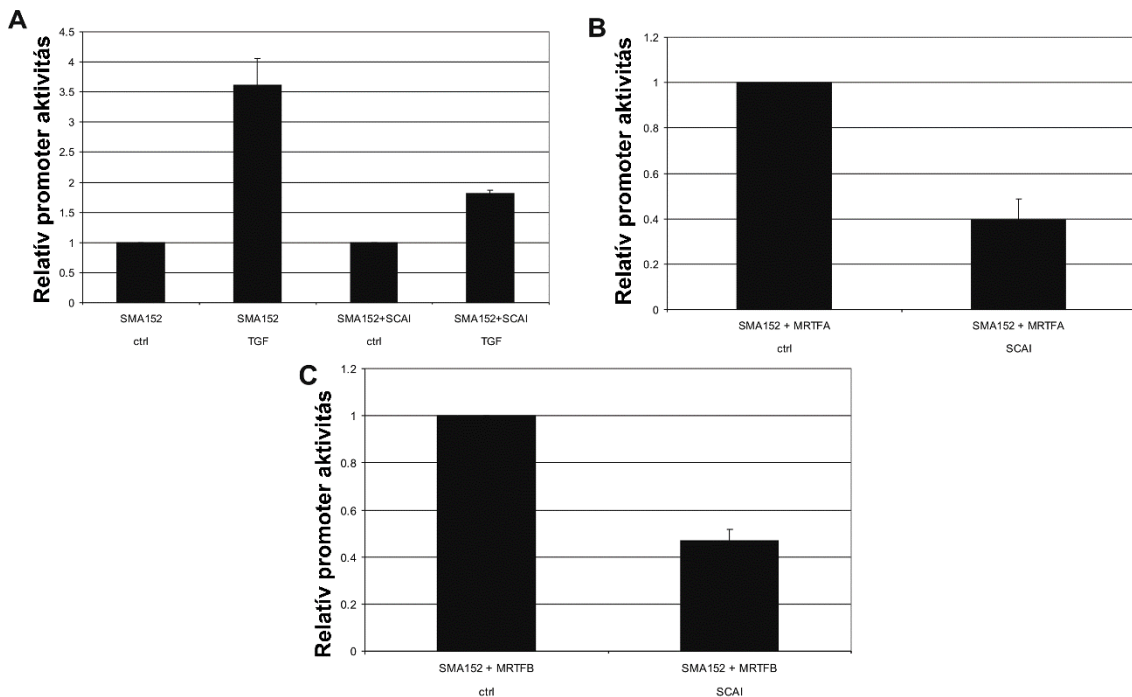
Az SMA-promotert az MRTF-SRF-útvonalon keresztül az ún. kis GTPáz molekulák is szabályozzák. A RhoA, Rac1, Cdc42 konstitutívan aktív formájú fehérjét stabilan epresszálo plazmidok transzfekeciója LLC-PK1 sejtekben SMA-promoteraktivitás-növekedést hozott létre. Ezt a hatást a SCAI-expresszió csökkentette (6. ábra).



6. ábra: A SCAI gátolja az SMA-promoter RhoA, Rac1, Cdc42 indukált aktivációját. **A:** SMA-promoter és konstitutívan aktív RhoA kotranszfekeciója ($10,57 \pm 0,69$ vs. $3,59 \pm 0,41$). **B:** SMA-promoter és konstitutívan aktív Rac1 kotranszfekeciója ($3,69 \pm 0,39$ vs. $1,25 \pm 0,12$). **C:** SMA-promoter és konstitutívan aktív Cdc42 kotranszfekeciója ($10,71 \pm 1,02$ vs. $5,43 \pm 0,43$). Az ábrák a luciferáz assay-vel mért relatív promoteraktivitást \pm SD jelzik. ($p < 0,05$)

Annak vizsgálatára, hogy a SCAI az MRTF CARG domainen való hatását gátolja-e, további kísérleteket végeztünk. Ezekhez olyan 153 bázispár hosszúságú SMA-promotert használtunk, melyen megtalálható a két CARG elem és a TCE elem, azonban az SBE-k és az E-box hiányzik (7. ábra). A SCAI és a 152 bp hosszúságú SMA-promoter kotranszfekecióját követően a TGF- β 1-kezelés a kontrollcsoporthoz viszonyítva kisebb SMA-promoteraktivitás-növekedést okozott (7. ábra, A). Ugyanez a hatás MRTF-A kotranszfekecióját követően is megfigyelhető volt, a SCAI 60%-kal csökkentette az MRTF-

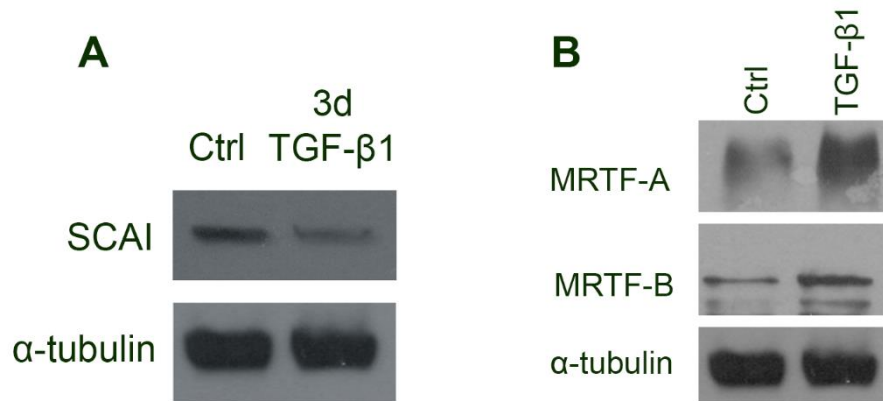
A kiváltotta SMA-promoteraktivitás-növekedést (7. ábra, B.) MRTF-B kotranszfekciója esetén a SCAI 53%-kal csökkentette az MRTF-B kiváltotta SMA-promoteraktivitás-növekedést (7. ábra, C).



7. ábra: A SCAI CArG-függő módon gátolja a TGF- β 1, MRTF-A és MRTF-B kiváltotta SMA-promoteraktivitást. **A:** A SCAI gátolja a TGF- β 1-hatást a p152-SMA-Luc promoteren ($3,61 \pm 0,44$ vs. $1,81 \pm 0,05$). **B:** A p152-SMA-Luc-promoter és az MRTF-A kotranszfekciója. A SCAI overexpressziója csökkentette az SMA-promoter aktivitását. **C:** A p152-SMA-Luc promoter és az MRTF-B kotranszfekciója. A SCAI overexpressziója csökkentette az SMA-promoter aktivitását. Az ábrák a luciferáz assay-vel mért relatív promoteraktivitást \pm SD jelzik. ($p < 0,05$)

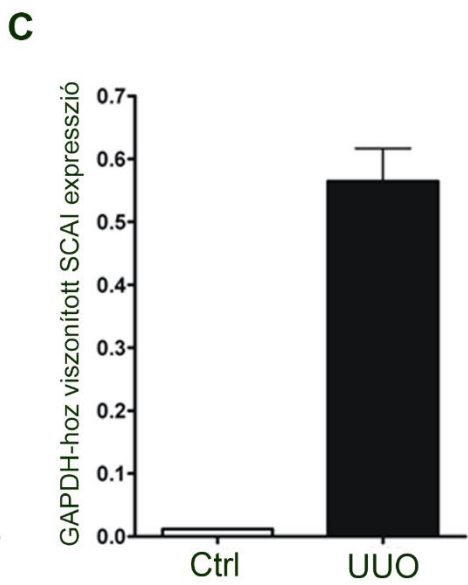
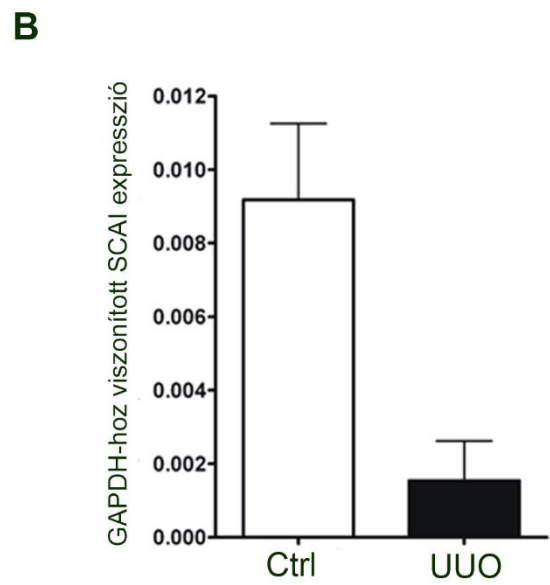
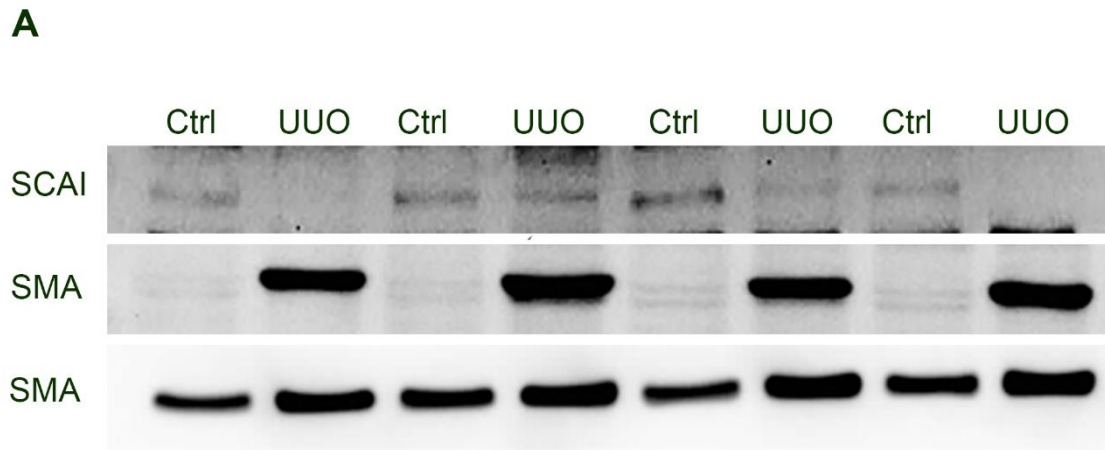
A SCAI hatásainak vizsgálatokor felvetődött annak kérdése, hogy a TGF- β 1 befolyásolja-e a SCAI-fehérje expresszióját, így LLC-PK-sejtek háromnapos TGF- β 1 kezelését követően Western blot vizsgálatot végeztünk a SCAI fehérje expresszió vizsgálatára. Eredményeink alapján a TGF- β 1 csökkentette a SCAI kifejeződését az LLC-PK1

sejtekben (8. ábra, A). Az MRTF expressziót vizsgálva háromnapos TGF- β 1 kezelést követően azt tapasztaltuk, hogy az MRTF-A és MRTF-B expresszió is kifejezettebbé vált (8. ábra, B).

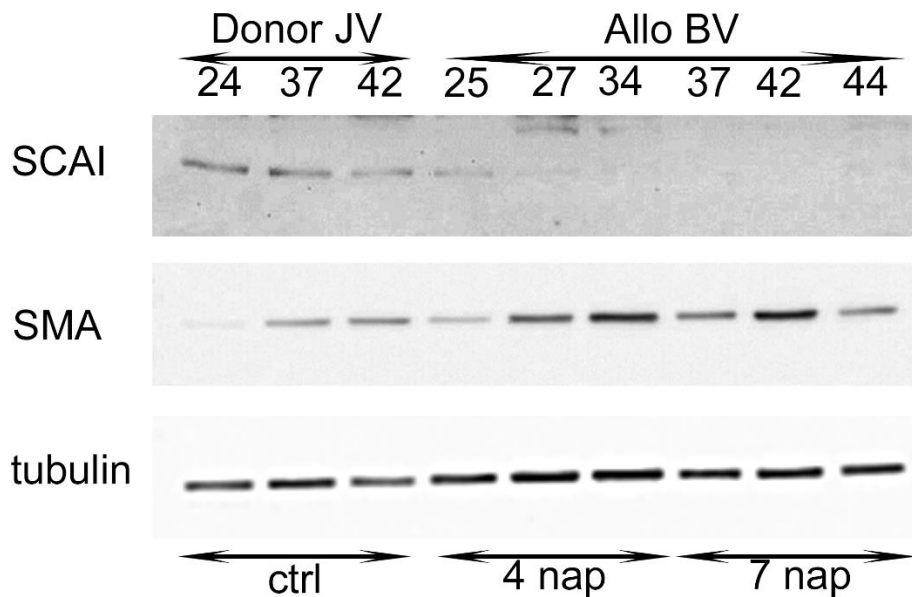


8. ábra: TGF- β 1-kezelés hatása a SCAI-, MRTF-expresszióra LLC-PK1 sejtekben. **A:** Háromnapos TGF- β 1-kezelés a SCAI-fehérje csökkent kifejeződéséhez vezetett ($0,27 \pm 0,01$ vs. $0,19 \pm 0,06$). **B:** Háromnapos TGF- β 1 kezelés az MRTF-A és MRTF-B expresszió növekedését eredményezte. Western blot, kvantifikáció digitális képanalízissel. ($p < 0,05$)

Vizsgálatunkat in vivo kísérletekkel egészítettük ki, egér UUO-modellből származó vesemintákat Western blottal vizsgáltunk (9. ábra). Az obstruált vesékből származó mintákban a SCAI-koncentráció csökkent ($0,009 \pm 0,002$; UUO, $0,0015 \pm 0,001$), az SMA-expresszió ($0,012 \pm 0,001$; UUO, $0,56 \pm 0,05$, 9. ábra B, C) a kontrollminták értékeihez viszonyítva nőtt.

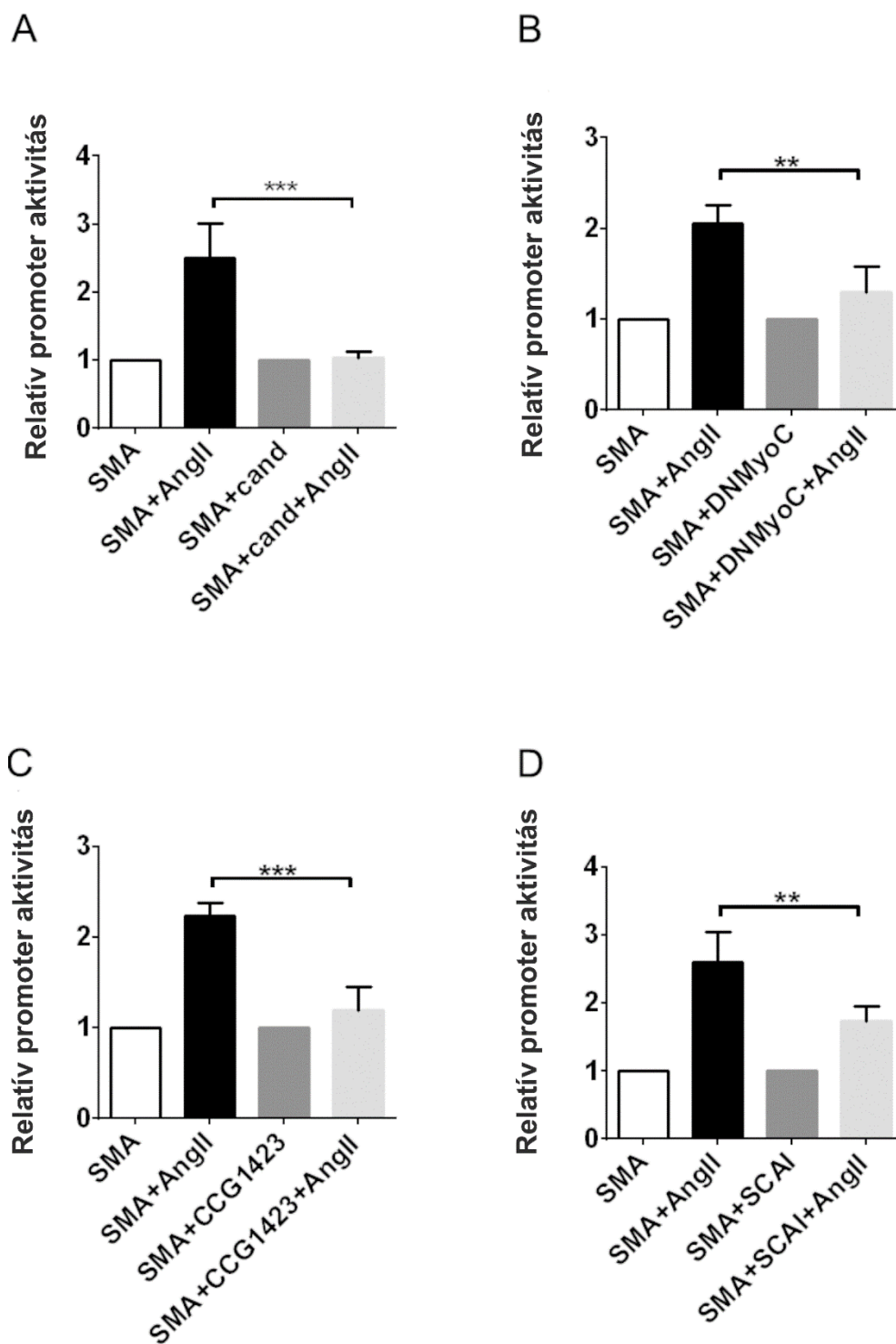


9. ábra: Csökkent SCAI-expresszió UUO-modellben. Western blot analízis. **A:** C57BL/6 egerekben végzett UUO-kísérlettel a SCAI-expresszió csökkent az obstruált vesében, ezzel párhuzamosan az SMA-expresszió drasztikusan nőtt. **B-C:** A SCAI- és az SMA-expresszió kvantitatív megjelenítése kontroll- és UUO-vesében. A SCAI-koncentráció csökkent (**B**; $0,009 \pm 0,002$ vs. $0,0015 \pm 0,001$), az SMA-expresszió nőtt (**C**; $0,012 \pm 0,001$ vs. $0,56 \pm 0,05$). Western blot, kvantifikáció digitális képanalízissel. ($p < 0,05$)



10. ábra: SMA- és SCAI-expresszió rejekciós modellben. Western blot analízis. LBNF1-LEW patkányok bal vese (BV) allograftjának és a donor jobb veséjének (JV) összehasonlítása 4, illetve 7 nappal a transzplantációt követően. Az SMA-expresszió növekedése mellett megfigyelhető a SCAI-kifejeződés meredek csökkenése. Western blot vizsgálat.

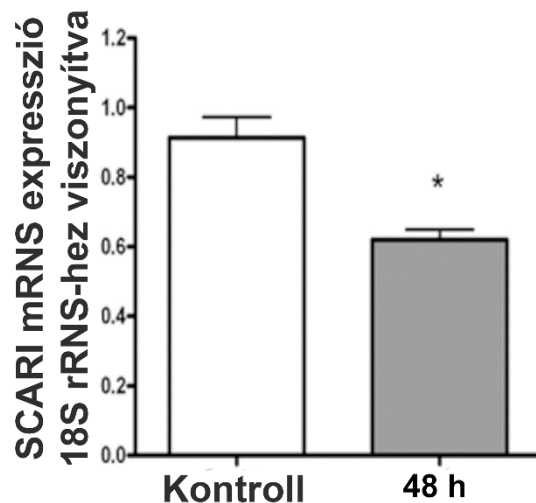
Az UUO-t követően egy klinikailag is fontos betegséget, a vesetranszplantációt követő allograft nephropathiát vizsgáltuk patkánymodellben. Mintáinkat a 4. és a 7. poszttranszplantációs napon vizsgáltuk, a korai fibrotikus események megismeréséhez kontrollként a donorok ép veséjét használtuk. Az SMA fehérjeexpresszió emelkedése mellett a SCAI-fehérje kifejeződésének drasztikus csökkenése volt megfigyelhető (10. ábra).



11. ábra: A SCAI hatása proximális tubulus sejtek Angiotensin II kezelése esetén. Luciferáz assay. **A:** Az AT1 receptor antagonistá candesartan gátolta az angiotensin II okozta SMA-promóteraktivitás-növekedést. ($2,5 \pm 0,5$ vs. $1,02 \pm 0,09$, *** $p < 0,001$, Mann-Whitney U-test) **B:** Az MRTF-ek gátlása csökkentette az angiotensin II okozta SMA-promóteraktivitás-növekedést. ($2,05 \pm 0,2$ vs. $1,29 \pm 0,29$,** $p < 0,01$, Mann-

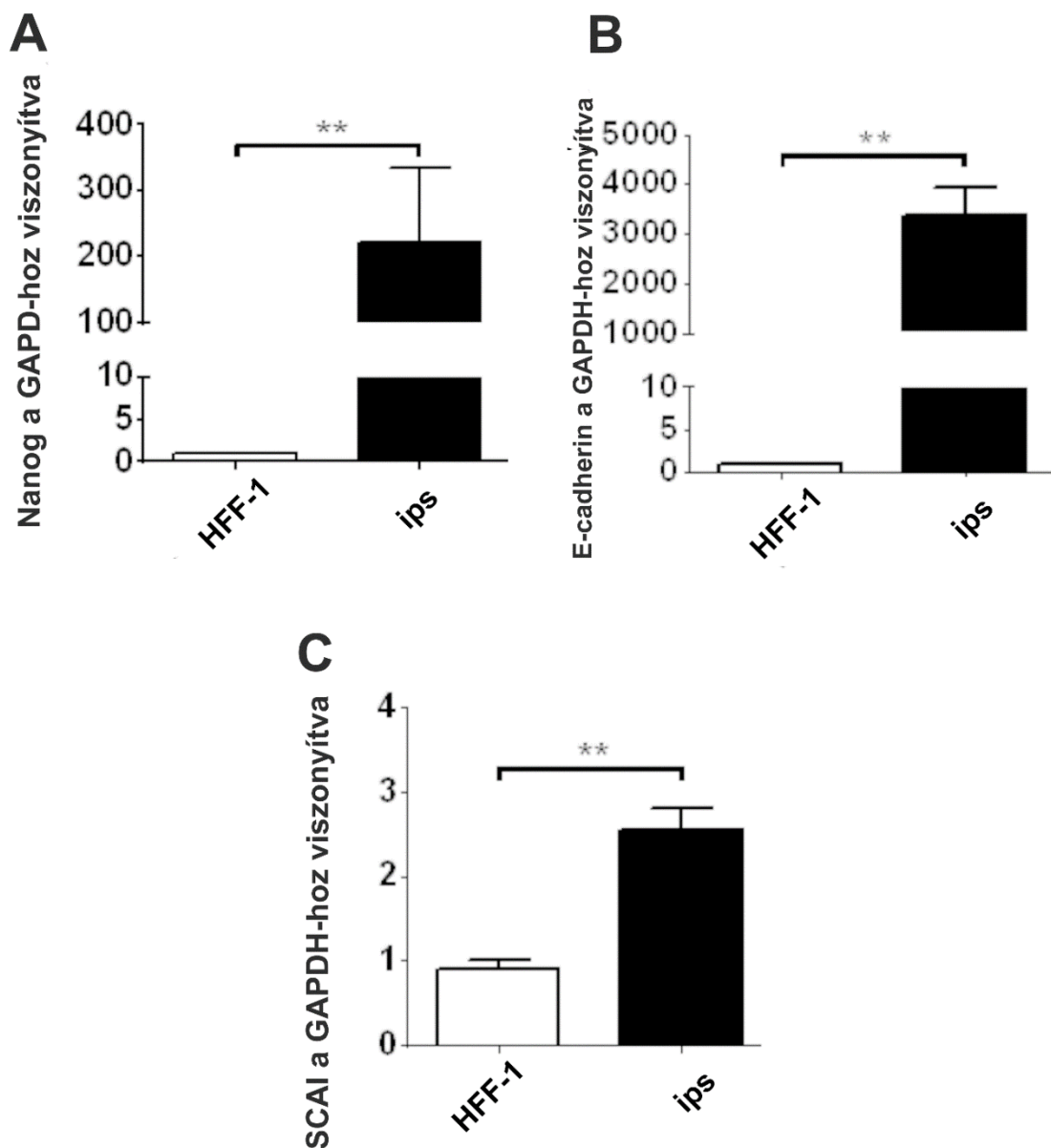
Whitney U-test) A sejteket SMA- promoterrel és DNMyoC-vel vagy anélkül transzfektáltuk. **C:** A sejtek MRTF specifikus gátlószerével (CCG1423) való előkezelés csökkentette az angiotensin II okozta SMA-promoteraktivitást. ($2,23 \pm 0,15$ vs. $1,19 \pm 0,25$, *** $p < 0,001$, Mann-Whitney U-test) **D:** A SCAI csökkentette az angiotensin II okozta SMA-promoteraktivitás-növekedést. ($2,6 \pm 0,43$ vs. $1,72 \pm 0,22$, ** $p < 0,01$, Mann-Whitney U-test) A sejteket SMA-promoterrel és SCAI-jal vagy anélkül transzfektáltuk.

