

**A CFTR HIÁNYA PMCA4 DISZFUNKCIÓT,  
INTRACELLULÁRIS CA<sup>2+</sup> EMELKEDÉST ÉS  
EPITÉLSEJT KÁROSODÁSÁT OKOZ ALKOHOLOS  
PANKREATÍTISZBEN ÉS HEPATÍTISZBEN**

Ph.D. Tézis

Madácsy Tamara



Témevezető: Dr. Maléth József

Szegedi Tudományegyetem  
Szent-Györgyi Albert Általános Orvostudományi Kar  
Belgyógyászati Klinika

2022.04.06.

## PUBLIKCIÓK LISTÁJA:

### A tézishez kapcsolódó publikációk:

- I. **Tamara Madacsy**, Árpád Varga, Noémi Papp, Bálint Tél, Petra Pallagi, Viktória Szabó, Aletta Kiss, Júlia Fanczal, Zoltan Rakoncay Jr, László Tiszlavicz, Zsolt Rázga, Meike Hohwieler, Alexander Kleger, Mike Gray, Péter Hegyi, József Maléth; Impaired Regulation of PMCA Activity by Defective CFTR Expression Promotes Epithelial Cell Damage in Alcoholic Pancreatitis and Hepatitis; CELLULAR AND MOLECULAR LIFE SCIENCES (2022) D1 **IF: 9.261**

### A nem tézishez kapcsolódó publikációk:

- I. Pallagi, Petra; Görög, Marietta \*; Papp, Noémi; **Madácsy, Tamara**; Varga, Árpád; Crul, Tim; Szabó, Viktória; Molnár, Melinda; Dudás, Krisztina; Grassalkovich, Anna et al. Bile acid- and ethanol-mediated activation of Orai1 damages pancreatic ductal secretion in acute pancreatitis JOURNAL OF PHYSIOLOGY-LONDON (2022) D1 DOI: 10.1113/JP282203 **IF: 5,182**
- II. Balla, Z; Kormanyos, ES; Kui, B; Balint, ER; Für, G; Orján, ME; Ivanyi, B; Vecsei, L; Fulop, F; Varga, G, **Madacsy, T**, et al. Kynurenic acid and its analogue SZR-72 ameliorate the severity of experimental acute necrotizing pancreatitis FRONTIERS IN IMMUNOLOGY: Q1 DOI: 10.3389/fimmu.2021.702764 **IF: 7,561**
- III. Breunig, Markus; Merkle, Jessica; Wagner, Martin; Melzer, Michael K; Barth, Thomas F E; Engleitner, Thomas; Krumm, Johannes; Wiedenmann, Sandra; Cohrs, Christian M; Perkhof, Lukas, **Madacsy, Tamara** et al. Modeling plasticity and dysplasia of pancreatic ductal organoids derived from human pluripotent stem cells. CELL STEM CELL (2021) D1 DOI: 10.1016/j.stem.2021.03.005 **IF: 24,633**
- IV. Déri, Szilvia; Borbás, János; Hartai, Teodóra; Hategan, Lidia; Csányi, Beáta; Visnyovszki, Ádám; **Madácsy, Tamara**; Maléth, József; Hegedűs, Zoltán; Nagy, István et al. Impaired cytoplasmic domain interactions cause co-assembly defect and loss of function in the p.Glu293Lys KNCJ2 variant isolated from an Andersen-Tawil Syndrome patient CARDIOVASCULAR RESEARCH (2021: D1 DOI: 10.1093/cvr/cvaa249 **IF: 10,787**
- V. Kata Judit, Szántó; **Tamara, Madácsy**; Diána, Kata; Tamás, Ferenci; Mariann, Rutka; Anita, Bálint; Renáta, Bor; Anna, Fábián; Ágnes, Milassin; Boldizsár, Jójárt et al. Advances in the optimisation of therapeutic drug monitoring using serum, tissue and faecal anti-tumour necrosis factor concentration in patients with inflammatory bowel disease treated with TNF- $\alpha$  antagonists EXPERT OPINION ON BIOLOGICAL THERAPY (2021) Q1 Folyóirat szakterülete: Scopus - Drug Discovery SJR Q1 DOI: 10.1080/14712598.2021.1890712 **IF: 4,388**
- VI. Bálint, Anita; Farkas, Klaudia; Méhi, Orsolya; Kintses, Bálint; Vásárhelyi, Bálint Márk; Ari, Eszter; Pál, Csaba; **Madácsy, Tamara**; Maléth, József; Szántó, Kata Judit et al. Functional Anatomical Changes in Ulcerative Colitis Patients Determine Their Gut Microbiota Composition and Consequently the Possible Treatment Outcome PHARMACEUTICALS (2020) D1 DOI: 10.3390/ph13110346 **IF: 5,863**
- VII. Fanczal, Júlia; Pallagi, Petra \*; Görög, Marietta; Diszházi, Gyula; Almássy, János; **Madácsy, Tamara**; Varga, Árpád; Csernay-Biró, Péter; Katona, Xénia; Tóth, Emese et al. TRPM2-