A SCAI sejtplaszticitásban betöltött további szerepét vizsgálva a sejtplaszticitásban a korábbiakban ismertetett LLC-PK1 proximalis tubulus sejteken további kísérleteket végeztünk. SMA promotert tartalmazó luciferáz riporter konstruktot transzfektálva angiotensin II-vel kezeltük az LLC-PK1 sejteket, ami a promoter kifejeződését növelte. Ezt a hatást a candesartan gátolta ($2,5 \pm 0,5$ vs. $1,02 \pm 0,09$, $p < 0,001$, Mann-Whitney U-teszt, 11. ábra, A). A MyoC domináns negatív formájának kotranszfekciójával vizsgálni tudtuk az MRTF-ek szerepét az angiotensin II kiváltotta SMA-promoteraktivációban (11. ábra, B). A DNMyoC-vel kotranszfektált sejtekben az angiotensin II hatás kevésbé markánsan jelent meg ($2,05 \pm 0,2$ vs. $1,29 \pm 0,29$, $p < 0,01$, Mann-Whitney U-test). Emellett az MRTF-ek specifikus gátlószerével, a CCG-1423-mal történő előkezelés is ugyanezt eredményezte ($2,23 \pm 0,15$ vs. $1,19 \pm 0,25$, $p < 0,001$, Mann-Whitney U-test) (11. ábra, C). Végül – az angiotensin II hatás MRTF közvetítettségének igazolása után – az SMA-t SCAI-jal kotranszfektáltuk. A SCAI gátolta az angiotensin II kiváltotta SMA-promoteraktivációt ($2,6 \pm 0,43$ vs. $1,72 \pm 0,22$, $p < 0,01$, Mann-Whitney U-test) (11. ábra, D).



12. ábra: A SCAI mRNS-expressziójának csökkenése EndMT-modellben. A HUVEC-sejtekben 48 órás tumorsejt B16/F10 ACM-kezelést (aktivált kondicionált médium) követően csökkent SCAI mRNS-expresszió figyelhető meg a nem kezelt sejtekhez képest. (Mann-Whitney U-test, * $p < 0,05$)

Korábbi kísérleteink során igazolódott, hogy a SCAI-expresszió TGF- β 1-hatásra csökken, majd az EndMT-re irányuló vizsgálatokkal a tumorsejttel aktivált médium hatása TGF- β 1-függőnek bizonyult. HUVEC-sejtek B16/F10 ACM-mel (aktivált kondicionált médium) történő kezelését követően vizsgáltuk a SCAI mRNS mennyiségét (12. ábra), ami 48 órás kezelést követően szignifikánsan csökkent (Mann-Whitney U-test).

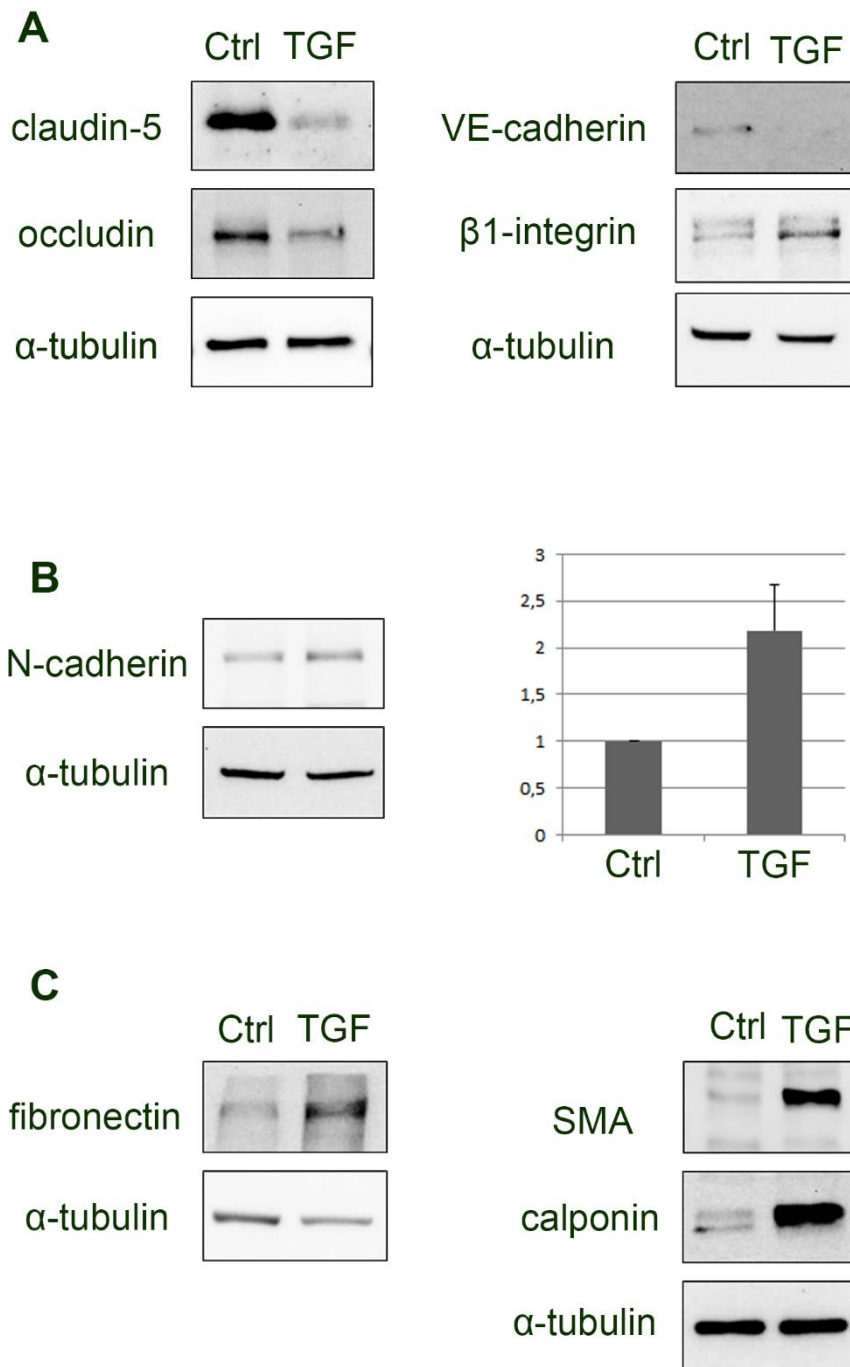


13. ábra: Fibroblastok iPS reprogramálásának hasonlósága a mesenchymalis epithelialis transzióval, mRNS-expresszió. **A-B:** A fibroblast sejtek nem expresszálnak Nanogot és E-cadherint. Az iPS-sejtek ezzel szemben kifejezett Nanog-, E-cadherin-expressziót mutatnak. **C:** A SCAI-expresszió szintje is megnő iPS újraprogramozást követően. A kísérletek során három iPS klónt használtunk, az mRNS szinteket az újraprogramozás alapjául szolgáló fibroblastsejtek (HFF-1) mRNS szintjeivel vetettük össze (** $p < 0.01$, Mann-Whitney U-test).

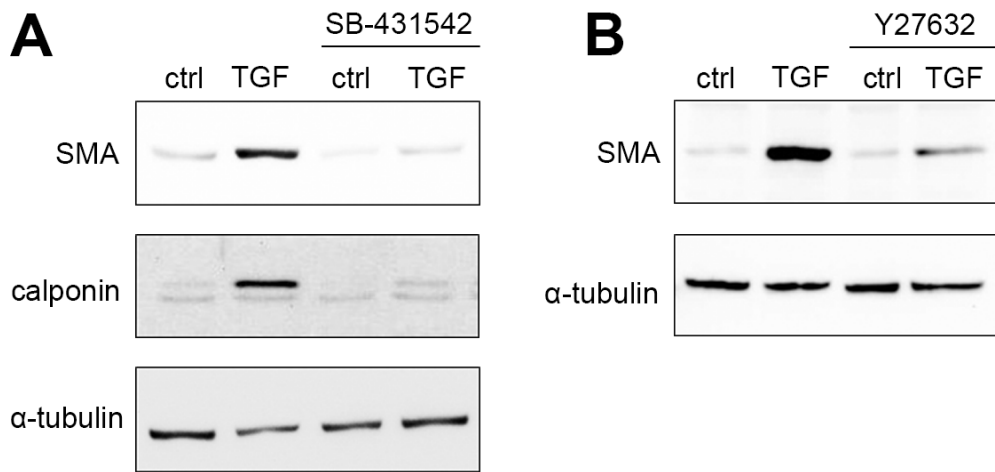
Fibroblastok iPS reprogramálásakor vizsgáltuk a sejtek expressziós mintázatát, lévén a folyamat hasonlóságot mutat(hat) a mesenchymalis epithelialis transzióhoz. Először megvizsgáltuk a fibroblastokban és az iPS sejtekben a Nanog, egy őssejtekre jellemző marker mRNS-expresszióját, ami az érett sejtekben nem jelent meg (13. ábra, A). Ugyanez a dinamika az E-cadherin tekintetében is igazolódott (13. ábra, B). Végül a SCAI-expressziót vizsgáltuk az újraprogramozott sejtekben, ami a fibroblastok csekély mértékű expressziójához képest jelentősen megnőtt (13. ábra, C).

IV.2. A primer patkány agyi endothel sejtek EndMT-jének vizsgálata

Következő kísérletsorozatunkban az agyi endothelsejtek EndMT-jét vizsgáltuk. Primer patkány agyi endothelsejteket TGF- β 1-kezelésnek vetettünk alá (14. ábra). A kezelés EndMT-t hozott létre, a claudin-5, az occludin és a VE-cadherin fehérjeexpressziója csökkent, míg a β 1-integrin-, fibronectin-, N-cadherin-expresszió nőtt (14. ábra).



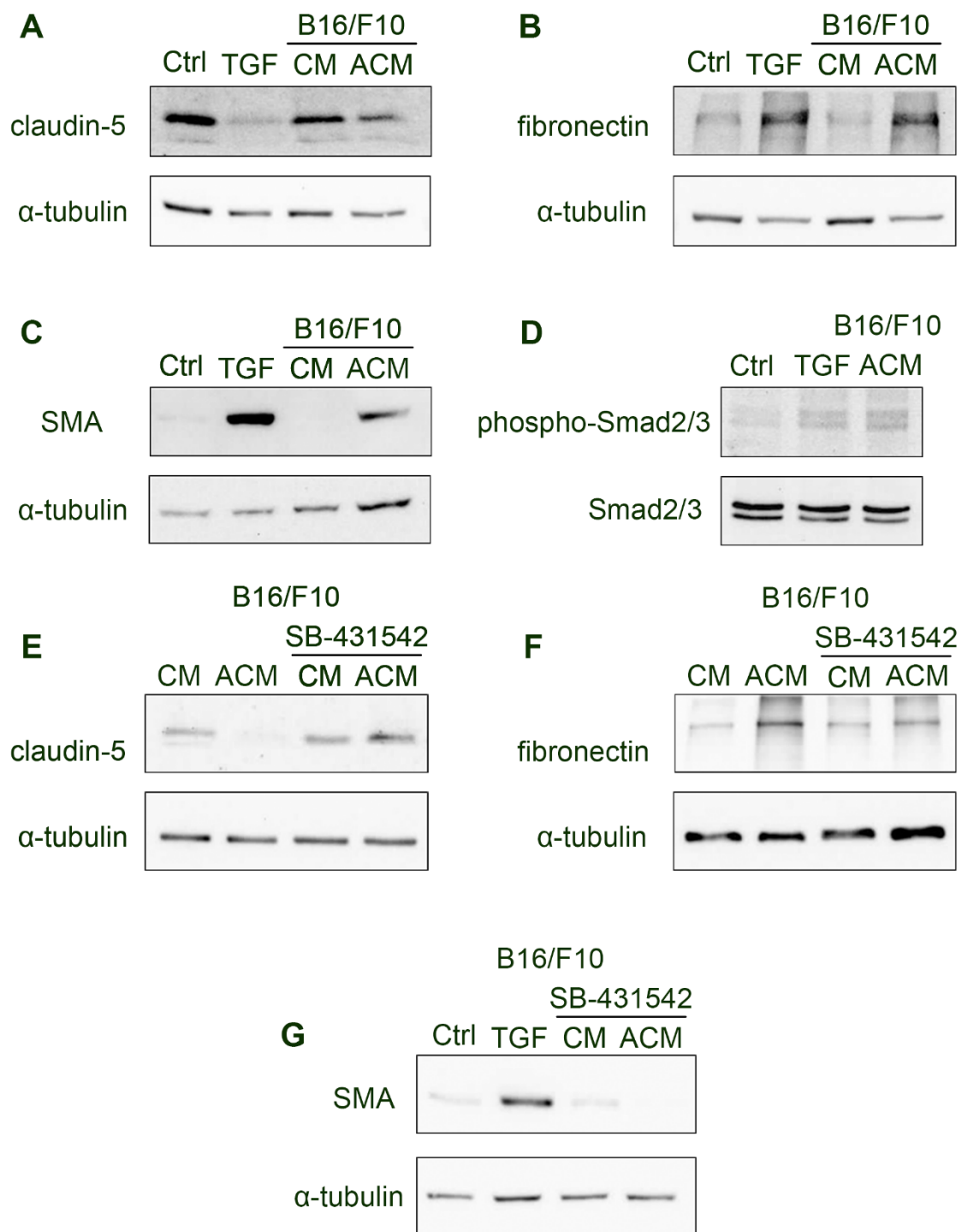
14. ábra: A TGF- β 1-kezelés primer BEC sejtekben EndMT-t hoz létre. Western blot analízis. **A:** 48 órás TGF- β 1-kezelést követően a tight és adherens junction típusú fehérjék (claudin-5, occludin, VE-cadherin) expressziója csökkent. **B:** Ezzel párhuzamosan az N-cadherin mennyisége jelentősen megnőtt. **C:** A TGF- β 1-kezelés a fibronectin-, SMA- és calponinexpresszió kifejezett növekedését okozta.



15. ábra: A TGF-β1 kiváltotta SMA-expresszió TGFβ-receptorhoz és ROCK-hoz kötött. BEC sejtek, Western blot analízis. **A:** SB-431542 előkezelést követően a TGF-β1 kiváltotta calponin és SMA-expresszió a kontrollhoz viszonyítva csökkent. **B:** Y-27632-előkezelést követően a TGF-β1 által kiváltott SMA-expresszió csökkent.

Annak igazolására, hogy a hatás TGF-β1-hoz köthető, a sejteken SB-431542-t alkalmaztunk, ami a TGF-β receptor 1 kináz ismert inhibitora. A gátlószerrel előkezelt sejtekben TGF-β1-hatásra a kifejezett SMA-, illetve calponin-expresszió-növekedés nem jött létre (15. ábra, A).

Az EMT szignalizációjában a Rho-SRF útvonal fontosságát a korábbiakban ismertettem. Annak feltérképezésére, hogy ez az EndMT-ben is így van-e, egy specifikus Rho kináz inhibitor (Y-27632) alkalmaztunk. A gátlószer gátolta a TGF-β1 által kiváltott SMA-expressziót (15. ábra, B).

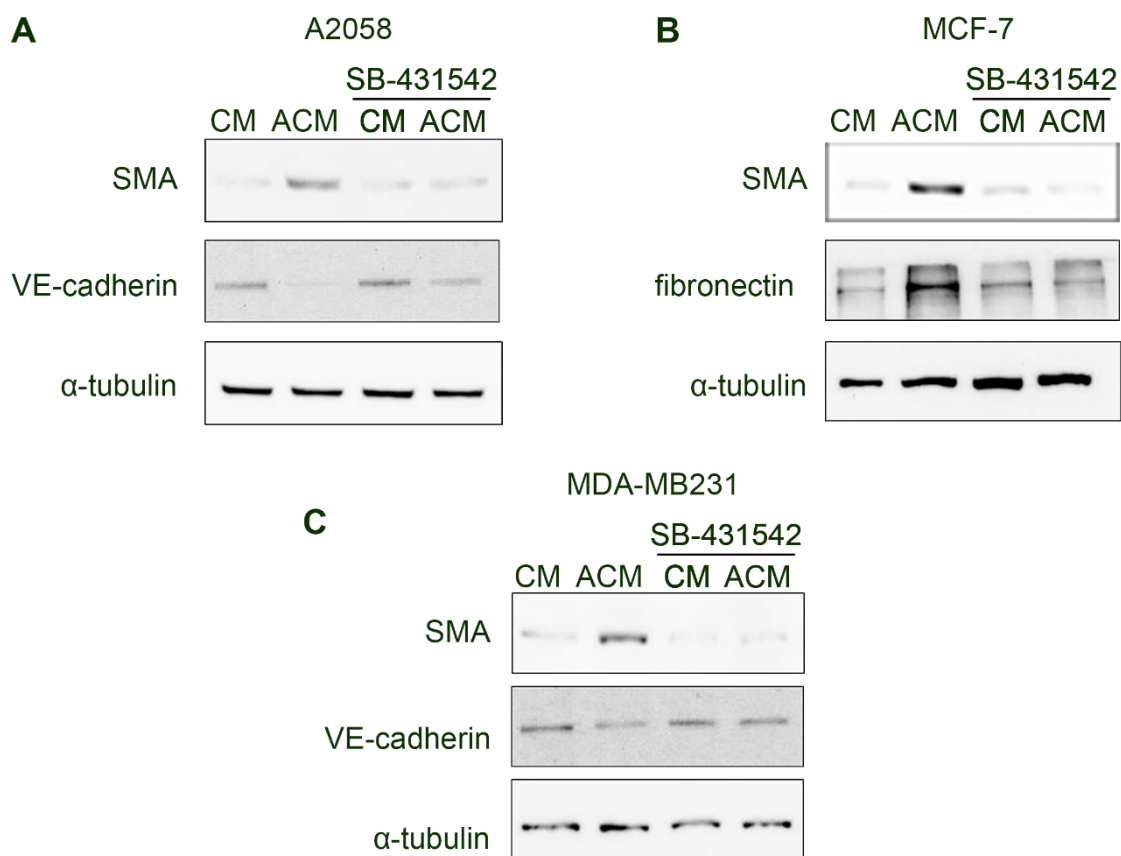


16. ábra: Az aktivált-kondicionált B16/F10-médium (ACM) RBE-sejtekben TGF- β -jelátvitellel EndMT-t hoz létre. Western blot analízis. **A-C:** A TGF- β 1-kezeléshez hasonlóan az ACM csökkentette a claudin-5-, fibronectin- és SMA-expressziót. **D:** A sejtek TGF- β 1- vagy ACM-kezelése is Smad2, Smad3 foszforilációt hozott létre. **E-G:** A

gátlószerrel (SB-431542) történő előkezelés kivédte az ACM-kezelést követő claudin-5, fibronectin, SMA-expresszió-csökkenést.

Annak felderítésére, hogy a tumorsejtek képesek lehetnek-e a fenti mechanizmussal áthatolni a vér-agy gáton, az RBE sejteket B16/F10 rágcásáló melanoma sejtekkel kondicionáltuk, majd a TGF- β 1-t hőaktiváltuk, (aktivált-kondicionált médium; ACM). Kontrollként kondicionált, de nem hőaktivált médiumot (CM) használtunk (16. ábra). Az ACM a TGF- β 1-hez hasonlóan csökkentette a claudin 5 fehérjeexpresszióját RBE sejtekben, ezt a hatást a CM nem váltotta ki (16. ábra, A). A fibronectin (16. ábra, B) és az SMA (16. ábra, C) fehérje kifejeződését a TGF- β 1 és az ACM növelte, míg a CM nem okozott ilyen választ RBE sejtekben. Mivel a tumorsejtek többféle növekedési faktort is expresszálnak, annak igazolására, hogy a látott ACM-hatás valóban a TGF- β 1 útvonal aktiválásának köszönhető, megvizsgáltuk a foszforilált Smad2-, Smad3-expressziót ACM kezelést követően (16. ábra, D). A TGF- β 1 kezeléshez hasonlóan az ACM kezelést növelte a Smad2-, Smad3 fehérjeexpressziót. Ezután a specifikus TGF- β 1-hatás igazolására inhibitoros kísérleteket végeztünk, az SB-431542 kezelés gátolta a claudin-5-expresszió kifejezett csökkenését ACM-hatás mellett (16. ábra, E). Emellett a gátlószeres kezelés megakadályozta az ACM kezelést hatására létrejövő fibronectin-, SMA-fehérjeexpresszió-növekedést RBE sejtekben (16. ábra, F, G).

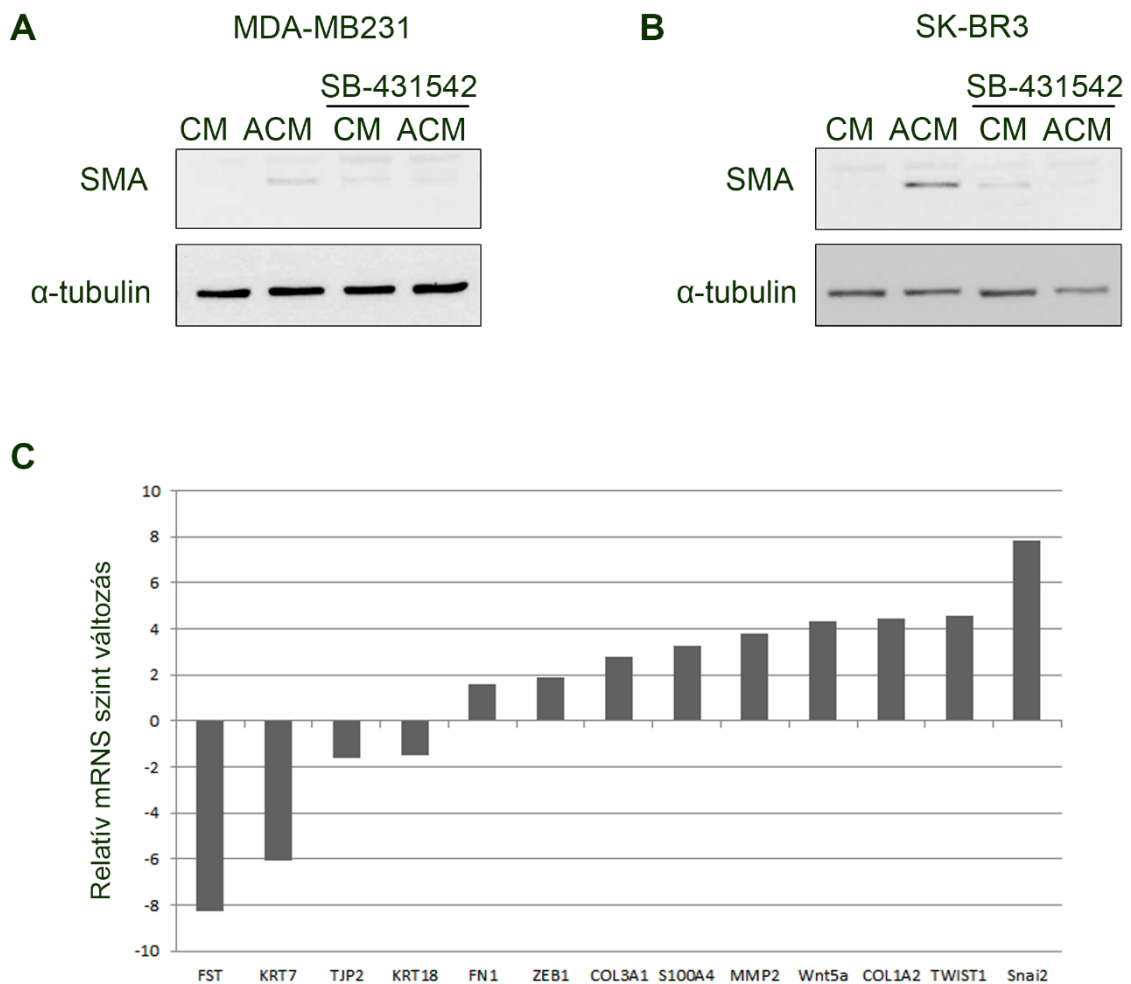
Aktivált kondicionált médiumot (ACM) hoztunk létre a fent leírtaknak megfelelően A2058 humán melanoma sejtekkel is. Az RBE sejtek ezzel történő kezelése szintén SMA-expressziót hozott létre, amit az SB-431542 előkezelés ebben az esetben is gátolt (17. ábra, A), az SMA kiváltotta VE-cadherin downregulációt a gátlószer csökkentette (17. ábra, A). Eddigi kísérleteinkhez A2058 melanoma sejteket használtunk. Annak eldöntésére, hogy a hatás mennyire ehhez a tumortípushoz kötött, két humán metasztatikus emlőtumor sejtvonallal is kondicionáltuk az agyi endothelsejtek médiumát. Az MCF-7 humán emlő adenocarcinoma sejtvonal ACM SMA-expressziót hozott létre, amit az SB-431542 gátolt (17. ábra, B). Az MDA-MB231 humán emlő adenocarcinoma sejtvonal is létrehozott SMA-expressziót, és csökkentette a VE-cadherin kifejeződést, ezeket a hatásokat az SB-431542 gátolta (17. ábra, C).



17. ábra: Az aktivált-kondicionált médium (ACM) TGF- β jelátvitel útján SMA-expressziót okoz. RBEC sejtek, SB-431542-előkezelés. Western blot analízis. **A:** Az előkezelést követően az A2058 ACM SMA-expressziót hozott létre, és csökkentette a VE-cadherin mennyiségét, ezt a hatást az SB-431542 gátolta. **B:** Az MCF-7 ACM SMA- és fibronectinexpressziót hozott létre, melyre az SB-431542 szintén gátló hatással volt. **C:** Az SB-431542 kivédte az MDA-MB231 ACM indukálta SMA-expressziót és VE-cadherin downregulációt.

HUVEC-sejteken is megvizsgáltuk az MDA-MB231 és SK-BR3 hatását, annak igazolására, hogy az emlőtumoros sejtek más endothelsejteken is elérik a fenti hatásokat. Az MDA-MB231 ACM SMA-expressziót hozott létre (18. ábra, A), csakúgy mint az SK-BR3 ACM (18. ábra, B). Ezeket a hatásokat az SB-431542 gátlószer ebben az esetben is gátolta, jelezvén, hogy az ACM SMA-fehérjeexpressziót növelő hatása TGF- β függő. A melanoma sejtek HUVEC-re kifejtett közvetlen hatását publikus génexpressziós adatbázis adatai alapján *in silico* vizsgáltuk. A Gene Expression Omnibus (GEO) publikus

adatbázisában fellelhető egy HUVEC-sejtekre jellemző mRNS expressziós profil HUVEC és 10205 Lu humán metasztatikus melanomasejtek kultúrájában. Ez a ko-kultúra modellezheti a tumoros sejtek endothelsejtekkel való találkozását a kapilláris hálózatban. A HUVEC-sejtek mRNS mintázata a következőképpen változott: több endothel marker (KRT7, KRT18, TJP2) expressziója csökkent az FST-vel együtt, ami EMT/EndMT antagonistája. Ugyanakkor az EndMT markerek (FN1, COL3A1, S100A4, MMP2, COL1A2) és transzkripciós regulátorok (ZEB1, Wnt5a, TWIST1, Snai2) expressziója megnő (18. ábra, C). Ezek együttesen jelezhetik, hogy melanoma sejtek jelenlétében EndMT-re jellemző változások mennek végbe a HUVEC-sejtekben.



18. ábra: Az aktivált-kondicionált médium (ACM) TGF- β jelátvitel útján SMA-expressziót hoz létre. HUVEC-sejtek, SB-431542-előkezelés. **A:** Az előkezelést követően

az MDA-MB231 ACM SMA expressziót hozott létre, ezt a hatást az SB-431542 gátolta. Western blot analízis. **B:** Az SK-BR3 ACM okozta SMA-expressziót az SB-431542 szintén gátolta. Western blot analízis. **C:** Az 1205Lu humán metasztatikus melanoma sejtek és HUVEC ko-kultúrája során a génexpressziós mintázat – EndMT-re jellemző eltéréseket mutatva – megváltozik.

V. Megbeszélés

Munkám során a sejtplaszticitás két hasonló folyamatát vizsgáltam. Mind az epithel, mind az endothelsejtek mesenchymalis transitiója fontos patológiás folyamatokban is részt vehet. Kísérleteink első részében a közelmúltban leírt MRTF-gátló kofaktor, a SCAI nevű fehérje EMT-ben való részvételét vizsgáltuk, míg ezt követő kísérletsorozatunk az EndMT metastasisképzésben való szerepére irányult.

Munkacsoportunk a korábbiakban LLC-PK1, proximalis tubulus sejteken végezte vizsgálatait. A TGF- β 1-kezelés szubkonfluens sejteken epithelialis mesenchymalis transitiót hozott létre, növelte a sejtekben az SMA fehérjeexpresszióját. Jelen kísérleteinkben ugyanezt a TGF- β hatást ismételtén demonstrálva azon folyamatokat vizsgáltuk, amelyek a SCAI fehérje jelenlétével álltak összefüggésben. Kérdéseink elsősorban arra irányultak, hogy a SCAI fehérje képes-e a TGF- β hatásait gátolni. Háromnapos TGF- β 1-kezelést követően a SCAI-t stabilan expresszáló LLC-PK1 sejtekben az SMA-expresszió minimális mennyiségben volt megfigyelhető a kontrollsejtekhez képest. Az SMA mellett a – TGF- β 1-hatásra szintén megjelenő – calponin- expressziót is megvizsgáltuk SCAI jelenlétében. A calponinexpresszió az SMA-hoz hasonlóan SRF- és MRTF-függő, a hatást a promoter CARG boxán éri el (Miano és mtsai 2000, Crider és mtsai 2011). Hipotézisünknek megfelelően a calponin-expresszió a SCAI-t stabilan expresszáló sejtekben gyengébb volt. Ehhez hasonló hatást láttunk a CTGF expressziójában, ami szintén – az SRF-en keresztül – CARG-függő, vesefibrosist jelző marker (Burns és mtsai 2006, Sun mtsai 2006, Muehlich és mtsai 2007). Eredményeink igazolták, hogy a SCAI több CARG által közvetített TGF- β 1-hatást is gátol. Emellett a TGF- β 1 által kiváltott E-cadherin-csökkenést a SCAI gátolta, és az LLC-PK1 epithelsejtek megőrizték epithel jellegüket. Glioma sejteken végzett kísérletek alapján igazolódott, hogy a SCAI a Wnt/ β -catenin útvonal target génjeire hat, így a Snailre is, mely az E-cadherin-expresszió fontos szabályozója (Batlle és mtsai 2000, Chen és mtsai 2014).

Az MRTF-ek overexpressziója önmagában is képes az SMA-promoter aktiválására (Fan mtsai 2007). Az MRTF-ek az SMA-expressziót az SRF kofaktoraként növelték, a SCAI az MRTF kofaktoraként tumor inváziós modellben gátolta annak SRF aktiváló hatását (Wang mtsai 2001, Wang mtsai 2002, Cen és mtsai 2003, Miralles F 2003, Brandt mtsai

2009). Kísérletünk során igazolódott, hogy a SCAI csökkenti az MRTF-A és MRTF-B által kiváltott SMA-promoteraktivációt tubulus epithelsejtekben.

A kis GTPáz-ok MRTF-en keresztüli SMA-promoter aktivációja ismert volt (Fan mtsai 2007, Sebe és mtsai 2008), a SCAI-t stabilan expresszáló sejtekben ez a hatás is csökkent. A speciális, 152 bázispár hosszúságú – két CArG, és TCE doménnel rendelkező – SMA-promoterrel végzett kísérleteinkkel igazoltuk, hogy a TGF- β 1 és az MRTF-ek promoteraktiváló hatását a SCAI CArG domén specifikusan gátolja. A SCAI az SMA-promoter szabályozásának az MRTF kofaktoraként kulcsfontosságú szereplője. Következő megfigyelésünk, miszerint a TGF- β 1-kezelés gátolja a tubulus sejtekben jelen lévő SCAI fehérjeexpressziót, előrevetíti annak lehetőségét, hogy egyes patológiás állapotokban, *in vivo* is csökken a SCAI mennyisége. Transzgenikus TGF- β 1-et overexpresszáló egérmodellben a veseszövet SCAI mRNS mennyisége emelkedett volt. UUO modellben is megvizsgáltuk a SCAI fehérje mennyiségét, ami az obstruált veséből származó mintákban szignifikánsan alacsonyabb volt, mint az egészséges veseszövetből származó mintákban. További adatokkal szolgált hipotézisünk megerősítéséhez, hogy vesetranszplantációs modellben a SCAI fehérje mennyisége csökkent. A SCAI-expresszió a fentiek alapján az endothel,-epithel fenotípushoz volt köthető, amit alátámasztott az az eredmény is, hogy iPS-modellben – mely a MET folyamatához hasonló – az E-cadherin mellett a SCAI-expresszió is nőtt.

Dolgozatom során főként a SCAI sejtplaszticitásban, vesefibrosisban betöltött szerepét kívántam bemutatni, amely fontos kiegészítés az a nemzetközi irodalomban eddig ismertektetett adatoknak. A SCAI-t a tumoros sejtek inváziójának gátló fehérjéjeként írták le (Brandt mtsai 2009), több humán mintából származó tumoros mintában csökkent mennyiségben volt jelen, így pl. emlőtumorban, nyelőcső-laphámrákban, világossejtes veserákban (Fintha és mtsai 2013, Kressner és mtsai 2013, Li és mtsai 2015, Lin L 2015). Ugyanakkor Wilms-tumorban, valamint colorectalis carcinomában a SCAI-expresszió növekedett. Ennek hátterében a Wilms-tumor embrionális eredete, illetve a vastagbélrákban előforduló őssejtek állhatnak, a pontos mechanizmusok azonban egyelőre ismeretlenek.

A SCAI sejten belüli működésére, hatásaira vonatkozó ismereteink ez ideig korlátozottak. Az MRTF-SRF útvonal gátlásán túl, a közelmúltban több újabb adat is ismertté vált. Az SWI/SNF emlősökben egy kromatin remodellációt szabályozó, tumorszupresszor

fehérjekomplex. Ezt a SCAI az SWI/SNF BRM alegységén keresztül szabályozza, így hatással lehet a tumorsejtek invazivitására (Kressner mtsai 2013). Emellett a SCAI a heterokromatin protein 1 (HP1) fehérjét – ami a CBX5 gén terméke – is befolyásolta (Nozawa és mtsai 2010). A SCAI kölcsönhatásba lépett a KDM3B-vel is, ami egy H3K9me₂ hiszton demetiláz (Brauchle és mtsai 2013). Érdekes módon, a SCAI aminosavszerkezete tartalmaz az 526-532 közötti pozícióban egy PIP boxot, a következő szekvenciával: Q-x-[x]-I/L/V-x-[x]-F/Y/W/H-F/Y/W/H, ami több PCNA-val kölcsönhatásban álló fehérjében is megtalálható (Moldovan és mtsai 2007). A PCNA-hoz kötődő fehérjék részt vesznek a DNS-replikáció és a kromatinállomány szervezésében (Mailand és mtsai 2013). A PCNA többféle kromatinfelépítést szabályozó fehérjéhez is köt, így például a géncsendesítést előidéző HDAC1-hez (Histone deacetylase 1), az említett HP1-hez, illetve WSTF-SNF2H (Williams syndrome transcription factor-SNF homologue) fehérjéhez, ami a kromatin újraszerveződéshez járul hozzá (Murzina és mtsai 1999, Milutinovic és mtsai 2002). Ezeknek a fehérjekölcsönhatásoknak a példáján keresztül látható, hogy a SCAI fontos szerepet tölt be a kromatinállomány szerveződésében. Ezekkel a megfigyelésekkel összhangban a SCAI a BRCA1 fehérjét a sérülés helyéhez segítve a DNS dupla hélixének javításában is részt vehet (Hansen és mtsai 2016, Isobe és mtsai 2017). A két fehérje kapcsolata az EMT folyamatában is fontos lehet, hiszen a BRCA1 is gátolja az EMT folyamatát (Bai és mtsai 2014).

További kísérleteinkben az EndMT egy lehetséges előfordulását vizsgáltuk a metastasisképződés során. A metasztatikus sejtek a célszervbe érve az extravazációhoz az endothelsejtekkel interakcióba lépnek. A tumorsejtek transendothelialis migrációjához az endothelsejtek kapcsolatainak károsodása szükséges, majd átjutva ezen a határoló rétegen makroszkópos tumormasszát hozhatnak létre. A TGF- β 1-kezelés – specifikus módon – agyi endothelsejteken létrehozta a transzmigációt elősegítő sejt-sejt közötti kapcsolatokat szétbontó hatást, amelynek részeként nőtt a β 1-integrin-, N-cadherin-, fibronectin-expresszió. Az EMT során klasszikusan leírt „cadherin switch” – lévén az endothelsejtek E-cadherin-expressziója alacsony az epithelsejtekkel szemben – ebben az esetben nem volt megfigyelhető, de az N-cadherin-expresszió megjelenése mellett a VE-cadherin-kifejeződés csökkent (Navarro és mtsai 1998). A VE-cadherin adherent junction típusú fehérjeként összeköti a szomszédos endothelsejteket,

intracellularisan pedig catenineken, illetve egyéb fehérjéken keresztül az actin cytoskeletonhoz kötődik. A tumorsejtekre jellemző az N-cadherin termelés (Qi és mtsai 2005, Strell és mtsai 2008), ez elősegíti az endothelsejtekhez való gördülést és megtapadást. A fibronectin a daganatsejtek által termelt β 1-integrin célpontja lehet, mely szintén az adhéziót segíti elő (Barthel és mtsai 2013). Prostatatumor metasztatikus sejteinek β 1-integrin-depléciója csökkentette azok fibronectinhez, endothelsejtekhez való adhézióját, csökkentette az extravazációt (Reymond és mtsai 2012), HUVEC-sejtekben a β 1-integrin szintén szükséges volt a metasztatikus sejtek kitapadásához (Price EA 1996). A kis GTP-ázok az EMT-hez hasonlóan az EndMT folyamatában is fontos szabályozók, és a tumorsejtek adhéziójához is szükségesek (Mihira és mtsai 2012, Reymond mtsai 2012, Wilhelm és mtsai 2014). A RhoA tüdőcarcinoma-sejtek agyi endothelsejtekkel való kapcsolódásakor aktiválódott, fokozta az actomyosin kontraktilitást és actin-újrászerveződést mikrovaszkuláris környezetben (Li és mtsai 2006). A Rho/ROCK útvonal gátlása agyi endothelsejtekben megelőzte a tight junction típusú kapcsolatok felbomlását (Wilhelm és mtsai 2007, Fujii és mtsai 2012). Ez a szignalizáció EMT-ben és EndMT-ben is az SMA-expresszió fontos szabályozója (Mihira mtsai 2012). A TGF- β 1-kezelés agyi endothelsejteken fokozta az SMA-expressziót, növelte a sejtek myofibroblast jellegét, kontraktilitását, ami a TEM egyik szükséges feltétele (Stroka és mtsai 2012). A Rac1 is szabályozza a TEM-et, az adherens kapcsolatok stresszrost mediálta húzásának növelésével (Cain és mtsai 2010). A Focal Adhesion Kinase (FAK) aktivációjáért a növekedési faktorok és integrinek felelősek, így befolyásolva a vascularis permeabilitást. Az aktivált FAK a VE-cadherin és a β 1-catenin disszociációját, s ezáltal az endothel sejtek kapcsolatának felbomlását is előidézhetheti (Chen és mtsai 2012). A FAK gátlása egérmodellben gátolta a tumorprogressziót (Schwock és mtsai 2010). A metasztázisképzést a FAK gátlása az endothel sejtek barrierfunkciójának növelésével csökkentette (Jean és mtsai 2014). Vastagbél adenocarcinoma sejtek endothelhez való kitapadása aktiválta az ERK-et és a p38-at. Az ERK szignalizáció ezt követően a VE-cadherin/ β -catenin komplex felbomlásához vezet, míg a p38 okozta változások stresszrostok kialakulását eredményezik a myosin light chain (MLC) foszforilálásával (Tremblay és mtsai 2006). HUVEC-sejteken melanoma sejtek közvetítette p38 MAP kináz szignalizáció útján VE-cadherin felbomlás volt látható, ami növelte a létrejövő gap-ek számát, s ezáltal fokozta a TEM-et (Khanna és

mtsai 2010). A p38 és JAK2-STAT5 útvonal fontosságát *in vivo* kísérletek is alátámasztották, egérmodellben a colon carcinoma sejtszűrés extravazálódott a tüdőben (Wolf és mtsai 2012). Szintén *in vivo* megfigyelés, hogy a premabilitást növelő FSP-1 expressziója és a ROCK1 aktivációja diabeteses egérmodellben, fokozza az adhéziós molekulák expresszióját (Luo és mtsai 2015). A rosszindulatú daganatsejtek erekből kilépésének fontos lépése az erek bazális membránjának áttörése. Ehhez hozzájárulhat a lokális sejtek MMP9-expresszió növekedése a premetasztatikus tüdőben, mely hatást *in vivo* kísérletekben a primer tumorsejtek hozták létre (Hiratsuka és mtsai 2002). Az endothel sejtek MMP2 expressziójának gátlása pedig csökkentette az MDA-MB231 sejtek TEM-jét (Kargozaran és mtsai 2007). A vér-agy gát permeabilitása bakteriális infectio hatására megnőhet (Kim és mtsai 2015), a hatást a Snail1 segítségével jött létre.

Tumorsejtekkel kondicionált, majd aktivált médiummal végzett kísérleteink B16/F10 sejtekben fibronectin és SMA-expressziót hoztak létre, miközben csökkent a claudin-5-expresszió. A tumorsejtek több típusával sikerült SMA-expressziót, VE-cadherin downregulációt elérni. Ezek az eredmények megfeleltek a TGF- β 1-kezeléskor látottaknak. Gátlószeres kísérleteinkkel igazoltuk, hogy az ACM-kezelés a TGF- β 1 útján hatott. Szintén fontos volt, hogy önmagában a vizsgált endothel sejteken a TGF- β 1-re jellemző hatást a kondicionált médium nem hozta létre. A kondicionált médiumokon a TGF- β 1-et aktiváló hőkezelésre volt szükség a fenti hatások eléréséhez (Brown és mtsai 1990). Ezek mellett a Smad2, Smad3 foszforilációja is bekövetkezett, ami szintén a TGF- β 1 útvonalon jön létre.

Teti és munkatársai adatai alapján a TGF- β 1 elősegítette az endothel-tumorsejt adhéziót az endothel-morfológia megváltoztatásával melanoma sejtekben. Kísérleteink során hasonló hatást láttunk B16/F10 sejtekben, és igazoltuk, hogy a melanoma sejtekben a megnőtt a transendothelialis migráció.

A TGF- β mint az EMT és EndMT klasszikus szabályozó molekulája, kettős szerepet játszik a metastasis képzés során: egyrészt növeli a tumorsejtek invazív migrációs képességét, másrészt „előkészíti” az endothel sejtek egy csoportját, ezáltal biztosítva a daganatsejtek extravasációját. Tumoros betegekben a TGF- β szint megemelkedhet (Krasagakis mtsai 1998), illetve metastasis létrejöttében a TGF- β hirtelen emelkedését is leírták (Dasgupta és mtsai 2006).

Az eddigi kísérleteink alapján megállapítható, hogy a tumorsejtekkel kondicionált, aktivált médium az endothelsejteken olyan fenotípus-változáson mennek át, mely endothelialis mesenchymalis transitiónak megfelelő képet mutat. Az endothel program csendesítése, a fibrotikus és részben a myogen program aktivációja hozzájárul a sejtplaszticitás ezen formájához. A változások – még ha nem is eredményezik myofibroblastok létrejöttét – elegendőek lehetnek a metasztázis folyamatának elősegítéséhez. Az EndMT szükséges lehet a daganatsejtek intravasatiojához is (Anderberg és mtsai 2013), bár a daganat növekedéséhez szükséges érújdonképződés során létrejövő endothelréteg alapvetően gyengébb sejtkecsolatokkal bír, így áteresztőbb lehet az újonnan érkező daganatsejtek számára (Dudley 2012). Érdekes módon, a közelmúltban leírt vizsgálatok szerint „emlőtumor-specifikus” endothelsejtek, illetve egészséges endothelsejtek TGF- β -kezelésre eltérő SMA-expresszióval reagáltak. A folyamatot többek között a bFGF (Basic fibroblast growth factor) is szabályozhatja (Xiao és mtsai 2015). Nyirokerekek emlőtumoros inváziójakor is megfigyelték a folyamat EndMT jellegét, valamint a ZEB1 szerepét, melynek EMT-t indukáló hatása ismert (Vonach és mtsai 2011). Az MDA-MB231 emlőtumoros sejtek endothel sejteken MLCK (Myosin light chain kinase) aktivációt hoztak létre, ezzel növelve az endothel sejtek kontraktilitását (Khuon és mtsai 2010). Fontos különbséget jelenthet azonban a különböző szervekben jelen lévő eltérő jellegű endothel szerkezete. A csontvelői érálózat (Kopp és mtsai 2005), vagy a máj sinusoid endothelsejtjei (Lalor PF 2006) feneztráltságuk révén kisebb akadályt jelentenek a rosszindulatú daganatsejtek számára. Ezzel szemben a tüdőkapillárisok vagy a vér-agy gát (Weil és mtsai 2005) tömött határolóelemet teremtenek. Ezek leküzdéséhez többféle mechanizmus is szükséges lehet, amelynek egyik eleme a proteolitikus enzimek kibocsátása lehet. Ebben a folyamatban a TGF- β által szabályozott szepráz jelentőségét már korábban leírták (Fazakas mtsai 2011, Tulley és mtsai 2014). A tumorsejtek N-cadherin expressziója a „rolling”-ban és az endothelsejtekhez való kapcsolódásukkor játszhat szerepet (Qi mtsai 2005, Strell mtsai 2008). Szintén helyi hatás lehet az extravasatiókor a tumorsejtek és vérlemezkék által felépített mikrotrombusok hatására bekövetkező TGF- β termelődés is (Labelle és mtsai 2011). Ezt támaszthatja alá a HUVEC és melanoma sejtes ko-kultúrák vizsgálata során tapasztalt génexpressziós változás, amelynek során a HUVEC és melanoma sejtek közvetlen módon hatnak egymásra. Harmadik „eszközként” a primer

tumorsejtből származó citokinek – így pl. a TGF- β - az endothelsejteken gyengébb ellenállású pontokat hozhatnak létre, amelyeket a metasztatikus sejtek felismerhetnek az érfalon való gördülés során (Stoletov és mtsai 2010, Hiratsuka és mtsai 2011).

A metasztázisképzésben viszonylag új elképzelés az úgynevezett „premetasztatikus niche” elmélete, amely szerint a célszerv parenchymájában különböző citokinek, vagy akár sejtek előkészítik a környezetet a metasztatikus sejtek számára. A csontvelői eredetű VEGFR1⁺ (Vascular endothel growth factor receptor 1) hematopoietikus progenitor sejtek, illetve a lokális sejtek fibronectin expressziója a közvetlen mikrokörnyezet megváltozásához vezet, integrinek, kemokinek aktiválódnak a „niche” létrejöttkor. Az EndMT ehhez a folyamathoz ECM-proteinek expressziójával járulhat hozzá. A periostin és a tenascin C is szükséges a metasztázisképzéshez (Malanchi és mtsai 2011, Oskarsson és mtsai 2011). Az embrionális fejlődés során lejátszódó EndMT periostin termeléssel járt együtt (Norris és mtsai 2008, Monaghan és mtsai 2016). Egerekben a szívfejlődéskor lejátszódó EndMT tenascin C-expresszióval jár együtt (Zhang és mtsai 1993), a myofibroblastok TGF-függő módon termelik ezt a fehérjét (De Wever és mtsai 2004). A primer tumor citokinjei közül a VEGF az érfal permeabilitás befolyásával vesz részt a premetasztatikus niche kialakításában, a VE-cadherin típusú kapcsolatok felbontásával (Dejana és mtsai 2008). A VEGF permeabilitást növelő hatása p38-függő folyamat (Bodor mtsai 2012). Pancreas tumorok VEGFR1 aktivációja EMT-szerű szignalizációt hozott létre a Snail, Twist és Slug aktivációjával (Yang és mtsai 2006), endothelsejteken a hatás ehhez hasonló, EndMT-t indukáló lehet. A TGF- β és a VEGF – aminek expresszióját a TGF- β erősíti (Krishnan és mtsai 2015) – az EndMT révén együttesen fokozhatják az érfal átteresztőképességét. A tumorsejtek ezenfelül adhéziójukat követően egy további úton, a 12(S)-hydroxyeicosatetraenoic savat (12(S)-HETE) termelnek (Honn és mtsai 1994), ami a nyirokerek intravazációjakor EndMT-t hozott létre (Vonach mtsai 2011). Mikrovaszkuláris környezetben a 12(S)-HETE reverzibilis módon megváltoztatta a sejtközi kapcsolatokat, valamint a cytoskeleton szerkezetét (Tang és mtsai 1993). Mesangialis sejtekben megfigyelték, hogy a TGF- β és a 12(S)-HETE egymásra is hatással van, kölcsönösen fokozzák egymás expresszióját (Kim és mtsai 2005). Egy nemrég megjelent közleményben *in vivo* is sikerült kimutatni az EndMT-t metasztázis során egerek tüdejében. A tüdő endothelsejtjeiben az EndMT-t megelőzően NO deficiens állapot alakul ki, amelyet az endothel sejtek EndMT-nek megfelelő

fenotípus változása követ (Smeda és mtsai 2018). Ezek az *in vivo* megfigyelések megerősítik *in vitro* kísérleteink alapján felállított hipotézisünket.

VI. Következtetések

Munkánk célkitűzéseit két fő témakörben határoztuk meg, ennek megfelelően következtetéseinket is ezek alapján ismertetem:

A SCAI szerepe EMT-ben és vesefibrosisban (19. ábra)

1. A SCAI fehérje gátolta a TGF- β 1 kezelés okozta SMA-promoteraktivációt LLCPK1 sejteken. A SCAI-t tartósan expresszáló sejtekben a TGF- β 1 okozta SMA, calponin és CTGF fehérjeexpresszió-növekedés kisebb volt a kontroll sejtekhez képest, a TGF- β 1 okozta E-cadherin fehérjeexpresszió-csökkenés pedig mérsékeltebb volt a kontrollsejtekhez képest. A SCAI tehát több TGF- β 1 közvetített hatást is gátol epithelsejtekem.

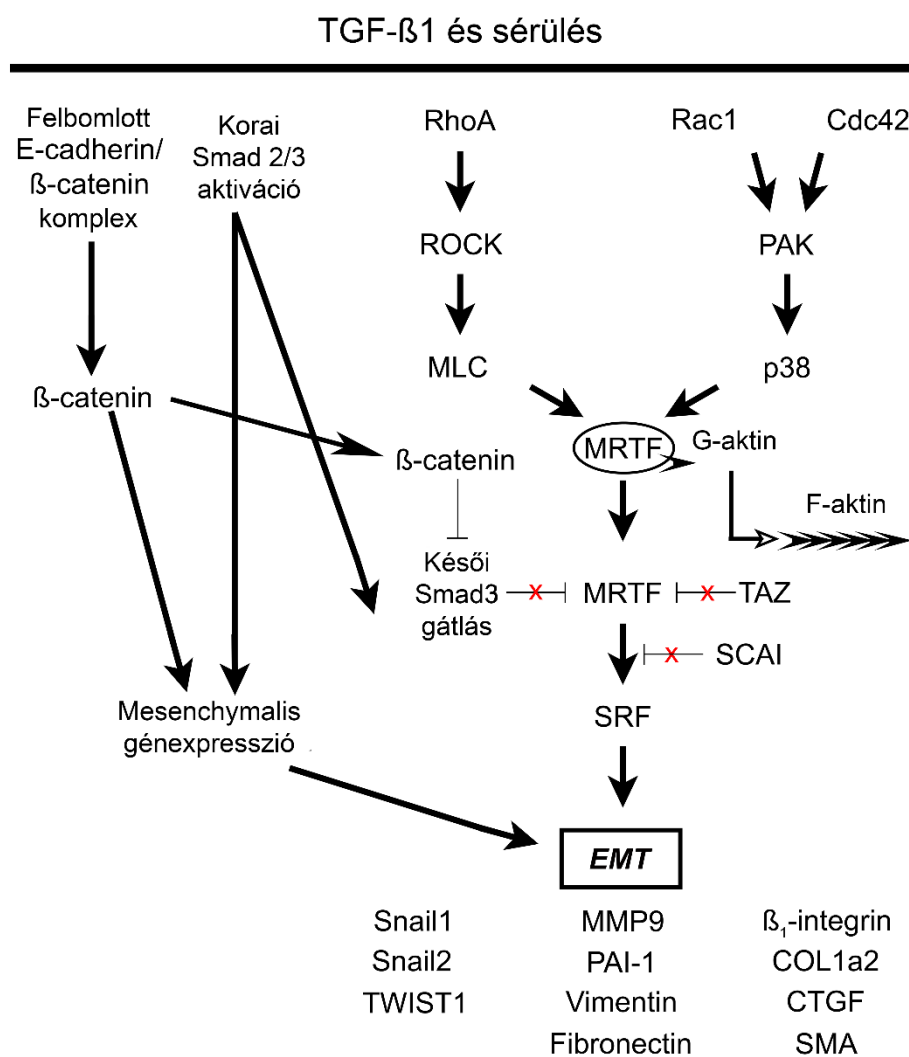
LLC-PK1 sejteken SMA-promoter-transzfekciót követő angiotensin-II kezelés SMA-promoterexpresszió-növekedést hozott létre, ezt a hatást a candesartan gátolta. A domináns negatív MyoC-kotranszfekció vagy az MRTF-specifikus gátlószer CCG1423-előkezelés csökkentette az SMA-promoteraktivitás-növekedést. A SCAI kotranszfekciója szintén csökkentette az SMA-promoteraktivitás-növekedést. Az MRTF az angiotensin II függő SMA-promoteraktivitást is közvetíti, mely hatást a SCAI gátolja.

2. A SCAI-t tartósan expresszáló sejtekben az SMA és az MRTF-A, illetve MRTF-B kotranszfekciója során az MRTF-ek SMA-ra gyakorolt promoteraktiváló hatása csökkent volt. A kis GTPáz-molekulák (Rho, Rac, Cdc42) mindegyike SMA-promoteraktivitás-növekedést hoz létre, ezt a hatást a SCAI jelenléte csökkentette. Egy 152 bázispár hosszúságú, csak két CarG- és a TCE-elemet tartalmazó SMA-promoter és a SCAI kotranszfekciója esetén a TGF- β 1-kezelés, az MRTF-A vagy MRTF-B kotranszfekció csökkent mértékű SMA-promoteraktivitás-növekedést okozott, igazolván, hogy ezt a hatást a SCAI CARG specifikusan gátolja. A SCAI az SMA-promotert az MRTF kofaktoraként szabályozza.

3. LLC-PK1 sejtek háromnapos TGF- β 1 kezelése esetén a SCAI-fehérjeexpressziója csökkent, C57BL/6 egereken végzett UUO kísérlet során az obstruált vesékben a SCAI-fehérjeexpressziója csökkent, az SMA-fehérjeexpresszió nőtt. LBNF1-LEW

patkányokban végzett allograft-rejekciós modelljében az allograftokban a donorok ép veséjéhez képest az SMA-fehérjeexpresszió a transzplantációt követő 4. és 7. nap után fokozatosan nőtt, míg a SCAI-fehérjeexpresszió meredeken csökkent.

4. HUVEC-sejtek EndMT modelljében, a tumorsejtvonallal aktivált-kondicionált médium hatására a SCAI mRNS expresszió csökkent a kontrollhoz hasonlóan. Fibroblastok iPS- reprogramálásakor a Nanog, E-cadherin és SCAI-expresszió megnőtt. Mindezek alapján a SCAI-expresszió inkább az endothel és epithel fenotípusra jellemző, mesenchymalis jellegű sejtekben expressziója csökken.



19. ábra: A SCAI fehérje szerepe az EMT folyamatában

Az EndMT és a metastasisképződés kapcsolata

1. Primer patkány agyi endothelsejtekben TGF- β 1-hatásra a claudin-5, occludin, VE-cadherin fehérjeexpresszió csökkent, a β 1-integrin, N-cadherin-expresszió nőtt. Gátlószeres kísérletekkel igazoltuk, hogy a hatás TGF- β -receptorhoz és ROCK-hoz kötött.

2. A TGF- β -kezeléshez hasonlóan RBE sejteken melanomasejtek aktivált-kondicionált médiuma csökkentette a claudin-5 expressziót, és növelte a fibronectin és SMA-expressziót. A foszforilált Smad-2,3- expresszió a kontrollhoz képest nőtt, alátámasztva, hogy a hatás TGF- β által közvetített az endothelsejtekben. A hőaktiválás nélküli kondicionált médiumok nem hozták létre a TGF- β kezelésre jellemző hatásokat. Gátlószeres kísérletekkel szintén alátámasztható volt a TGF- β 1-útvonal szerepe az ACM okozta claudin-5, fibronectin, SMA expresszió változásban.

Többféle tumorsejt (melanoma, emlőtumor) aktivált-kondicionált médiumával is vizsgálatokat végeztünk, melyek ACM-e SMA-expressziót hoztak létre RBE sejtekben, és VE-cadherin downregulációt okoztak, mely hatásokat a TGF- β 1 specifikus gátlószer szignifikánsan csökkentette. Ezek alapján megállapítható, hogy többféle daganatsejt aktivált-kondicionált médiuma is TGF- β -szignalizáció útján okozott EndMT jellegű változást RBE-sejteken.

Az RBE sejtek mellett egyéb endothelsejten (HUVEC) is vizsgáltuk a tumoros sejtek ACM-jének hatását, ami növelte az SMA-fehérjeexpressziót, s amely hatást a TGF- β 1-specifikus gátlószer ebben az esetben is szignifikánsan csökkentette. Génexpressziós adatbázisban vizsgálva a HUVEC-sejtek és 1205Lu humán metasztatikus melanomasejtek ko-kultúrája EndMT-re jellemző változásokat hozott létre a HUVEC-sejteken.

VII. Összefoglalás

A sejtplaszticitásnak két egymással sok hasonlóságot mutató formája az epithelialis-mesenchymalis-transitio (EMT) és az endothelialis-mesenchymalis-transitio (EndMT), kísérleteink során ezek egy-egy példáját kívántuk vizsgálni.

A vesefibrosis során létrejövő tubulointerstitialis fibrosis egyik eleme a tubulus epithelsejtjeinek EMT-je. A közelmúltban leírták, hogy a suppressor of cancer cell invasion (SCAI) nevű fehérje az MRTF működésének gátlása révén a tumorprogresszió mértékét csökkenti. Ezért tubulus EMT modelljeinkben kívántuk vizsgálni e fehérjét. LLC-PK1-sejteken a TGF- β 1 által előidézett SMA, calponin és CTGF-expresszió növekedését, és az E-cadherin-degradációt a SCAI fehérje jelenléte gátolta. A SCAI szintén gátló hatású volt az MRTF-A, MRTF-B, Rho, Rac1 és Cdc42 okozta SMA-promoteraktivitás-növekedésre. A TGF- β 1-kezelés LLC-PK1-sejteken csökkentette a SCAI-expressziót. *In vivo* modelljeinkben hasonló változásokat tapasztaltunk; mind UUU-, mind pedig allograft-rejekciós modellben az érintett vesékben az SMA-expresszió növekedését, és a SCAI-expresszió csökkenését észleltük. Megállapítottuk továbbá, hogy az MRTF-ek szabályozzák az SMA-promoter angiotensin-II-függő aktivitását, ezt a hatást a SCAI szintén gátolta. Tekintettel arra, hogy a fibroblasztok iPS sejtekké történő reprogramálása egyfajta mesenchymalis-epithelialis transitionnak feleltethető meg, e modellben is vizsgáltuk a SCAI expresszió változását: a Nanog- és az epithelmarker E-cadherin expresszióval párhuzamosan a SCAI-mRNS mennyisége is megnőtt. Vizsgálatainkkal igazoltuk, hogy a SCAI-expresszió az epithel-, endothel fenotípushoz kötött, és a SCAI fehérje egyes patológiás állapotokban downregulálódik. Az MRTF kofaktoraként a SCAI a jövőben, diagnosztikai, prognosztikai vagy akár terápiás szempontból is fontos célpont lehet fibrózissal járó, illetve daganatos betegségekben.

Agyi endothelsejteken vizsgáltuk az EndMT folyamatát. TGF- β 1-hatásra a sejtekben az endothelmarkerek expressziója csökkent, a mesenchymalis jellegű markereket expresszáltak. Tumoros sejtvonalakkal aktivált-kondicionált médium TGF- β 1 függő módon EndMT-t hozott létre primer agyi endothel sejteken. Az EndMT során a primer agyi endothel sejtekben a claudin-5, VE-cadherin expresszió mértéke csökkent, ugyanakkor az SMA, fibronectin expresszió kifejezetté vált. Ezeket a hatásokat egy másik endothel sejt típuson, HUVEC-sejteken is megfigyeltük. A HUVEC-sejtek

melanoma sejtekkel ko-kultúrában EndMT-re jellemző mRNS-mintázatot mutatnak. Vizsgálataink alapján a metastasisképzés megfékezésében a primer tumor kezelése mellett kompakt endothel sejtréteggel rendelkező szervekben (agy, tüdő) az endothel-rétegek határoló funkciójának megőrzése is terápiás lehetőséget jelenthet.

VIII. Summary

The two forms of cell plasticity, epithelial-mesenchymal transition (EMT) and endothelial-mesenchymal transition (EndMT) share common features. In our study, we investigated examples of these processes.

The EMT of tubular epithelial cells contributes to tubulointerstitial fibrosis during renal fibrosis. Recently, a new protein, suppressor of cancer cell invasion (SCAI) was identified, as an inhibitor of MRTF in tumor progression. Therefore we proposed to investigate this protein in our models of tubular EMT. In porcine proximal tubular cells (LLCP-K1) TGF- β 1 treatment caused SMA, calponin, CTGF expression, while E-cadherin expression was lowered. SCAI inhibited these effects of TGF- β 1, similarly to the SMA promoter activation by MRTF-A, MRTF-B and the small GTPases (Rho, Rac1, Cdc42). The SMA-promoter activation of angiotensin-II treatment was prevented by SCAI as well. TGF- β 1 treatment in LLCP-K1 cells lowered SCAI protein expression. In *in vivo* models (unilateral ureter obstruction (UUO) in mice, and allograft-rejection model (in rats) we demonstrated that in parallel to a massive SMA expression SCAI expression was mitigated. Since iPS reprogramming of fibroblasts is similar to a mesenchymal-epithelial transition (MET), we examined SCAI expression during reprogramming: reprogramming of fibroblasts to induced pluripotent stem (iPS) cells led to a significant overexpression of Nanog, E-cadherin and SCAI as well. SCAI is expressed in epithelial and endothelial cells and its expression may indicate the endothelial or epithelial phenotype. SCAI, as an inhibiting cofactor of MRTFs, could be considered as a diagnostic or therapeutic target in fibrotic diseases and cancer.

We investigated the process of EndMT in rat brain endothelial (RBE) cells, which showed lower endothelial marker (claudin-5, occludin, VE-cadherin) expression levels, and higher mesenchymal marker (N-cadherin, β 1-intgerin) expression levels upon TGF- β 1 treatment. Conditioned/activated medium (ACM) of tumor cells induced similar effects on RBECs. These effects are TGF- β 1 dependent, conditioned medium (CM) alone was not sufficient to induce EndMT. Our observation of ACM induced EndMT was detectable in other endothelial cells - human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) - as well. Co-culture of HUVEC and melanoma cells resulted in EndMT- related mRNA overexpression in HUVECs, as found in gene expression databases. Besides primary

tumor treatment, conserving the barrier function of endothelial cells in organs with compact endothelial microvasculature (brain, lungs) may hold new therapeutic strategies for metastasis treatment.

IX. Irodalomjegyzék

1. Abe, K. és M. Takeichi (2008). "EPLIN mediates linkage of the cadherin catenin complex to F-actin and stabilizes the circumferential actin belt." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(1): 13-19.
2. Acloque, H., M. S. Adams, K. Fishwick, M. Bronner-Fraser és M. A. Nieto (2009). "Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease." *J Clin Invest* 119(6): 1438-1449.
3. Anderberg, C., S. I. Cunha, Z. Zhai, E. Cortez, E. Pardali, J. R. Johnson, M. Franco, M. Paez-Ribes, R. Cordiner, J. Fuxe, B. R. Johansson, M. J. Goumans, O. Casanovas, P. ten Dijke, H. M. Arthur és K. Pietras (2013). "Deficiency for endoglin in tumor vasculature weakens the endothelial barrier to metastatic dissemination." *J Exp Med* 210(3): 563-579.
4. Andrei V. Bakin, C. R., Anne K. Tomlinson, Carlos L. Arteaga (2002). "p38 mitogen-activated protein kinase is required for TGF β -mediated fibroblastic transdifferentiation and cell migration." *J Cell Sci*(115): 3193-3206.
5. Arnoux, V., M. Nassour, A. L'Helgoualc'h, R. A. Hipskind és P. Savagner (2008). "Erk5 controls Slug expression and keratinocyte activation during wound healing." *Mol Biol Cell* 19(11): 4738-4749.
6. Asparuhova, M. B., J. Ferralli, M. Chiquet és R. Chiquet-Ehrismann (2011). "The transcriptional regulator megakaryoblastic leukemia-1 mediates serum response factor-independent activation of tenascin-C transcription by mechanical stress." *FASEB J* 25(10): 3477-3488.
7. Asparuhova, M. B., C. Secondini, C. Ruegg és R. Chiquet-Ehrismann (2015). "Mechanism of irradiation-induced mammary cancer metastasis: A role for SAP-dependent Mkl1 signaling." *Mol Oncol* 9(8): 1510-1527.
8. Baarlink, C., H. Wang és R. Grosse (2013). "Nuclear actin network assembly by formins regulates the SRF coactivator MAL." *Science* 340(6134): 864-867.
9. Bai, F., H. L. Chan, A. Scott, M. D. Smith, C. Fan, J. I. Herschkowitz, C. M. Perou, A. S. Livingstone, D. J. Robbins, A. J. Capobianco és X. H. Pei (2014). "BRCA1 suppresses epithelial-to-mesenchymal transition and stem cell dedifferentiation during mammary and tumor development." *Cancer Res* 74(21): 6161-6172.

10. Barnholtz-Sloan, J. S., A. E. Sloan, F. G. Davis, F. D. Vigneau, P. Lai és R. E. Sawaya (2004). "Incidence proportions of brain metastases in patients diagnosed (1973 to 2001) in the Metropolitan Detroit Cancer Surveillance System." *J Clin Oncol* 22(14): 2865-2872.
11. Barthel, S. R., D. L. Hays, E. M. Yazawa, M. Opperman, K. C. Walley, L. Nimrichter, M. M. Burdick, B. M. Gillard, M. T. Moser, K. Pantel, B. A. Foster, K. J. Pienta és C. J. Dimitroff (2013). "Definition of molecular determinants of prostate cancer cell bone extravasation." *Cancer Res* 73(2): 942-952.
12. Batlle, E., E. Sancho, C. Franci, D. Dominguez, M. Monfar, J. Baulida és A. Garcia De Herreros (2000). "The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells." *Nat Cell Biol* 2(2): 84-89.
13. Baulida, J. (2017). "Epithelial-to-mesenchymal transition transcription factors in cancer-associated fibroblasts." *Mol Oncol* 11(7): 847-859.
14. Beumer, J. és H. Clevers (2016). "Regulation and plasticity of intestinal stem cells during homeostasis and regeneration." *Development* 143(20): 3639-3649.
15. Bhowmick, N. A., M. Ghiassi, A. Bakin, M. Aakre, C. A. Lundquist, M. E. Engel, C. L. Arteaga és H. L. Moses (2001). "Transforming Growth Factor-1 Mediates Epithelial to Mesenchymal Transdifferentiation through a RhoA-dependent Mechanism." *Molecular Biology of the Cell* 12(1): 27-36.
16. Blanpain, C. és E. Fuchs (2014). "Stem cell plasticity. Plasticity of epithelial stem cells in tissue regeneration." *Science* 344(6189): 1242281.
17. Bodor, C., J. P. Nagy, B. Vegh, A. Nemeth, A. Jenei, S. MirzaHosseini, A. Sebe és L. Rosivall (2012). "Angiotensin II increases the permeability and PV-1 expression of endothelial cells." *Am J Physiol Cell Physiol* 302(1): C267-276.
18. Boutet, A., C. A. De Frutos, P. H. Maxwell, M. J. Mayol, J. Romero és M. A. Nieto (2006). "Snail activation disrupts tissue homeostasis and induces fibrosis in the adult kidney." *EMBO J* 25(23): 5603-5613.
19. Brabletz, T., A. Jung, S. Reu, M. Porzner, F. Hlubek, L. A. Kunz-Schughart, R. Knuechel és T. Kirchner (2001). "Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(18): 10356-10361.

20. Brandt, D. T., C. Baarlink, T. M. Kitzing, E. Kremmer, J. Ivaska, P. Nollau és R. Grosse (2009). "SCAI acts as a suppressor of cancer cell invasion through the transcriptional control of beta1-integrin." *Nat Cell Biol* 11(5): 557-568.
21. Brauchle, M., Z. Yao, R. Arora, S. Thigale, I. Clay, B. Inverardi, J. Fletcher, P. Taslimi, M. G. Acker, B. Gerrits, J. Voshol, A. Bauer, D. Schubeler, T. Bouwmeester és H. Ruffner (2013). "Protein complex interactor analysis and differential activity of KDM3 subfamily members towards H3K9 methylation." *PLoS One* 8(4): e60549.
22. Bravi, L., N. Rudini, R. Cuttano, C. Giampietro, L. Maddaluno, L. Ferrarini, R. H. Adams, M. Corada, G. Boulday, E. Tournier-Lasserre, E. Dejana és M. G. Lampugnani (2015). "Sulindac metabolites decrease cerebrovascular malformations in CCM3-knockout mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* 112(27): 8421-8426.
23. Brown, P. D., L. M. Wakefield, A. D. Levinson és M. B. Sporn (1990). "Physicochemical activation of recombinant latent transforming growth factor-beta's 1, 2, and 3." *Growth Factors* 3(1): 35-43.
24. Buczacki, S. J., H. I. Zecchini, A. M. Nicholson, R. Russell, L. Vermeulen, R. Kemp és D. J. Winton (2013). "Intestinal label-retaining cells are secretory precursors expressing Lgr5." *Nature* 495(7439): 65-69.
25. Burns, K. D. és R. C. Harris (1995). "Signaling and growth responses of LLC-PK1/C14 cells transfected with the rabbit AT1 ANG II receptor." *Am J Physiol* 268(4 Pt 1): C925-935.
26. Burns, W. C., S. M. Twigg, J. M. Forbes, J. Pete, C. Tikellis, V. Thallas-Bonke, M. C. Thomas, M. E. Cooper és P. Kantharidis (2006). "Connective tissue growth factor plays an important role in advanced glycation end product-induced tubular epithelial-to-mesenchymal transition: implications for diabetic renal disease." *J Am Soc Nephrol* 17(9): 2484-2494.
27. Busche, S., A. Descot, S. Julien, H. Genth és G. Posern (2008). "Epithelial cell-cell contacts regulate SRF-mediated transcription via Rac-actin-MAL signalling." *J Cell Sci* 121(Pt 7): 1025-1035.
28. Cain, R. J., B. Vanhaesebroeck és A. J. Ridley (2010). "The PI3K p110alpha isoform regulates endothelial adherens junctions via Pyk2 and Rac1." *J Cell Biol* 188(6): 863-876.

29. Calon, A., D. V. Tauriello és E. Batlle (2014). "TGF-beta in CAF-mediated tumor growth and metastasis." *Semin Cancer Biol* 25: 15-22.
30. Cao, X. L., X. M. Hu, J. Q. Hu és W. X. Zheng (2011). "Myocardin-related transcription factor-A promoting neuronal survival against apoptosis induced by hypoxia/ischemia." *Brain Res* 1385: 263-274.
31. Caramel, J., E. Papadogeorgakis, L. Hill, G. J. Browne, G. Richard, A. Wierinckx, G. Saldanha, J. Osborne, P. Hutchinson, G. Tse, J. Lachuer, A. Puisieux, J. H. Pringle, S. Ansieau és E. Tulchinsky (2013). "A switch in the expression of embryonic EMT-inducers drives the development of malignant melanoma." *Cancer Cell* 24(4): 466-480.
32. Cen, B., A. Selvaraj, R. C. Burgess, J. K. Hitzler, Z. Ma, S. W. Morris és R. Prywes (2003). "Megakaryoblastic Leukemia 1, a Potent Transcriptional Coactivator for Serum Response Factor (SRF), Is Required for Serum Induction of SRF Target Genes." *Molecular and Cellular Biology* 23(18): 6597-6608.
33. Cenik, B. K., N. Liu, B. Chen, S. Bezprozvannaya, E. N. Olson és R. Bassel-Duby (2016). "Myocardin-related transcription factors are required for skeletal muscle development." *Development* 143(15): 2853-2861.
34. Chang, A. C., Y. Fu, V. C. Garside, K. Niessen, L. Chang, M. Fuller, A. Setiadi, J. Smrz, A. Kyle, A. Minchinton, M. Marra, P. A. Hoodless és A. Karsan (2011). "Notch initiates the endothelial-to-mesenchymal transition in the atrioventricular canal through autocrine activation of soluble guanylyl cyclase." *Dev Cell* 21(2): 288-300.
35. Charbonney, E., P. Speight, A. Masszi, H. Nakano és A. Kapus (2011). "beta-catenin and Smad3 regulate the activity and stability of myocardin-related transcription factor during epithelial-myofibroblast transition." *Mol Biol Cell* 22(23): 4472-4485.
36. Chen, L. J., H. Ye, Q. Zhang, F. Z. Li, L. J. Song, J. Yang, Q. Mu, S. S. Rao, P. C. Cai, F. Xiang, J. C. Zhang, Y. Su, J. B. Xin és W. L. Ma (2015). "Bleomycin induced epithelial-mesenchymal transition (EMT) in pleural mesothelial cells." *Toxicol Appl Pharmacol* 283(2): 75-82.
37. Chen, P. Y., L. Qin, N. Baeyens, G. Li, T. Afolabi, M. Budatha, G. Tellides, M. A. Schwartz és M. Simons (2015). "Endothelial-to-mesenchymal transition drives atherosclerosis progression." *J Clin Invest* 125(12): 4514-4528.

38. Chen, X., W. Hu, B. Xie, H. Gao, C. Xu és J. Chen (2014). "Downregulation of SCAI enhances glioma cell invasion and stem cell like phenotype by activating Wnt/beta-catenin signaling." *Biochem Biophys Res Commun* 448(2): 206-211.
39. Chen, X. L., J. O. Nam, C. Jean, C. Lawson, C. T. Walsh, E. Goka, S. T. Lim, A. Tomar, I. Tancioni, S. Uryu, J. L. Guan, L. M. Acevedo, S. M. Weis, D. A. Cheresh és D. D. Schlaepfer (2012). "VEGF-induced vascular permeability is mediated by FAK." *Dev Cell* 22(1): 146-157.
40. Choi, S. H., Z. Y. Hong, J. K. Nam, H. J. Lee, J. Jang, R. J. Yoo, Y. J. Lee, C. Y. Lee, K. H. Kim, S. Park, Y. H. Ji, Y. S. Lee, J. Cho és Y. J. Lee (2015). "A Hypoxia-Induced Vascular Endothelial-to-Mesenchymal Transition in Development of Radiation-Induced Pulmonary Fibrosis." *Clin Cancer Res* 21(16): 3716-3726.
41. Chrobak, I., S. Lenna, L. Stawski és M. Trojanowska (2013). "Interferon-gamma promotes vascular remodeling in human microvascular endothelial cells by upregulating endothelin (ET)-1 and transforming growth factor (TGF) beta2." *J Cell Physiol* 228(8): 1774-1783.
42. Cipriani, P., P. Di Benedetto, P. Ruscitti, D. Capece, F. Zazzeroni, V. Liakouli, I. Pantano, O. Berardicurti, F. Carubbi, G. Pecetti, S. Turrichia, E. Alesse, M. Iglarz és R. Giacomelli (2015). "The Endothelial-mesenchymal Transition in Systemic Sclerosis Is Induced by Endothelin-1 and Transforming Growth Factor-beta and May Be Blocked by Macitentan, a Dual Endothelin-1 Receptor Antagonist." *J Rheumatol* 42(10): 1808-1816.
43. Collard, L., G. Herledan, A. Pincini, A. Guerci, V. Randrianarison-Huetz és A. Sotiropoulos (2014). "Nuclear actin and myocardin-related transcription factors control disuse muscle atrophy through regulation of Srf activity." *J Cell Sci* 127(Pt 24): 5157-5163.
44. Combs, M. D. és K. E. Yutzey (2009). "Heart valve development: regulatory networks in development and disease." *Circ Res* 105(5): 408-421.
45. Compton, L. A., D. A. Potash, N. A. Mundell és J. V. Barnett (2006). "Transforming growth factor-beta induces loss of epithelial character and smooth muscle cell differentiation in epicardial cells." *Dev Dyn* 235(1): 82-93.
46. Copeland, J. W. és R. Treisman (2002). "The diaphanous-related formin mDial controls serum response factor activity through its effects on actin polymerization." *Mol Biol Cell* 13(11): 4088-4099.

47. Costello, P., M. Sargent, D. Maurice, C. Esnault, K. Foster, F. Anjos-Afonso és R. Treisman (2015). "MRTF-SRF signaling is required for seeding of HSC/Ps in bone marrow during development." *Blood* 125(8): 1244-1255.
48. Crider, B. J., G. M. Risinger, Jr., C. J. Haaksma, E. W. Howard és J. J. Tomasek (2011). "Myocardin-related transcription factors A and B are key regulators of TGF-beta1-induced fibroblast to myofibroblast differentiation." *J Invest Dermatol* 131(12): 2378-2385.
49. Dasgupta, S., M. Bhattacharya-Chatterjee, B. W. O'Malley, Jr. és S. K. Chatterjee (2006). "Tumor metastasis in an orthotopic murine model of head and neck cancer: possible role of TGF-beta 1 secreted by the tumor cells." *J Cell Biochem* 97(5): 1036-1051.
50. De Chiara, L. és J. Crean (2016). "Emerging Transcriptional Mechanisms in the Regulation of Epithelial to Mesenchymal Transition and Cellular Plasticity in the Kidney." *J Clin Med* 5(1).
51. De Craene, B. és G. Berx (2013). "Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression." *Nat Rev Cancer* 13(2): 97-110.
52. De Wever, O., Q. D. Nguyen, L. Van Hoorde, M. Bracke, E. Bruyneel, C. Gespach és M. Mareel (2004). "Tenascin-C and SF/HGF produced by myofibroblasts in vitro provide convergent pro-invasive signals to human colon cancer cells through RhoA and Rac." *FASEB J* 18(9): 1016-1018.
53. Dejana, E., F. Orsenigo és M. G. Lampugnani (2008). "The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability." *J Cell Sci* 121(Pt 13): 2115-2122.
54. Denecker, G., N. Vandamme, O. Akay, D. Koludrovic, J. Taminau, K. Lemeire, A. Gheldof, B. De Craene, M. Van Gele, L. Brochez, G. M. Udupi, M. Rafferty, B. Balint, W. M. Gallagher, G. Ghanem, D. Huylebroeck, J. Haigh, J. van den Oord, L. Larue, I. Davidson, J. C. Marine és G. Berx (2014). "Identification of a ZEB2-MITF-ZEB1 transcriptional network that controls melanogenesis and melanoma progression." *Cell Death Differ* 21(8): 1250-1261.
55. Descot, A., M. Rex-Haffner, G. Courtois, D. Bluteau, A. Menssen, T. Mercher, O. A. Bernard, R. Treisman és G. Posern (2008). "OTT-MAL is a deregulated activator of serum response factor-dependent gene expression." *Mol Cell Biol* 28(20): 6171-6181.

56. Dettman, R. W., W. Denetclaw, Jr., C. P. Ordahl és J. Bristow (1998). "Common epicardial origin of coronary vascular smooth muscle, perivascular fibroblasts, and intermyocardial fibroblasts in the avian heart." *Dev Biol* 193(2): 169-181.
57. Donati, G. és F. M. Watt (2015). "Stem cell heterogeneity and plasticity in epithelia." *Cell Stem Cell* 16(5): 465-476.
58. Draheim, K. M., O. S. Fisher, T. J. Boggon és D. A. Calderwood (2014). "Cerebral cavernous malformation proteins at a glance." *J Cell Sci* 127(Pt 4): 701-707.
59. Drees, F., S. Pokutta, S. Yamada, W. J. Nelson és W. I. Weis (2005). "Alpha-catenin is a molecular switch that binds E-cadherin-beta-catenin and regulates actin-filament assembly." *Cell* 123(5): 903-915.
60. Du, K. L., M. Chen, J. Li, J. J. Lepore, P. Mericko és M. S. Parmacek (2004). "Megakaryoblastic leukemia factor-1 transduces cytoskeletal signals and induces smooth muscle cell differentiation from undifferentiated embryonic stem cells." *J Biol Chem* 279(17): 17578-17586.
61. Dudley, A. C. (2012). "Tumor endothelial cells." *Cold Spring Harb Perspect Med* 2(3): a006536.
62. Edlund, S., M. Landstrom, C. H. Heldin és P. Aspenstrom (2002). "Transforming growth factor-beta-induced mobilization of actin cytoskeleton requires signaling by small GTPases Cdc42 and RhoA." *Mol Biol Cell* 13(3): 902-914.
63. Eisenberg, L. M. és R. R. Markwald (1995). "Molecular regulation of atrioventricular valvuloseptal morphogenesis." *Circ Res* 77(1): 1-6.
64. Engel, M. E., M. A. McDonnell, B. K. Law és H. L. Moses (1999). "Interdependent SMAD and JNK signaling in transforming growth factor-beta-mediated transcription." *J Biol Chem* 274(52): 37413-37420.
65. Evelyn, C. R., S. M. Wade, Q. Wang, M. Wu, J. A. Iniguez-Lluhi, S. D. Merajver és R. R. Neubig (2007). "CCG-1423: a small-molecule inhibitor of RhoA transcriptional signaling." *Mol Cancer Ther* 6(8): 2249-2260.
66. Fan, B., Y. Malato, D. F. Calvisi, S. Naqvi, N. Razumilava, S. Ribback, G. J. Gores, F. Dombrowski, M. Evert, X. Chen és H. Willenbring (2012). "Cholangiocarcinomas can originate from hepatocytes in mice." *J Clin Invest* 122(8): 2911-2915.

67. Fan JM, H. X., Ng YY, Nikolic-Paterson DJ, Mu W, Atkins RC, Lan HY. (2001). " Interleukin-1 induces tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation through a transforming growth factor-beta1-dependent mechanism in vitro." *Am J Kidney Dis*(37): 820-831.
68. Fan, L., A. Sebe, Z. Peterfi, A. Masszi, A. C. Thirone, O. D. Rotstein, H. Nakano, C. A. McCulloch, K. Szaszi, I. Mucsi és A. Kapus (2007). "Cell contact-dependent regulation of epithelial-myofibroblast transition via the rho-rho kinase-phospho-myosin pathway." *Mol Biol Cell* 18(3): 1083-1097.
69. Fazakas, C., I. Wilhelm, P. Nagyoszi, A. E. Farkas, J. Hasko, J. Molnar, H. Bauer, H. C. Bauer, F. Ayaydin, N. T. Dung, L. Siklos és I. A. Krizbai (2011). "Transmigration of melanoma cells through the blood-brain barrier: role of endothelial tight junctions and melanoma-released serine proteases." *PLoS One* 6(6): e20758.
70. Fintha, A., A. Gasparics, L. Fang, Z. Erdei, P. Hamar, M. M. Mozes, G. Kokeny, L. Rosivall és A. Sebe (2013). "Characterization and Role of SCAI during Renal Fibrosis and Epithelial-to-Mesenchymal Transition." *Am J Pathol* 182(2): 388-400.
71. Fogo, A. B. (2007). "Mechanisms of progression of chronic kidney disease." *Pediatr Nephrol* 22(12): 2011-2022.
72. Follonier Castella L, G. G., McCulloch CA, Hinz B (2010). "Regulation of myofibroblast activities: calcium pulls some strings behind the scene. ." *Exp Cell Res* (316): 2390–2401.
73. Fujii, M., K. Duris, O. Altay, Y. Soejima, P. Sherchan és J. H. Zhang (2012). "Inhibition of Rho kinase by hydroxyfasudil attenuates brain edema after subarachnoid hemorrhage in rats." *Neurochem Int* 60(3): 327-333.
74. Gabbiani, G., Y. Kapanci, P. Barazzone és W. W. Franke (1981). "Immunochemical identification of intermediate-sized filaments in human neoplastic cells. A diagnostic aid for the surgical pathologist." *Am J Pathol* 104(3): 206-216.
75. Garat, C., V. Van Putten, Z. A. Refaat, C. Dessev, S. Y. Han és R. A. Nemenoff (2000). "Induction of smooth muscle alpha-actin in vascular smooth muscle cells by arginine vasopressin is mediated by c-Jun amino-terminal kinases and p38 mitogen-activated protein kinase." *J Biol Chem* 275(29): 22537-22543.
76. Gasperini, P., G. Espigol-Frigole, P. J. McCormick, O. Salvucci, D. Maric, T. S. Uldrick, M. N. Polizzotto, R. Yarchoan és G. Tosato (2012). "Kaposi sarcoma herpesvirus

promotes endothelial-to-mesenchymal transition through Notch-dependent signaling." *Cancer Res* 72(5): 1157-1169.

77. Gilles, L., D. Bluteau, S. Boukour, Y. Chang, Y. Zhang, T. Robert, P. Dessen, N. Debili, O. A. Bernard, W. Vainchenker és H. Raslova (2009). "MAL/SRF complex is involved in platelet formation and megakaryocyte migration by regulating MYL9 (MLC2) and MMP9." *Blood* 114(19): 4221-4232.

78. Gingery, A., E. W. Bradley, L. Pederson, M. Ruan, N. J. Horwood és M. J. Oursler (2008). "TGF-beta coordinately activates TAK1/MEK/AKT/NFkB and SMAD pathways to promote osteoclast survival." *Exp Cell Res* 314(15): 2725-2738.

79. Gomez, E. W., Q. K. Chen, N. Gjorevski és C. M. Nelson (2010). "Tissue geometry patterns epithelial-mesenchymal transition via intercellular mechanotransduction." *J Cell Biochem* 110(1): 44-51.

80. Grabundzija, I., J. Wang, A. Sebe, Z. Erdei, R. Kajdi, A. Devaraj, D. Steinemann, K. Szuhai, U. Stein, T. Cantz, A. Schambach, C. Baum, Z. Izsvak, B. Sarkadi és Z. Ivics (2013). "Sleeping Beauty transposon-based system for cellular reprogramming and targeted gene insertion in induced pluripotent stem cells." *Nucleic Acids Res* 41(3): 1829-1847.

81. Grande, M. T. és J. M. Lopez-Novoa (2009). "Fibroblast activation and myofibroblast generation in obstructive nephropathy." *Nat Rev Nephrol* 5(6): 319-328.

82. Grande, M. T., B. Sanchez-Laorden, C. Lopez-Blau, C. A. De Frutos, A. Boutet, M. Arevalo, R. G. Rowe, S. J. Weiss, J. M. Lopez-Novoa és M. A. Nieto (2015). "Snail1-induced partial epithelial-to-mesenchymal transition drives renal fibrosis in mice and can be targeted to reverse established disease." *Nat Med* 21(9): 989-997.

83. Haak, A. J., K. M. Appleton, E. M. Lisabeth, S. A. Misek, Y. Ji, S. M. Wade, J. L. Bell, C. E. Rockwell, M. Airik, M. A. Krook, S. D. Larsen, M. Verhaegen, E. R. Lawlor és R. R. Neubig (2017). "Pharmacological Inhibition of Myocardin-related Transcription Factor Pathway Blocks Lung Metastases of RhoC-Overexpressing Melanoma." *Mol Cancer Ther* 16(1): 193-204.

84. Haak, A. J., P. S. Tsou, M. A. Amin, J. H. Ruth, P. Campbell, D. A. Fox, D. Khanna, S. D. Larsen és R. R. Neubig (2014). "Targeting the myofibroblast genetic switch: inhibitors of myocardin-related transcription factor/serum response factor-

regulated gene transcription prevent fibrosis in a murine model of skin injury." *J Pharmacol Exp Ther* 349(3): 480-486.

85. Hamar, P., P. Liptak, U. Heemann és B. Ivanyi (2005). "Ultrastructural analysis of the Fisher to Lewis rat model of chronic allograft nephropathy." *Transpl Int* 18(7): 863-870.

86. Hamar, P., S. Liu, O. Viklicky, A. Szabo, V. Muller és U. Heemann (2000). "Cyclosporine A and azathioprine are equipotent in chronic kidney allograft rejection." *Transplantation* 69(7): 1290-1295.

87. Hansen, R. K., A. Mund, S. L. Poulsen, M. Sandoval, K. Klement, K. Tsouroula, M. A. Tollenaere, M. Raschle, R. Soria, S. Offermanns, T. Worzfeld, R. Grosse, D. T. Brandt, B. Rozell, M. Mann, F. Cole, E. Soutoglou, A. A. Goodarzi, J. A. Daniel, N. Mailand és S. Bekker-Jensen (2016). "SCAI promotes DNA double-strand break repair in distinct chromosomal contexts." *Nat Cell Biol*.

88. Hashimoto, N., S. H. Phan, K. Imaizumi, M. Matsuo, H. Nakashima, T. Kawabe, K. Shimokata és Y. Hasegawa (2010). "Endothelial-mesenchymal transition in bleomycin-induced pulmonary fibrosis." *Am J Respir Cell Mol Biol* 43(2): 161-172.

89. Hay, E. (1968). "Organization and fine structure of epithelium and mesenchyme in the developing chick embryo." In *Epithelial–Mesenchymal Interactions*, R Fleischmajer and R.E. Billingham (eds) Baltimore, MD, USA: Williams & Wilkins Co: pp 31–55. .

90. Hermann, M. R., M. Jakobson, G. P. Colo, E. Rognoni, M. Jakobson, C. Kupatt, G. Posern és R. Fassler (2016). "Integrins synergise to induce expression of the MRTF-A-SRF target gene ISG15 for promoting cancer cell invasion." *J Cell Sci* 129(7): 1391-1403.

91. Heyder, C., E. Gloria-Maercker, F. Entschladen, W. Hatzmann, B. Niggemann, K. S. Zanker és T. Dittmar (2002). "Realtime visualization of tumor cell/endothelial cell interactions during transmigration across the endothelial barrier." *J Cancer Res Clin Oncol* 128(10): 533-538.

92. Hill, N. R., S. T. Fatoba, J. L. Oke, J. A. Hirst, C. A. O'Callaghan, D. S. Lasserson és F. D. Hobbs (2016). "Global Prevalence of Chronic Kidney Disease - A Systematic Review and Meta-Analysis." *PLoS One* 11(7): e0158765.

93. Hinkel, R., T. Trenkwalder, B. Petersen, W. Husada, F. Gesenhues, S. Lee, E. Hannappel, I. Bock-Marquette, D. Theisen, L. Leitner, P. Boekstegers, C. Cierniewski, O. J. Muller, F. le Noble, R. H. Adams, C. Weinl, A. Nordheim, B. Reichart, C. Weber, E. Olson, G. Posern, E. Deindl, H. Niemann és C. Kupatt (2014). "MRTF-A controls vessel growth and maturation by increasing the expression of CCN1 and CCN2." *Nat Commun* 5: 3970.
94. Hinson, J. S., M. D. Medlin, J. M. Taylor és C. P. Mack (2008). "Regulation of myocardin factor protein stability by the LIM-only protein FHL2." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295(3): H1067-H1075.
95. Hinz, B. (2010). "The myofibroblast: paradigm for a mechanically active cell." *J Biomech* 43(1): 146-155.
96. Hinz, B., S. H. Phan, V. J. Thannickal, M. Prunotto, A. Desmouliere, J. Varga, O. De Wever, M. Mareel és G. Gabbiani (2012). "Recent developments in myofibroblast biology: paradigms for connective tissue remodeling." *Am J Pathol* 180(4): 1340-1355.
97. Hiratsuka, S., S. Goel, W. S. Kamoun, Y. Maru, D. Fukumura, D. G. Duda és R. K. Jain (2011). "Endothelial focal adhesion kinase mediates cancer cell homing to discrete regions of the lungs via E-selectin up-regulation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(9): 3725-3730.
98. Hiratsuka, S., K. Nakamura, S. Iwai, M. Murakami, T. Itoh, H. Kijima, J. M. Shipley, R. M. Senior és M. Shibuya (2002). "MMP9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung-specific metastasis." *Cancer Cell* 2(4): 289-300.
99. Honn, K. V., D. G. Tang, I. M. Grossi, C. Renaud, Z. M. Duniec, C. R. Johnson és C. A. Diglio (1994). "Enhanced endothelial cell retraction mediated by 12(S)-HETE: a proposed mechanism for the role of platelets in tumor cell metastasis." *Exp Cell Res* 210(1): 1-9.
100. Hu, B., Z. Wu és S. H. Phan (2003). "Smad3 mediates transforming growth factor-beta-induced alpha-smooth muscle actin expression." *Am J Respir Cell Mol Biol* 29(3 Pt 1): 397-404.
101. Hu, Q., C. Guo, Y. Li, B. J. Aronow és J. Zhang (2011). "LMO7 mediates cell-specific activation of the Rho-myocardin-related transcription factor-serum response

factor pathway and plays an important role in breast cancer cell migration." *Mol Cell Biol* 31(16): 3223-3240.

102. Huang, Y., N. Song, Y. Ding, S. Yuan, X. Li, H. Cai, H. Shi és Y. Luo (2009). "Pulmonary vascular destabilization in the premetastatic phase facilitates lung metastasis." *Cancer Res* 69(19): 7529-7537.

103. Hwang, W. L., J. K. Jiang, S. H. Yang, T. S. Huang, H. Y. Lan, H. W. Teng, C. Y. Yang, Y. P. Tsai, C. H. Lin, H. W. Wang és M. H. Yang (2014). "MicroRNA-146a directs the symmetric division of Snail-dominant colorectal cancer stem cells." *Nat Cell Biol* 16(3): 268-280.

104. Ishibe, S. és L. G. Cantley (2008). "Epithelial-mesenchymal-epithelial cycling in kidney repair." *Curr Opin Nephrol Hypertens* 17(4): 379-385.

105. Ishikawa, M., N. Nishijima, J. Shiota, H. Sakagami, K. Tsuchida, M. Mizukoshi, M. Fukuchi, M. Tsuda és A. Tabuchi (2010). "Involvement of the serum response factor coactivator megakaryoblastic leukemia (MKL) in the activin-regulated dendritic complexity of rat cortical neurons." *J Biol Chem* 285(43): 32734-32743.

106. Isobe, S. Y., K. Nagao, N. Nozaki, H. Kimura és C. Obuse (2017). "Inhibition of RIF1 by SCAI Allows BRCA1-Mediated Repair." *Cell Rep* 20(2): 297-307.

107. Ito, M., Y. Liu, Z. Yang, J. Nguyen, F. Liang, R. J. Morris és G. Cotsarelis (2005). "Stem cells in the hair follicle bulge contribute to wound repair but not to homeostasis of the epidermis." *Nat Med* 11(12): 1351-1354.

108. Ito, M., Z. Yang, T. Andl, C. Cui, N. Kim, S. E. Millar és G. Cotsarelis (2007). "Wnt-dependent de novo hair follicle regeneration in adult mouse skin after wounding." *Nature* 447(7142): 316-320.

109. Iwano, M., D. Plieth, T. M. Danoff, C. Xue, H. Okada és E. G. Neilson (2002). "Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis." *Journal of Clinical Investigation* 110(3): 341-350.

110. Jean, C., X. L. Chen, J. O. Nam, I. Tancioni, S. Uryu, C. Lawson, K. K. Ward, C. T. Walsh, N. L. Miller, M. Ghassemian, P. Turowski, E. Dejana, S. Weis, D. A. Cheresh és D. D. Schlaepfer (2014). "Inhibition of endothelial FAK activity prevents tumor metastasis by enhancing barrier function." *J Cell Biol* 204(2): 247-263.

111. Jemal, A., T. Murray, E. Ward, A. Samuels, R. C. Tiwari, A. Ghafoor, E. J. Feuer és M. J. Thun (2005). "Cancer Statistics, 2005." *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 55(1): 10-30.
112. Kao, J., K. Salari, M. Bocanegra, Y. L. Choi, L. Girard, J. Gandhi, K. A. Kwei, T. Hernandez-Boussard, P. Wang, A. F. Gazdar, J. D. Minna és J. R. Pollack (2009). "Molecular profiling of breast cancer cell lines defines relevant tumor models and provides a resource for cancer gene discovery." *PLoS One* 4(7): e6146.
113. Kargozaran, H., S. Y. Yuan, J. W. Breslin, K. D. Watson, N. Gaudreault, A. Breen és M. H. Wu (2007). "A role for endothelial-derived matrix metalloproteinase-2 in breast cancer cell transmigration across the endothelial-basement membrane barrier." *Clin Exp Metastasis* 24(7): 495-502.
114. Kato, T., A. Enomoto, T. Watanabe, H. Haga, S. Ishida, Y. Kondo, K. Furukawa, T. Urano, S. Mii, L. Weng, M. Ishida-Takagishi, M. Asai, N. Asai, K. Kaibuchi, Y. Murakumo és M. Takahashi (2014). "TRIM27/MRTF-B-dependent integrin beta1 expression defines leading cells in cancer cell collectives." *Cell Rep* 7(4): 1156-1167.
115. Kavsak, P., R. K. Rasmussen, C. G. Causing, S. Bonni, H. Zhu, G. H. Thomsen és J. L. Wrana (2000). "Smad7 Binds to Smurf2 to Form an E3 Ubiquitin Ligase that Targets the TGF β Receptor for Degradation." *Molecular Cell* 6(6): 1365-1375.
116. Khanna, P., T. Yunkunis, H. S. Muddana, H. H. Peng, A. August és C. Dong (2010). "p38 MAP kinase is necessary for melanoma-mediated regulation of VE-cadherin disassembly." *Am J Physiol Cell Physiol* 298(5): C1140-1150.
117. Khoo, B. L., S. C. Lee, P. Kumar, T. Z. Tan, M. E. Warkiani, S. G. Ow, S. Nandi, C. T. Lim és J. P. Thiery (2015). "Short-term expansion of breast circulating cancer cells predicts response to anti-cancer therapy." *Oncotarget* 6(17): 15578-15593.
118. Khuon, S., L. Liang, R. W. Dettman, P. H. Sporn, R. B. Wysolmerski és T. L. Chew (2010). "Myosin light chain kinase mediates transcellular intravasation of breast cancer cells through the underlying endothelial cells: a three-dimensional FRET study." *J Cell Sci* 123(Pt 3): 431-440.
119. Kim, B. J., B. M. Hancock, A. Bermudez, N. Del Cid, E. Reyes, N. M. van Sorge, X. Lauth, C. A. Smurthwaite, B. J. Hilton, A. Stotland, A. Banerjee, J. Buchanan, R. Wolkowicz, D. Traver és K. S. Doran (2015). "Bacterial induction of Snail1 contributes to blood-brain barrier disruption." *J Clin Invest* 125(6): 2473-2483.

120. Kim JH, B. P., Kumar CC. (1993). "Smooth muscle alpha-actin promoter activity is induced by serum stimulation of fibroblast cells." *Biochem Biophys Res Commun* 190: 1115-1121.
121. Kim JH, J. F., Robertson N, Catino JJ, Prywes R, Kumar CC. (1994). "Suppression of Ras transformation by serum response factor." *J Biol Chem* 269: 13740-13743.
122. Kim, K. K., M. C. Kugler, P. J. Wolters, L. Robillard, M. G. Galvez, A. N. Brumwell, D. Sheppard és H. A. Chapman (2006). "Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(35): 13180-13185.
123. Kim, T., D. Hwang, D. Lee, J. H. Kim, S. Y. Kim és D. S. Lim (2017). "MRTF potentiates TEAD-YAP transcriptional activity causing metastasis." *EMBO J* 36(4): 520-535.
124. Kim, Y. S., Z. G. Xu, M. A. Reddy, S. L. Li, L. Lanting, K. Sharma, S. G. Adler és R. Natarajan (2005). "Novel interactions between TGF- β 1 actions and the 12/15-lipoxygenase pathway in mesangial cells." *J Am Soc Nephrol* 16(2): 352-362.
125. Kisanuki, Y. Y., R. E. Hammer, J. Miyazaki, S. C. Williams, J. A. Richardson és M. Yanagisawa (2001). "Tie2-Cre transgenic mice: a new model for endothelial cell-lineage analysis in vivo." *Dev Biol* 230(2): 230-242.
126. Kitzing, T. M., A. S. Sahadevan, D. T. Brandt, H. Knieling, S. Hannemann, O. T. Fackler, J. Grosshans és R. Grosse (2007). "Positive feedback between Dia1, LARG, and RhoA regulates cell morphology and invasion." *Genes Dev* 21(12): 1478-1483.
127. Kopp, H. G., S. T. Avecilla, A. T. Hooper és S. Rafii (2005). "The bone marrow vascular niche: home of HSC differentiation and mobilization." *Physiology (Bethesda)* 20: 349-356.
128. Kopp, J. L., M. Grompe és M. Sander (2016). "Stem cells versus plasticity in liver and pancreas regeneration." *Nat Cell Biol* 18(3): 238-245.
129. Krasagakis, K., D. Tholke, B. Farthmann, J. Eberle, U. Mansmann és C. E. Orfanos (1998). "Elevated plasma levels of transforming growth factor (TGF)- β 1 and TGF- β 2 in patients with disseminated malignant melanoma." *Br J Cancer* 77(9): 1492-1494.

130. Krebs, A. M., J. Mitschke, M. Lasierra Losada, O. Schmalhofer, M. Boerries, H. Busch, M. Boettcher, D. Mougiakakos, W. Reichardt, P. Bronsert, V. G. Brunton, C. Pilarsky, T. H. Winkler, S. Brabletz, M. P. Stemmler és T. Brabletz (2017). "The EMT-activator Zeb1 is a key factor for cell plasticity and promotes metastasis in pancreatic cancer." *Nat Cell Biol* 19(5): 518-529.
131. Kressner, C., P. Nollau, R. Grosse és D. T. Brandt (2013). "Functional interaction of SCAI with the SWI/SNF complex for transcription and tumor cell invasion." *PLoS One* 8(8): e69947.
132. Krishnan, S., E. Szabo, I. Burghardt, K. Frei, G. Tabatabai és M. Weller (2015). "Modulation of cerebral endothelial cell function by TGF-beta in glioblastoma: VEGF-dependent angiogenesis versus endothelial mesenchymal transition." *Oncotarget* 6(26): 22480-22495.
133. Kuwahara, K., T. Barrientos, G. C. Pipes, S. Li és E. N. Olson (2005). "Muscle-specific signaling mechanism that links actin dynamics to serum response factor." *Mol Cell Biol* 25(8): 3173-3181.
134. Kuwahara, K., G. C. Teg Pipes, J. McAnally, J. A. Richardson, J. A. Hill, R. Bassel-Duby és E. N. Olson (2007). "Modulation of adverse cardiac remodeling by STARS, a mediator of MEF2 signaling and SRF activity." *J Clin Invest* 117(5): 1324-1334.
135. Kuzet, S. E. és C. Gaggioli (2016). "Fibroblast activation in cancer: when seed fertilizes soil." *Cell Tissue Res* 365(3): 607-619.
136. L. Aravind, E. V. K. (2000). "SAP – a putative DNA-binding motif involved in chromosomal organization." *Trends in Biochemical Sciences* 25(3): 112-114.
137. Labelle, M., S. Begum és R. O. Hynes (2011). "Direct signaling between platelets and cancer cells induces an epithelial-mesenchymal-like transition and promotes metastasis." *Cancer Cell* 20(5): 576-590.
138. Lalor PF, L. W., Curbishley SM, Shetty S, Adams DH (2006). "Human hepatic sinusoidal endothelial cells can be distinguished by expression of phenotypic markers related to their specialised functions in vivo." *World J Gastroenterol* 12(34): 5429-5439.
139. Larsson, O., D. Diebold, D. Fan, M. Peterson, R. S. Nho, P. B. Bitterman és C. A. Henke (2008). "Fibrotic myofibroblasts manifest genome-wide derangements of translational control." *PLoS One* 3(9): e3220.

140. LeBleu, V. S., G. Taduri, J. O'Connell, Y. Teng, V. G. Cooke, C. Woda, H. Sugimoto és R. Kalluri (2013). "Origin and function of myofibroblasts in kidney fibrosis." *Nat Med* 19(8): 1047-1053.
141. Li, B., W. D. Zhao, Z. M. Tan, W. G. Fang, L. Zhu és Y. H. Chen (2006). "Involvement of Rho/ROCK signalling in small cell lung cancer migration through human brain microvascular endothelial cells." *FEBS Lett* 580(17): 4252-4260.
142. Li, M., X. Y. He, Z. M. Zhang, S. Li, L. H. Ren, R. S. Cao, Y. D. Feng, Y. L. Ji, Y. Zhao és R. H. Shi (2015). "MicroRNA-1290 promotes esophageal squamous cell carcinoma cell proliferation and metastasis." *World J Gastroenterol* 21(11): 3245-3255.
143. Li, S., S. Chang, X. Qi, J. A. Richardson és E. N. Olson (2006). "Requirement of a myocardin-related transcription factor for development of mammary myoepithelial cells." *Mol Cell Biol* 26(15): 5797-5808.
144. Liao, X. H., N. Wang, L. Y. Liu, L. Zheng, W. J. Xing, D. W. Zhao, X. G. Sun, P. Hu, J. Dong és T. C. Zhang (2014). "MRTF-A and STAT3 synergistically promote breast cancer cell migration." *Cell Signal* 26(11): 2370-2380.
145. Limana, F., A. Zacheo, D. Mocini, A. Mangoni, G. Borsellino, A. Diamantini, R. De Mori, L. Battistini, E. Vigna, M. Santini, V. Loiaconi, G. Pompilio, A. Germani és M. C. Capogrossi (2007). "Identification of myocardial and vascular precursor cells in human and mouse epicardium." *Circ Res* 101(12): 1255-1265.
146. Lin, L., Q. Han, Y. Xiong, T. Li, Z. Liu, H. Xu, Y. Wu, N. Wang és X. Liu (2017). "Krupple-like-factor 4 Attenuates Lung Fibrosis via Inhibiting Epithelial-mesenchymal Transition." *Sci Rep* 7(1): 15847.
147. Lin L, L. D., Liang H, Xue L, Su C, Liu M. (2015). "MiR-1228 promotes breast cancer cell growth and metastasis through targeting SCAI protein." *Int J Clin Exp Pathol* 1(8(6)): 6646-6655.
148. Lin, X. L., M. Liu, Y. Liu, H. Hu, Y. Pan, W. Zou, X. Fan és X. Hu (2018). "Transforming growth factor beta1 promotes migration and invasion in HepG2 cells: Epithelial to mesenchymal transition via JAK/STAT3 signaling." *Int J Mol Med* 41(1): 129-136.
149. Liu, C. Y., S. W. Chan, F. Guo, A. Toloczko, L. Cui és W. Hong (2016). "MRTF/SRF dependent transcriptional regulation of TAZ in breast cancer cells." *Oncotarget* 7(12): 13706-13716.

150. Liu, F., A. Hata, J. C. Baker, J. Doody, J. Carcamo, R. M. Harland és J. Massague (1996). "A human Mad protein acting as a BMP-regulated transcriptional activator." *Nature* 381(6583): 620-623.
151. Liu, Y. (2010). "New insights into epithelial-mesenchymal transition in kidney fibrosis." *J Am Soc Nephrol* 21(2): 212-222.
152. Lovisa, S., V. S. LeBleu, B. Tampe, H. Sugimoto, K. Vадnagara, J. L. Carstens, C. C. Wu, Y. Hagos, B. C. Burckhardt, T. Pentcheva-Hoang, H. Nischal, J. P. Allison, M. Zeisberg és R. Kalluri (2015). "Epithelial-to-mesenchymal transition induces cell cycle arrest and parenchymal damage in renal fibrosis." *Nat Med* 21(9): 998-1009.
153. Luchsinger, L. L., C. A. Patenaude, B. D. Smith és M. D. Layne (2011). "Myocardin-related transcription factor-A complexes activate type I collagen expression in lung fibroblasts." *J Biol Chem* 286(51): 44116-44125.
154. Lundquist, M. R., A. J. Storaska, T. C. Liu, S. D. Larsen, T. Evans, R. R. Neubig és S. R. Jaffrey (2014). "Redox modification of nuclear actin by MICAL-2 regulates SRF signaling." *Cell* 156(3): 563-576.
155. Luo, J., M. Liang, W. E. Mitch, F. R. Danesh, M. Yu és J. Cheng (2015). "FSP-1 Impairs the Function of Endothelium Leading to Failure of Arteriovenous Grafts in Diabetic Mice." *Endocrinology* 156(6): 2200-2210.
156. Luo, Q., Q. Kang, W. Si, W. Jiang, J. K. Park, Y. Peng, X. Li, H. H. Luu, J. Luo, A. G. Montag, R. C. Haydon és T. C. He (2004). "Connective tissue growth factor (CTGF) is regulated by Wnt and bone morphogenetic proteins signaling in osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells." *J Biol Chem* 279(53): 55958-55968.
157. Ma, Z., S. W. Morris, V. Valentine, M. Li, J. A. Herbrick, X. Cui, D. Bouman, Y. Li, P. K. Mehta, D. Nizetic, Y. Kaneko, G. C. Chan, L. C. Chan, J. Squire, S. W. Scherer és J. K. Hitzler (2001). "Fusion of two novel genes, RBM15 and MKL1, in the t(1;22)(p13;q13) of acute megakaryoblastic leukemia." *Nat Genet* 28(3): 220-221.
158. Mack, C. P., A. V. Somlyo, M. Hautmann, A. P. Somlyo és G. K. Owens (2001). "Smooth muscle differentiation marker gene expression is regulated by RhoA-mediated actin polymerization." *J Biol Chem* 276(1): 341-347.
159. Maddaluno, L., N. Rudini, R. Cuttano, L. Bravi, C. Giampietro, M. Corada, L. Ferrarini, F. Orsenigo, E. Papa, G. Boulday, E. Tournier-Lasserre, F. Chapon, C.

- Richichi, S. F. Retta, M. G. Lampugnani és E. Dejana (2013). "EndMT contributes to the onset and progression of cerebral cavernous malformations." *Nature* 498(7455): 492-496.
160. Mailand, N., I. Gibbs-Seymour és S. Bekker-Jensen (2013). "Regulation of PCNA-protein interactions for genome stability." *Nat Rev Mol Cell Biol* 14(5): 269-282.
161. Malanchi, I., A. Santamaria-Martinez, E. Susanto, H. Peng, H. A. Lehr, J. F. Delaloye és J. Huelsken (2011). "Interactions between cancer stem cells and their niche govern metastatic colonization." *Nature* 481(7379): 85-89.
162. Mani, S. A., W. Guo, M. J. Liao, E. N. Eaton, A. Ayyanan, A. Y. Zhou, M. Brooks, F. Reinhard, C. C. Zhang, M. Shipitsin, L. L. Campbell, K. Polyak, C. Brisken, J. Yang és R. A. Weinberg (2008). "The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells." *Cell* 133(4): 704-715.
163. Manotham, K., T. Tanaka, M. Matsumoto, T. Ohse, R. Inagi, T. Miyata, K. Kurokawa, T. Fujita, J. R. Ingelfinger és M. Nangaku (2004). "Transdifferentiation of cultured tubular cells induced by hypoxia." *Kidney Int* 65(3): 871-880.
164. Markwald, R. R., T. P. Fitzharris és W. N. Smith (1975). "Structural analysis of endocardial cytodifferentiation." *Dev Biol* 42(1): 160-180.
165. Martina B. Hautmann, C. S. M., Gary K. Owens (1997). "A transforming growth factor beta (TGFbeta) control element drives TGFbeta-induced stimulation of smooth muscle alpha-actin gene expression in concert with two CArG elements." *J Biol Chem* 272: 10948-10956.
166. Maschler, S., S. Grunert, A. Danielopol, H. Beug és G. Wirl (2004). "Enhanced tenascin-C expression and matrix deposition during Ras/TGF-beta-induced progression of mammary tumor cells." *Oncogene* 23(20): 3622-3633.
167. Masszi, A., C. Di Ciano, G. Sirokmany, W. T. Arthur, O. D. Rotstein, J. Wang, C. A. McCulloch, L. Rosivall, I. Mucsi és A. Kapus (2003). "Central role for Rho in TGF-beta1-induced alpha-smooth muscle actin expression during epithelial-mesenchymal transition." *Am J Physiol Renal Physiol* 284(5): F911-924.
168. Masszi A, F. L., Rosivall L, McCulloch CA, Rotstein OD, Mucsi I, Kapus A. (2004). "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.* 165: 1955-1967.

169. Masszi, A. és A. Kapus (2011). "Smad3 in Epithelial-Myofibroblast Transition." *Cells Tissues Organs* 193(1-2): 41-52.
170. Mederacke, I., C. C. Hsu, J. S. Troeger, P. Huebener, X. Mu, D. H. Dapito, J. P. Pradere és R. F. Schwabe (2013). "Fate tracing reveals hepatic stellate cells as dominant contributors to liver fibrosis independent of its aetiology." *Nat Commun* 4: 2823.
171. Medici, D. és R. Kalluri (2012). "Endothelial-mesenchymal transition and its contribution to the emergence of stem cell phenotype." *Semin Cancer Biol* 22(5-6): 379-384.
172. Medjkane, S., C. Perez-Sanchez, C. Gaggioli, E. Sahai és R. Treisman (2009). "Myocardin-related transcription factors and SRF are required for cytoskeletal dynamics and experimental metastasis." *Nat Cell Biol* 11(3): 257-268.
173. Miano, J. M., M. J. Carlson, J. A. Spencer és R. P. Misra (2000). "Serum Response Factor-dependent Regulation of the Smooth Muscle Calponin Gene." *Journal of Biological Chemistry* 275(13): 9814-9822.
174. Miettinen, P. J., R. Ebner, A. R. Lopez és R. Derynck (1994). "TGF-beta induced transdifferentiation of mammary epithelial cells to mesenchymal cells: involvement of type I receptors." *J Cell Biol* 127(6 Pt 2): 2021-2036.
175. Mihira, H., H. I. Suzuki, Y. Akatsu, Y. Yoshimatsu, T. Igarashi, K. Miyazono és T. Watabe (2012). "TGF-beta-induced mesenchymal transition of MS-1 endothelial cells requires Smad-dependent cooperative activation of Rho signals and MRTF-A." *J Biochem* 151(2): 145-156.
176. Miller, R. K. (2017). *Kidney Development and Disease*, Springer International Publishing.
177. Milutinovic, S., Q. Zhuang és M. Szyf (2002). "Proliferating cell nuclear antigen associates with histone deacetylase activity, integrating DNA replication and chromatin modification." *J Biol Chem* 277(23): 20974-20978.
178. Miralles F, P. G., Zaromytidou AI, Treisman R. (2003). "Actin Dynamics Control SRF Activity by Regulation of Its Coactivator MAL." *Cell* 113: 329-342.
179. Miyazono, K., A. Olofsson, P. Colosetti és C. H. Heldin (1991). "A role of the latent TGF-beta 1-binding protein in the assembly and secretion of TGF-beta 1." *EMBO J* 10(5): 1091-1101.

180. Mokalled, M. H., K. J. Carroll, B. K. Cenik, B. Chen, N. Liu, E. N. Olson és R. Bassel-Duby (2015). "Myocardin-related transcription factors are required for cardiac development and function." *Dev Biol* 406(2): 109-116.
181. Mokalled, M. H., A. Johnson, Y. Kim, J. Oh és E. N. Olson (2010). "Myocardin-related transcription factors regulate the Cdk5/Pctaire1 kinase cascade to control neurite outgrowth, neuronal migration and brain development." *Development* 137(14): 2365-2374.
182. Moldovan, G. L., B. Pfander és S. Jentsch (2007). "PCNA, the maestro of the replication fork." *Cell* 129(4): 665-679.
183. Monaghan, M. G., M. Linneweh, S. Liebscher, B. Van Handel, S. L. Layland és K. Schenke-Layland (2016). "Endocardial-to-mesenchymal transformation and mesenchymal cell colonization at the onset of human cardiac valve development." *Development* 143(3): 473-482.
184. Morita, T., T. Mayanagi és K. Sobue (2007). "Dual roles of myocardin-related transcription factors in epithelial mesenchymal transition via slug induction and actin remodeling." *J Cell Biol* 179(5): 1027-1042.
185. Morita, T., T. Mayanagi és K. Sobue (2007). "Reorganization of the actin cytoskeleton via transcriptional regulation of cytoskeletal/focal adhesion genes by myocardin-related transcription factors (MRTFs/MAL/MKLs)." *Exp Cell Res* 313(16): 3432-3445.
186. Muehlich, S., I. Cicha, C. D. Garlich, B. Krueger, G. Posern és M. Goppelt-Struebe (2007). "Actin-dependent regulation of connective tissue growth factor." *Am J Physiol Cell Physiol* 292(5): C1732-1738.
187. Murzina, N., A. Verreault, E. Laue és B. Stillman (1999). "Heterochromatin Dynamics in Mouse Cells." *Molecular Cell* 4(4): 529-540.
188. Navarro, P., L. Ruco és E. Dejana (1998). "Differential localization of VE- and N-cadherins in human endothelial cells: VE-cadherin competes with N-cadherin for junctional localization." *J Cell Biol* 140(6): 1475-1484.
189. Niessen, K., Y. Fu, L. Chang, P. A. Hoodless, D. McFadden és A. Karsan (2008). "Slug is a direct Notch target required for initiation of cardiac cushion cellularization." *J Cell Biol* 182(2): 315-325.

190. Nieto, M. A. (2002). "The snail superfamily of zinc-finger transcription factors." *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(3): 155-166.
191. Norris, R. A., R. A. Moreno-Rodriguez, Y. Sugi, S. Hoffman, J. Amos, M. M. Hart, J. D. Potts, R. L. Goodwin és R. R. Markwald (2008). "Periostin regulates atrioventricular valve maturation." *Dev Biol* 316(2): 200-213.
192. Nosedá, M., G. McLean, K. Niessen, L. Chang, I. Pollet, R. Montpetit, R. Shahidi, K. Dorovini-Zis, L. Li, B. Beckstead, R. E. Durand, P. A. Hoodless és A. Karsan (2004). "Notch activation results in phenotypic and functional changes consistent with endothelial-to-mesenchymal transformation." *Circ Res* 94(7): 910-917.
193. Nozawa, R. S., K. Nagao, H. T. Masuda, O. Iwasaki, T. Hirota, N. Nozaki, H. Kimura és C. Obuse (2010). "Human POGZ modulates dissociation of HP1alpha from mitotic chromosome arms through Aurora B activation." *Nat Cell Biol* 12(7): 719-727.
194. O'Connor, J. W., P. N. Riley, S. M. Nalluri, P. K. Ashar és E. W. Gomez (2015). "Matrix Rigidity Mediates TGFbeta1-Induced Epithelial-Myofibroblast Transition by Controlling Cytoskeletal Organization and MRTF-A Localization." *J Cell Physiol* 230(8): 1829-1839.
195. Okumura, N., E. P. Kay, M. Nakahara, J. Hamuro, S. Kinoshita és N. Koizumi (2013). "Inhibition of TGF-beta signaling enables human corneal endothelial cell expansion in vitro for use in regenerative medicine." *PLoS One* 8(2): e58000.
196. Oldfield, M. D., L. A. Bach, J. M. Forbes, D. Nikolic-Paterson, A. McRobert, V. Thallas, R. C. Atkins, T. Osicka, G. Jerums és M. E. Cooper (2001). "Advanced glycation end products cause epithelial-myofibroblast transdifferentiation via the receptor for advanced glycation end products (RAGE)." *J Clin Invest* 108(12): 1853-1863.
197. Oskarsson, T., S. Acharyya, X. H. Zhang, S. Vanharanta, S. F. Tavazoie, P. G. Morris, R. J. Downey, K. Manova-Todorova, E. Brogi és J. Massague (2011). "Breast cancer cells produce tenascin C as a metastatic niche component to colonize the lungs." *Nat Med* 17(7): 867-874.
198. Ostman, A. és M. Augsten (2009). "Cancer-associated fibroblasts and tumor growth--bystanders turning into key players." *Curr Opin Genet Dev* 19(1): 67-73.
199. Padua, D., X. H. Zhang, Q. Wang, C. Nadal, W. L. Gerald, R. R. Gomis és J. Massague (2008). "TGFbeta primes breast tumors for lung metastasis seeding through angiopoietin-like 4." *Cell* 133(1): 66-77.

200. Page, M. E., P. Lombard, F. Ng, B. Gottgens és K. B. Jensen (2013). "The epidermis comprises autonomous compartments maintained by distinct stem cell populations." *Cell Stem Cell* 13(4): 471-482.
201. Pawlowski, R., E. K. Rajakyla, M. K. Vartiainen és R. Treisman (2010). "An actin-regulated importin alpha/beta-dependent extended bipartite NLS directs nuclear import of MRTF-A." *EMBO J* 29(20): 3448-3458.
202. Perez-Pomares, J. M. és R. Munoz-Chapuli (2002). "Epithelial-mesenchymal transitions: a mesodermal cell strategy for evolutive innovation in Metazoans." *Anat Rec* 268(3): 343-351.
203. Piek, E., C. H. Heldin és P. Ten Dijke (1999). "Specificity, diversity, and regulation in TGF-beta superfamily signaling." *FASEB J* 13(15): 2105-2124.
204. Pijnenborg, R., G. Dixon, W. B. Robertson és I. Brosens (1980). "Trophoblastic invasion of human decidua from 8 to 18 weeks of pregnancy." *Placenta* 1(1): 3-19.
205. Plaks, V., N. Kong és Z. Werb (2015). "The cancer stem cell niche: how essential is the niche in regulating stemness of tumor cells?" *Cell Stem Cell* 16(3): 225-238.
206. Platta, C. S., D. Khuntia, M. P. Mehta és J. H. Suh (2010). "Current treatment strategies for brain metastasis and complications from therapeutic techniques: a review of current literature." *Am J Clin Oncol* 33(4): 398-407.
207. Polanska, U. M. és A. Orimo (2013). "Carcinoma-associated fibroblasts: non-neoplastic tumour-promoting mesenchymal cells." *J Cell Physiol* 228(8): 1651-1657.
208. Posern, G., F. Miralles, S. Guettler és R. Treisman (2004). "Mutant actins that stabilise F-actin use distinct mechanisms to activate the SRF coactivator MAL." *EMBO J* 23(20): 3973-3983.
209. Price EA, C. D., Murray JC. (1996). "Beta-1 integrins mediate tumour cell adhesion to quiescent endothelial cells *in vitro*." *British Journal of Cancer* 74(11): 1762-1766.
210. Qi, J., N. Chen, J. Wang és C. H. Siu (2005). "Transendothelial migration of melanoma cells involves N-cadherin-mediated adhesion and activation of the beta-catenin signaling pathway." *Mol Biol Cell* 16(9): 4386-4397.
211. Qi, W., X. Chen, P. Poronnik és C. A. Pollock (2006). "The renal cortical fibroblast in renal tubulointerstitial fibrosis." *Int J Biochem Cell Biol* 38(1): 1-5.

212. Rahaman, S. O., L. M. Grove, S. Paruchuri, B. D. Southern, S. Abraham, K. A. Niese, R. G. Scheraga, S. Ghosh, C. K. Thodeti, D. X. Zhang, M. M. Moran, W. P. Schilling, D. J. Tschumperlin és M. A. Olman (2014). "TRPV4 mediates myofibroblast differentiation and pulmonary fibrosis in mice." *J Clin Invest* 124(12): 5225-5238.
213. Record, J., D. Malinova, H. L. Zenner, V. Plagnol, K. Nowak, F. Syed, G. Bouma, J. Curtis, K. Gilmour, C. Cale, S. Hackett, G. Charras, D. Moulding, S. Nejentsev, A. J. Thrasher és S. O. Burns (2015). "Immunodeficiency and severe susceptibility to bacterial infection associated with a loss-of-function homozygous mutation of MKL1." *Blood* 126(13): 1527-1535.
214. Reymond, N., J. H. Im, R. Garg, F. M. Vega, B. Borda d'Agua, P. Riou, S. Cox, F. Valderrama, R. J. Muschel és A. J. Ridley (2012). "Cdc42 promotes transendothelial migration of cancer cells through beta1 integrin." *J Cell Biol* 199(4): 653-668.
215. Rhyu, D. Y., Y. Yang, H. Ha, G. T. Lee, J. S. Song, S. T. Uh és H. B. Lee (2005). "Role of reactive oxygen species in TGF-beta1-induced mitogen-activated protein kinase activation and epithelial-mesenchymal transition in renal tubular epithelial cells." *J Am Soc Nephrol* 16(3): 667-675.
216. Rieder, F., S. P. Kessler, G. A. West, S. Bhilocha, C. de la Motte, T. M. Sadler, B. Gopalan, E. Stylianou és C. Fiocchi (2011). "Inflammation-induced endothelial-to-mesenchymal transition: a novel mechanism of intestinal fibrosis." *Am J Pathol* 179(5): 2660-2673.
217. Rousseau, S., F. Houle, J. Landry és J. Huot (1997). "p38 MAP kinase activation by vascular endothelial growth factor mediates actin reorganization and cell migration in human endothelial cells." *Oncogene* 15(18): 2169-2177.
218. Sakai, N., J. Chun, J. S. Duffield, T. Wada, A. D. Luster és A. M. Tager (2013). "LPA1-induced cytoskeleton reorganization drives fibrosis through CTGF-dependent fibroblast proliferation." *FASEB J* 27(5): 1830-1846.
219. Sakuma, K., M. Akiho, H. Nakashima, H. Akima és M. Yasuhara (2008). "Age-related reductions in expression of serum response factor and myocardin-related transcription factor A in mouse skeletal muscles." *Biochim Biophys Acta* 1782(7-8): 453-461.

220. Sandbo, N., A. Lau, J. Kach, C. Ngam, D. Yau és N. O. Dulin (2011). "Delayed stress fiber formation mediates pulmonary myofibroblast differentiation in response to TGF-beta." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 301(5): L656-666.
221. Sappino, A. P., O. Skalli, B. Jackson, W. Schürch és G. Gabbiani (1988). "Smooth-muscle differentiation in stromal cells of malignant and non-malignant breast tissues." *International Journal of Cancer* 41(5): 707-712.
222. Schaub, J. R., Y. Malato, C. Gormond és H. Willenbring (2014). "Evidence against a stem cell origin of new hepatocytes in a common mouse model of chronic liver injury." *Cell Rep* 8(4): 933-939.
223. Schmidt, J. M., E. Panzilius, H. S. Bartsch, M. Irmeler, J. Beckers, V. Kari, J. R. Linnemann, D. Dragoi, B. Hirschi, U. J. Kloos, S. Sass, F. Theis, S. Kahlert, S. A. Johnsen, K. Sotlar és C. H. Scheel (2015). "Stem-cell-like properties and epithelial plasticity arise as stable traits after transient Twist1 activation." *Cell Rep* 10(2): 131-139.
224. Schnaper, H. W. (2017). "The Tubulointerstitial Pathophysiology of Progressive Kidney Disease." *Adv Chronic Kidney Dis* 24(2): 107-116.
225. Schwock, J., N. Dhani és D. W. Hedley (2010). "Targeting focal adhesion kinase signaling in tumor growth and metastasis." *Expert Opin Ther Targets* 14(1): 77-94.
226. Sebe, A., Z. Erdei, K. Varga, C. Bodor, I. Mucsi és L. Rosivall (2010). "Cdc42 regulates myocardin-related transcription factor nuclear shuttling and alpha-smooth muscle actin promoter activity during renal tubular epithelial-mesenchymal transition." *Nephron Exp Nephrol* 114(3): e117-125.
227. Sebe, A. és Z. Ivics (2016). "Reprogramming of Human Fibroblasts to Induced Pluripotent Stem Cells with Sleeping Beauty Transposon-Based Stable Gene Delivery." *Methods Mol Biol* 1400: 419-427.
228. Sebe, A., S. K. Leivonen, A. Fintha, A. Masszi, L. Rosivall, V. M. Kahari és I. Mucsi (2008). "Transforming growth factor-beta-induced alpha-smooth muscle cell actin expression in renal proximal tubular cells is regulated by p38beta mitogen-activated protein kinase, extracellular signal-regulated protein kinase1,2 and the Smad signalling during epithelial-myofibroblast transdifferentiation." *Nephrol Dial Transplant* 23(5): 1537-1545.
229. Sebe, A., A. Masszi, M. Zuly, T. Yeung, P. Speight, O. D. Rotstein, H. Nakano, I. Mucsi, K. Szaszi és A. Kapus (2008). "Rac, PAK and p38 regulate cell contact-

dependent nuclear translocation of myocardin-related transcription factor." *FEBS Lett* 582(2): 291-298.

230. Selvaraj, A. és R. Prywes (2004). "Expression profiling of serum inducible genes identifies a subset of SRF target genes that are MKL dependent." *BMC Mol Biol* 5: 13.

231. Selvaraj, A. és R. Prywes (2003). "Megakaryoblastic leukemia-1/2, a transcriptional co-activator of serum response factor, is required for skeletal myogenic differentiation." *J Biol Chem* 278(43): 41977-41987.

232. Shaw, T. J. és P. Martin (2016). "Wound repair: a showcase for cell plasticity and migration." *Curr Opin Cell Biol* 42: 29-37.

233. Shi, Y. és J. Massagué (2003). "Mechanisms of TGF- β Signaling from Cell Membrane to the Nucleus." *Cell* 113(6): 685-700.

234. Shimizu, R. T., R. S. Blank, R. Jervis, S. C. Lawrenz-Smith és G. K. Owens (1995). "The Smooth Muscle α -Actin Gene Promoter Is Differentially Regulated in Smooth Muscles versus Non-smooth Muscle Cells." *Journal of Biological Chemistry* 270(13): 7631-7643.

235. Siegel, R. L., K. D. Miller és A. Jemal (2015). "Cancer statistics, 2015." *CA Cancer J Clin* 65(1): 5-29.

236. Sisson, T. H., I. O. Ajayi, N. Subbotina, A. E. Dodi, E. S. Rodansky, L. N. Chibucos, K. K. Kim, V. G. Keshamouni, E. S. White, Y. Zhou, P. D. Higgins, S. D. Larsen, R. R. Neubig és J. C. Horowitz (2015). "Inhibition of myocardin-related transcription factor/serum response factor signaling decreases lung fibrosis and promotes mesenchymal cell apoptosis." *Am J Pathol* 185(4): 969-986.

237. Small, E. M., J. E. Thatcher, L. B. Sutherland, H. Kinoshita, R. D. Gerard, J. A. Richardson, J. M. Dimaio, H. Sadek, K. Kuwahara és E. N. Olson (2010). "Myocardin-related transcription factor-a controls myofibroblast activation and fibrosis in response to myocardial infarction." *Circ Res* 107(2): 294-304.

238. Smeda, M., A. Kieronska, M. G. Adamski, B. Proniewski, M. Sternak, T. Mohaissen, K. Przyborowski, K. Derszniak, D. Kaczor, M. Stojak, E. Buczek, A. Jaształ, J. Wietrzyk és S. Chlopicki (2018). "Nitric oxide deficiency and endothelial-mesenchymal transition of pulmonary endothelium in the progression of 4T1 metastatic breast cancer in mice." *Breast Cancer Res* 20(1): 86.

239. Smith, E. C., J. N. Thon, M. T. Devine, S. Lin, V. P. Schulz, Y. Guo, S. A. Massaro, S. Halene, P. Gallagher, J. E. Italiano, Jr. és D. S. Krause (2012). "MKL1 and MKL2 play redundant and crucial roles in megakaryocyte maturation and platelet formation." *Blood* 120(11): 2317-2329.
240. Speight, P., M. Kofler, K. Szaszi és A. Kapus (2016). "Context-dependent switch in chemo/mechanotransduction via multilevel crosstalk among cytoskeleton-regulated MRTF and TAZ and TGFbeta-regulated Smad3." *Nat Commun* 7: 11642.
241. Staus, D. P., A. L. Blaker, J. M. Taylor és C. P. Mack (2007). "Diaphanous 1 and 2 regulate smooth muscle cell differentiation by activating the myocardin-related transcription factors." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27(3): 478-486.
242. Steeg, P. S. (2016). "Targeting metastasis." *Nat Rev Cancer* 16(4): 201-218.
243. Stoletov, K., H. Kato, E. Zardoujian, J. Kelber, J. Yang, S. Shattil és R. Klemke (2010). "Visualizing extravasation dynamics of metastatic tumor cells." *J Cell Sci* 123(Pt 13): 2332-2341.
244. Strell, C. és F. Entschladen (2008). "Extravasation of leukocytes in comparison to tumor cells." *Cell Commun Signal* 6: 10.
245. Stroka, K. M., I. Levitan és H. Aranda-Espinoza (2012). "OxLDL and substrate stiffness promote neutrophil transmigration by enhanced endothelial cell contractility and ICAM-1." *J Biomech* 45(10): 1828-1834.
246. Strutz, F., H. Okada, C. W. Lo, T. Danoff, R. L. Carone, J. E. Tomaszewski és E. G. Neilson (1995). "Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP1." *J Cell Biol* 130(2): 393-405.
247. Subauste, M. C., M. Von Herrath, V. Benard, C. E. Chamberlain, T.-H. Chuang, K. Chu, G. M. Bokoch és K. M. Hahn (2000). "Rho Family Proteins Modulate Rapid Apoptosis Induced by Cytotoxic T Lymphocytes and Fas." *Journal of Biological Chemistry* 275(13): 9725-9733.
248. Sumioka, T., K. Ikeda, Y. Okada, O. Yamanaka, A. Kitano és S. Saika (2008). "Inhibitory effect of blocking TGF-beta/Smad signal on injury-induced fibrosis of corneal endothelium." *Mol Vis* 14: 2272-2281.
249. Sun, Q., G. Chen, J. W. Streb, X. Long, Y. Yang, C. J. Stoeckert, Jr. és J. M. Miano (2006). "Defining the mammalian CARome." *Genome Res* 16(2): 197-207.

250. Tan, T. Z., Q. H. Miow, Y. Miki, T. Noda, S. Mori, R. Y. Huang és J. P. Thiery (2014). "Epithelial-mesenchymal transition spectrum quantification and its efficacy in deciphering survival and drug responses of cancer patients." *EMBO Mol Med* 6(10): 1279-1293.
251. Tanaka, T., S. Saika, Y. Ohnishi, A. Ooshima, J. W. McAvoy, C. Y. Liu, M. Azhar, T. Doetschman és W. W. Kao (2004). "Fibroblast growth factor 2: roles of regulation of lens cell proliferation and epithelial-mesenchymal transition in response to injury." *Mol Vis* 10: 462-467.
252. Tang, D. G., J. Timar, I. M. Grossi, C. Renaud, V. A. Kimler, C. A. Diglio, J. D. Taylor és K. V. Honn (1993). "The lipoxygenase metabolite, 12(S)-HETE, induces a protein kinase C-dependent cytoskeletal rearrangement and retraction of microvascular endothelial cells." *Exp Cell Res* 207(2): 361-375.
253. Tanjore, H., X. C. Xu, V. V. Polosukhin, A. L. Degryse, B. Li, W. Han, T. P. Sherrill, D. Plieth, E. G. Neilson, T. S. Blackwell és W. E. Lawson (2009). "Contribution of epithelial-derived fibroblasts to bleomycin-induced lung fibrosis." *Am J Respir Crit Care Med* 180(7): 657-665.
254. Tata, P. R., H. Mou, A. Pardo-Saganta, R. Zhao, M. Prabhu, B. M. Law, V. Vinarsky, J. L. Cho, S. Breton, A. Sahay, B. D. Medoff és J. Rajagopal (2013). "Dedifferentiation of committed epithelial cells into stem cells in vivo." *Nature* 503(7475): 218-223.
255. ten Dijke, P. és H. M. Arthur (2007). "Extracellular control of TGFbeta signalling in vascular development and disease." *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(11): 857-869.
256. Tetteh, P. W., O. Basak, H. F. Farin, K. Wiebrands, K. Kretzschmar, H. Begthel, M. van den Born, J. Korving, F. de Sauvage, J. H. van Es, A. van Oudenaarden és H. Clevers (2016). "Replacement of Lost Lgr5-Positive Stem Cells through Plasticity of Their Enterocyte-Lineage Daughters." *Cell Stem Cell* 18(2): 203-213.
257. Thiery, J. P. és J. P. Sleeman (2006). "Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions." *Nat Rev Mol Cell Biol* 7(2): 131-142.
258. Thomas, R., A. Kanso és J. R. Sedor (2008). "Chronic kidney disease and its complications." *Prim Care* 35(2): 329-344, vii.

259. Tian, H., B. Biehs, S. Warming, K. G. Leong, L. Rangell, O. D. Klein és F. J. de Sauvage (2011). "A reserve stem cell population in small intestine renders Lgr5-positive cells dispensable." *Nature* 478(7368): 255-259.
260. Tian, W., Z. Fan, J. Li, C. Hao, M. Li, H. Xu, X. Wu, B. Zhou, L. Zhang, M. Fang és Y. Xu (2016). "Myocardin-related transcription factor A (MRTF-A) plays an essential role in hepatic stellate cell activation by epigenetically modulating TGF-beta signaling." *Int J Biochem Cell Biol* 71: 35-43.
261. Tran, H. D., K. Luitel, M. Kim, K. Zhang, G. D. Longmore és D. D. Tran (2014). "Transient SNAIL1 expression is necessary for metastatic competence in breast cancer." *Cancer Res* 74(21): 6330-6340.
262. Tremblay, P. L., F. A. Auger és J. Huot (2006). "Regulation of transendothelial migration of colon cancer cells by E-selectin-mediated activation of p38 and ERK MAP kinases." *Oncogene* 25(50): 6563-6573.
263. Tsukazaki, T., T. A. Chiang, A. F. Davison, L. Attisano és J. L. Wrana (1998). "SARA, a FYVE Domain Protein that Recruits Smad2 to the TGFβ Receptor." *Cell* 95(6): 779-791.
264. Tulley, S. és W. T. Chen (2014). "Transcriptional regulation of seprase in invasive melanoma cells by transforming growth factor-beta signaling." *J Biol Chem* 289(22): 15280-15296.
265. Ubil, E., J. Duan, I. C. Pillai, M. Rosa-Garrido, Y. Wu, F. Bargiacchi, Y. Lu, S. Stanbouly, J. Huang, M. Rojas, T. M. Vondriska, E. Stefani és A. Deb (2014). "Mesenchymal-endothelial transition contributes to cardiac neovascularization." *Nature* 514(7524): 585-590.
266. Valastyan, S. és R. A. Weinberg (2011). "Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms." *Cell* 147(2): 275-292.
267. van Es, J. H., T. Sato, M. van de Wetering, A. Lyubimova, A. N. Yee Nee, A. Gregorieff, N. Sasaki, L. Zeinstra, M. van den Born, J. Korving, A. C. M. Martens, N. Barker, A. van Oudenaarden és H. Clevers (2012). "Dll1+ secretory progenitor cells revert to stem cells upon crypt damage." *Nat Cell Biol* 14(10): 1099-1104.
268. van Roy, F. és G. Berx (2008). "The cell-cell adhesion molecule E-cadherin." *Cell Mol Life Sci* 65(23): 3756-3788.

269. Vandekerckhove, J. és K. Weber (1981). "Actin typing on total cellular extracts: a highly sensitive protein-chemical procedure able to distinguish different actins." *Eur J Biochem* 113(3): 595-603.
270. Vartiainen, M. K., S. Guettler, B. Larijani és R. Treisman (2007). "Nuclear actin regulates dynamic subcellular localization and activity of the SRF cofactor MAL." *Science* 316(5832): 1749-1752.
271. Velasquez, L. S., L. B. Sutherland, Z. Liu, F. Grinnell, K. E. Kamm, J. W. Schneider, E. N. Olson és E. M. Small (2013). "Activation of MRTF-A-dependent gene expression with a small molecule promotes myofibroblast differentiation and wound healing." *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(42): 16850-16855.
272. Vonach, C., K. Viola, B. Giessrigl, N. Huttary, I. Raab, R. Kalt, S. Krieger, T. P. Vo, S. Madlener, S. Bauer, B. Marian, M. Hammerle, N. Kretschy, M. Teichmann, B. Hantusch, S. Stary, C. Unger, M. Seelinger, A. Eger, R. Mader, W. Jager, W. Schmidt, M. Grusch, H. Dolznig, W. Mikulits és G. Krupitza (2011). "NF-kappaB mediates the 12(S)-HETE-induced endothelial to mesenchymal transition of lymphendothelial cells during the intravasation of breast carcinoma cells." *Br J Cancer* 105(2): 263-271.
273. Wang, D., P. S. Chang, Z. Wang, L. Sutherland, J. A. Richardson, E. Small, P. A. Krieg és E. N. Olson (2001). "Activation of cardiac gene expression by myocardin, a transcriptional cofactor for serum response factor." *Cell* 105(7): 851-862.
274. Wang, D. Z., S. Li, D. Hockemeyer, L. Sutherland, Z. Wang, G. Schratt, J. A. Richardson, A. Nordheim és E. N. Olson (2002). "Potentiation of serum response factor activity by a family of myocardin-related transcription factors." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(23): 14855-14860.
275. Weil, R. J., D. C. Palmieri, J. L. Bronder, A. M. Stark és P. S. Steeg (2005). "Breast Cancer Metastasis to the Central Nervous System." *The American Journal of Pathology* 167(4): 913-920.
276. Weinl, C., S. Castaneda Vega, H. Riehle, C. Stritt, C. Calaminus, H. Wolburg, S. Mael, A. Breithaupt, A. D. Gruber, B. Wasylyk, E. N. Olson, R. H. Adams, B. J. Pichler és A. Nordheim (2015). "Endothelial depletion of murine SRF/MRTF provokes intracerebral hemorrhagic stroke." *Proc Natl Acad Sci U S A* 112(32): 9914-9919.
277. Weinl, C., H. Riehle, D. Park, C. Stritt, S. Beck, G. Huber, H. Wolburg, E. N. Olson, M. W. Seeliger, R. H. Adams és A. Nordheim (2013). "Endothelial SRF/MRTF

- ablation causes vascular disease phenotypes in murine retinae." *J Clin Invest* 123(5): 2193-2206.
278. Weis, S., J. Cui, L. Barnes és D. Cheresh (2004). "Endothelial barrier disruption by VEGF-mediated Src activity potentiates tumor cell extravasation and metastasis." *J Cell Biol* 167(2): 223-229.
279. Widyantoro, B., N. Emoto, K. Nakayama, D. W. Anggrahini, S. Adiarto, N. Iwasa, K. Yagi, K. Miyagawa, Y. Rikitake, T. Suzuki, Y. Y. Kisanuki, M. Yanagisawa és K. Hirata (2010). "Endothelial cell-derived endothelin-1 promotes cardiac fibrosis in diabetic hearts through stimulation of endothelial-to-mesenchymal transition." *Circulation* 121(22): 2407-2418.
280. Wilhelm, I., A. E. Farkas, P. Nagyoszi, G. Varo, Z. Balint, G. A. Vegh, P. O. Couraud, I. A. Romero, B. Weksler és I. A. Krizbai (2007). "Regulation of cerebral endothelial cell morphology by extracellular calcium." *Phys Med Biol* 52(20): 6261-6274.
281. Wilhelm, I., C. Fazakas, J. Molnar, J. Hasko, A. G. Vegh, L. Cervenak, P. Nagyoszi, A. Nyul-Toth, A. E. Farkas, H. Bauer, G. J. Guillemin, H. C. Bauer, G. Varo és I. A. Krizbai (2014). "Role of Rho/ROCK signaling in the interaction of melanoma cells with the blood-brain barrier." *Pigment Cell Melanoma Res* 27(1): 113-123.
282. Wilhelm, I., J. Molnar, C. Fazakas, J. Hasko és I. A. Krizbai (2013). "Role of the blood-brain barrier in the formation of brain metastases." *Int J Mol Sci* 14(1): 1383-1411.
283. Winter, E. M., R. W. Grauss, B. Hogers, J. van Tuyn, R. van der Geest, H. Lie-Venema, R. V. Steijn, S. Maas, M. C. DeRuiter, A. A. deVries, P. Steendijk, P. A. Doevendans, A. van der Laarse, R. E. Poelmann, M. J. Schalij, D. E. Atsma és A. C. Gittenberger-de Groot (2007). "Preservation of left ventricular function and attenuation of remodeling after transplantation of human epicardium-derived cells into the infarcted mouse heart." *Circulation* 116(8): 917-927.
284. Wolf, G., G. Zahner, R. Schroeder és R. A. Stahl (1996). "Transforming growth factor beta mediates the angiotensin-II-induced stimulation of collagen type IV synthesis in cultured murine proximal tubular cells." *Nephrol Dial Transplant* 11(2): 263-269.
285. Wolf, G., F. N. Ziyadeh és R. A. Stahl (1999). "Angiotensin II stimulates expression of transforming growth factor beta receptor type II in cultured mouse proximal tubular cells." *J Mol Med (Berl)* 77(7): 556-564.

286. Wolf, M. J., A. Hoos, J. Bauer, S. Boettcher, M. Knust, A. Weber, N. Simonavicius, C. Schneider, M. Lang, M. Sturzl, R. S. Croner, A. Konrad, M. G. Manz, H. Moch, A. Aguzzi, G. van Loo, M. Pasparakis, M. Prinz, L. Borsig és M. Heikenwalder (2012). "Endothelial CCR2 signaling induced by colon carcinoma cells enables extravasation via the JAK2-Stat5 and p38MAPK pathway." *Cancer Cell* 22(1): 91-105.
287. Xiao, L., D. J. Kim, C. L. Davis, J. V. McCann, J. M. Dunleavey, A. K. Vanderlinden, N. Xu, S. G. Pattenden, S. V. Frye, X. Xu, M. Onaitis, E. Monaghan-Benson, K. Burridge és A. C. Dudley (2015). "Tumor Endothelial Cells with Distinct Patterns of TGFbeta-Driven Endothelial-to-Mesenchymal Transition." *Cancer Res* 75(7): 1244-1254.
288. Xu, H., X. Wu, H. Qin, W. Tian, J. Chen, L. Sun, M. Fang és Y. Xu (2015). "Myocardin-Related Transcription Factor A Epigenetically Regulates Renal Fibrosis in Diabetic Nephropathy." *J Am Soc Nephrol* 26(7): 1648-1660.
289. Yang, A. D., E. R. Camp, F. Fan, L. Shen, M. J. Gray, W. Liu, R. Somcio, T. W. Bauer, Y. Wu, D. J. Hicklin és L. M. Ellis (2006). "Vascular endothelial growth factor receptor-1 activation mediates epithelial to mesenchymal transition in human pancreatic carcinoma cells." *Cancer Res* 66(1): 46-51.
290. Yang, J. és Y. Liu (2001). "Dissection of key events in tubular epithelial to myofibroblast transition and its implications in renal interstitial fibrosis." *Am J Pathol* 159(4): 1465-1475.
291. Yanger, K., D. Knigin, Y. Zong, L. Maggs, G. Gu, H. Akiyama, E. Pikarsky és B. Z. Stanger (2014). "Adult hepatocytes are generated by self-duplication rather than stem cell differentiation." *Cell Stem Cell* 15(3): 340-349.
292. Yanger, K., Y. Zong, L. R. Maggs, S. N. Shapira, R. Maddipati, N. M. Aiello, S. N. Thung, R. G. Wells, L. E. Greenbaum és B. Z. Stanger (2013). "Robust cellular reprogramming occurs spontaneously during liver regeneration." *Genes Dev* 27(7): 719-724.
293. Yu, L., M. C. Hebert és Y. E. Zhang (2002). "TGF-beta receptor-activated p38 MAP kinase mediates Smad-independent TGF-beta responses." *EMBO J* 21(14): 3749-3759.
294. Yu, M., A. Bardia, B. S. Wittner, S. L. Stott, M. E. Smas, D. T. Ting, S. J. Isakoff, J. C. Ciciliano, M. N. Wells, A. M. Shah, K. F. Concannon, M. C. Donaldson, L. V.

- Sequist, E. Brachtel, D. Sgroi, J. Baselga, S. Ramaswamy, M. Toner, D. A. Haber és S. Maheswaran (2013). "Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition." *Science* 339(6119): 580-584.
295. Yu, Y., C. H. Xiao, L. D. Tan, Q. S. Wang, X. Q. Li és Y. M. Feng (2014). "Cancer-associated fibroblasts induce epithelial-mesenchymal transition of breast cancer cells through paracrine TGF-beta signalling." *Br J Cancer* 110(3): 724-732.
296. Zanconato, F., G. Battilana, M. Cordenonsi és S. Piccolo (2016). "YAP/TAZ as therapeutic targets in cancer." *Curr Opin Pharmacol* 29: 26-33.
297. Zaromytidou, A. I., F. Miralles és R. Treisman (2006). "MAL and ternary complex factor use different mechanisms to contact a common surface on the serum response factor DNA-binding domain." *Mol Cell Biol* 26(11): 4134-4148.
298. Zeisberg, E. M., S. Potenta, L. Xie, M. Zeisberg és R. Kalluri (2007). "Discovery of endothelial to mesenchymal transition as a source for carcinoma-associated fibroblasts." *Cancer Res* 67(21): 10123-10128.
299. Zeisberg, E. M., S. E. Potenta, H. Sugimoto, M. Zeisberg és R. Kalluri (2008). "Fibroblasts in kidney fibrosis emerge via endothelial-to-mesenchymal transition." *J Am Soc Nephrol* 19(12): 2282-2287.
300. Zeisberg, E. M., O. Tarnavski, M. Zeisberg, A. L. Dorfman, J. R. McMullen, E. Gustafsson, A. Chandraker, X. Yuan, W. T. Pu, A. B. Roberts, E. G. Neilson, M. H. Sayegh, S. Izumo és R. Kalluri (2007). "Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis." *Nat Med* 13(8): 952-961.
301. Zeisberg, M. és E. G. Neilson (2009). "Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions." *J Clin Invest* 119(6): 1429-1437.
302. Zeisberg, M. és E. G. Neilson (2010). "Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis." *J Am Soc Nephrol* 21(11): 1819-1834.
303. Zeisberg, M., F. Strutz és G. A. Muller (2001). "Renal fibrosis: an update." *Curr Opin Nephrol Hypertens* 10(3): 315-320.
304. Zeisberg, M., C. Yang, M. Martino, M. B. Duncan, F. Rieder, H. Tanjore és R. Kalluri (2007). "Fibroblasts derive from hepatocytes in liver fibrosis via epithelial to mesenchymal transition." *J Biol Chem* 282(32): 23337-23347.
305. Zhang, H.-Y., M. Kluge, R. Timpl, M.-L. Chu és P. Ekblom (1993). "The extracellular matrix glycoproteins BM-90 and tenascin are expressed in the mesenchyme

at sites of endothelial-mesenchymal conversion in the embryonic mouse heart." *Differentiation* 52(3): 211-220.

306. Zhang, W., B. Jiang, Z. Guo, C. Sardet, B. Zou, C. S. Lam, J. Li, M. He, H. Y. Lan, R. Pang, I. F. Hung, V. P. Tan, J. Wang és B. C. Wong (2010). "Four-and-a-half LIM protein 2 promotes invasive potential and epithelial-mesenchymal transition in colon cancer." *Carcinogenesis* 31(7): 1220-1229.

307. Zheng, X., J. L. Carstens, J. Kim, M. Scheible, J. Kaye, H. Sugimoto, C. C. Wu, V. S. LeBleu és R. Kalluri (2015). "Epithelial-to-mesenchymal transition is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer." *Nature* 527(7579): 525-530.

308. Zhu, H., P. Kavsak, S. Abdollah, J. L. Wrana és G. H. Thomsen (1999). "A SMAD ubiquitin ligase targets the BMP pathway and affects embryonic pattern formation." *Nature* 400(6745): 687-693.

309. Zhuang, J., Q. Lu, B. Shen, X. Huang, L. Shen, X. Zheng, R. Huang, J. Yan és H. Guo (2015). "TGFbeta1 secreted by cancer-associated fibroblasts induces epithelial-mesenchymal transition of bladder cancer cells through lncRNA-ZEB2NAT." *Sci Rep* 5: 11924.

310. Zolak, J. S., R. Jagirdar, R. Surolia, S. Karki, O. Oliva, T. Hock, P. Guroji, Q. Ding, R. M. Liu, S. Bolisetty, A. Agarwal, V. J. Thannickal és V. B. Antony (2013). "Pleural mesothelial cell differentiation and invasion in fibrogenic lung injury." *Am J Pathol* 182(4): 1239-1247.

X. Saját publikációk jegyzéke

X.1. A disszertációhoz kapcsolódó közlemények

1. Fintha A, Gasparics Á, Fang L, Erdei Z, Hamar P, Mózes MM, Kökény G, Rosivall L, Sebe A. (2013) Characterization and role of SCAI during renal fibrosis and epithelial-mesenchymal transition. *Am J Pathol.* 182(2):388-400. IF: 4,602
2. Krizbai IA, Gasparics A, Nagyószai P, Fazakas C, Molnár J, Wilhelm I, Bencs R, Rosivall L, Sebe A. (2015) Endothelial-mesenchymal transition of brain endothelial cells: possible role during metastatic extravasation. *PLoS One.* 10(3):e0119655. IF: 3,057
3. Gasparics A, Rosivall L, Krizbai IA, Sebe A. (2016) When the endothelium scores an own goal: endothelial cells actively augment metastatic extravasation through endothelial-mesenchymal transition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 1; 310(9):H1055-63. IF: 3,348
4. Gasparics, Á. and Sebe, A. (2018), MRTFs- master regulators of EMT. *Dev. Dyn.*, 247(3):396-404. IF: 2.507
5. Gasparics Á, Kökény G, Fintha A, Bencs R, Mózes MM, Ágoston EI, Buday A, Ivics Z, Hamar P, Gyórfy B, Rosivall L, Sebe A. (2018) Alterations in SCAI Expression during Cell Plasticity, Fibrosis and Cancer. *Pathol Oncol Res.* 24(3):641-651. IF: 1,935

XI.2. A disszertációtól független közlemények

1. Varga P, Berecz B, Gasparics Á, Dombi Z, Varga Z, Jeager J, Magyar Z, Rigó J Jr, Joó JG, Kornya L. (2017) Morbidity and mortality trends in very-very low birth weight premature infants in light of recent changes in obstetric care. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 211:134-139. IF: 1,809
2. Varga P, Berecz B, Pete B, Kollár T, Magyar Z, Jeager J, Görbe ÉR, Rigó J, Joó JG, Gasparics Á.. (2018) Trends in Mortality and Morbidity in Infants Under 500 Grams Birthweight: Observations from Our Neonatal Intensive Care Unit (NICU) *Med Sci Monit.* 24:4474-4480. IF: 1,894

XI. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Sebe Attilának, aki egyetemi hallgatóként végzett TDK-munkám során megismertetett a tudományos kutatás alapjaival, majd témavezetőmként fáradhatatlanul támogatott, s akinek elhivatottsága mindmáig példaértékű számomra.

Köszönöm Prof. Dr. Rosivall Lászlónak, hogy lehetőséget teremtett a Kórélettani Intézetben tudományos diákköri munkámra, majd a doktori programban való részvételem során is folyamatosan támogatott.

Köszönöm Bencs Ritának a kísérletekhez nyújtott türelmes és gondos odafigyelését, Dr. Kökény Gábor értékes útmutatásait és a Kórélettani Intézet valamennyi munkatársának segítségét.

Köszönöm az I. Sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika NIC osztályának, hogy klinikusi munkám mellett dolgozatom megírásában is támogattak.

Köszönöm az „EMT Fan Club” minden tagjának a közös munkát, biztatást, és a sok-sok vidám percet.

Köszönöm Szüleim bátorítását, és értékes nyelvtani, helyesírási javaslataikat a dolgozat szövegének végső megformálásához.

Végezetül köszönöm Családom, barátaim türelmét és szeretetét, amit dolgozatom megírása során nyújtottak.