- mediated extracellular Ca<sup>2+</sup> entry promotes acinar cell necrosis in biliary acute pancreatitis  
 JOURNAL OF PHYSIOLOGY-LONDON (2020) D1 DOI: 10.1113/JP279047 **IF: 5,182**
- VIII. Molnár, Réka; **Madácsy, Tamara**; Varga, Árpád; Németh, Margit; Katona, Xénia; Görög, Marietta; Molnár, Brigitta; Fanczal, Júlia; Rakonczay, Zoltán; Hegyi, Péter et al. Mouse pancreatic ductal organoid culture as a relevant model to study exocrine pancreatic ion secretion  
 LABORATORY INVESTIGATION (2020) Q1 DOI: 10.1038/s41374-019-0300-3 **IF: 5,662**
- IX. Pallagi, Petra; **Madácsy, Tamara\***; Varga, Árpád; Maléth, József Intracellular Ca<sup>2+</sup> Signalling in the Pathogenesis of Acute Pancreatitis: Recent Advances and Translational Perspectives  
 INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES (2020) D1 DOI: 10.3390/ijms21114005 **IF: 5,924**
- X. 11. Bakondi, Edina; Singh, Salam Bhopen \*; Hajnády, Zoltán; Nagy-Pénzes, Máté; Regdon, Zsolt; Kovács, Katalin; Hegedűs, Csaba; **Madácsy, Tamara**; Maléth, József; Hegyi, Péter et al. Spilanthol Inhibits Inflammatory Transcription Factors and iNOS Expression in Macrophages and Exerts Anti-inflammatory Effects in Dermatitis and Pancreatitis. INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES (2019) D1 DOI: 10.3390/ijms20174308 **IF: 4,556**
- XI. **Madacsy, Tamara\***; Pallagi, Petra \*; Maleth, Jozsef Cystic Fibrosis of the Pancreas: The Role of CFTR Channel in the Regulation of Intracellular Ca<sup>2+</sup> Signaling and Mitochondrial Function in the Exocrine Pancreas  
 FRONTIERS IN PHYSIOLOGY (2018): Q2 DOI: 10.3389/fphys.2018.01585 **IF: 3,201**
- XII. Szentesi, A; Toth, E; Balint, E; Fanczal, J; **Madacsy, T**; Laczko, D; Ignath, I; Balazs, A; Pallagi, P et al. Analysis of Research Activity in Gastroenterology: Pancreatitis Is in Real Danger  
 PLOS ONE (2016) Q1 DOI: 10.1371/journal.pone.0165244 **IF: 2,806**
- XIII. **Madácsy, T**; Maléth, J New findings in the pathogenesis of acute pancreatitis. CENTRAL EUROPEAN JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY AND HEPATOLOGY / GASTROENTEROLÓGIAI ÉS HEPATOLÓGIAI (2015)
- XIV. Maleth, J \*; **Madacsy, T \***; Pallagi, P; Balazs, A; Venglovecz, V; Rakonczay, Z Jr; Hegyi, P Pancreatic epithelial fluid and bicarbonate secretion is significantly elevated in the absence of peripheral serotonin. GUT (2015) D1 DOI: 10.1136/gutjnl-2015-309776 **IF: 14,921**
- XV. Bereczki, Zsolt; **Madácsy, Tamara**; Király, Kitty; Sóskuti, Kornél; Paja, László Szarmata sebészi trepanációk a Kárpát-medencében  
 ANTHROPOLOGIAI KÖZLEMÉNYEK 61pp.25-32.,8p.(2020)DOI: 10.20330/AnthropKozl.2020.61.25

**Number of full publications: 16 (5 first author)**

**Cummulative IF: 109.927**

## BEVEZETÉS

A túlzott alkoholfogyasztás évente több mint 3 millió halálesetet okoz világszerte, amely az összes éves haláleset 5,3%-nak felel meg. A máj és a hasnyálmirigy a betegségei kiemelkednek az alkohollal kapcsolatos rendellenességek közül terápiás kihívásaik és társadalmi-gazdasági terheik miatt. Az AP egyik leggyakoribb formája az alkohol okozta akut pankreatítisz (AP), amely súlyos esetekben rendkívül magas mortalitással jár. Csoportunk már korábban bizonyította, hogy az etanol és a zsírsavak által közvetített cisztás fibrózis transzmembrán konduktancia regulátor (CFTR) expressziójának és aktivitásának csökkenése a hasnyálmirigy duktális sejtjeiben csökkent  $\text{HCO}_3^-$  szekréciónak és az alkohol indukált AP súlyosságának növekedését okozza. Továbbá azt is kimutattuk, hogy az etanol és a zsírsavak károsítják a CFTR foldingját és csökkentik a fehérje plazmamembrán-stabilitását. Az alkoholos hepatítisz (AH) az alkoholos májbetegség potenciálisan halálos szövődménye, amelyet korábban a májsejtek károsodásának tulajdonítottak. Vizsgálatok kimutatták, hogy a kolesztatikus májkárosodás részt vehet az AH patogenezisében, továbbá, hogy a kolangiociták károsodott szekréciónak a kolesztázis súlyosbodásához vezet. Takeuchi és munkatársai kiemelték, hogy AH-ban az integrin béta-1 (ITGB1) által közvetített neutrofilek kolangiocitákhoz való kötődése kolesztázis kialakulásához vezet. Jól ismert, hogy a kolangiociták szekréciónak nagymértékben függ az apikálisan expresszálódó CFTR megfelelő működésétől. Ezért, figyelembe véve, hogy az alkohol által közvetített, a CFTR expressziójára közvetlen gyakorolt hatását más szervekben, például a verejtékmirigyekben is megfigyelték, feltételezhető, hogy a károsodott CFTR-expresszió hozzájárulhat az AH-val összefüggő kolesztázishoz.

Általánosságban elmondható, hogy az ionvezetés hiánya és a károsodott folyadékszékreciónak, amely végül a szerv morfológiai változásaihoz és sorvadásához vezet, központi szerepet játszanak a CFTR-rel kapcsolatos rendellenességek. A közelmúltban azonban a CFTR összetettebb, integratív szerepét mutatták ki, az intracelluláris jelátviteli események szabályozásában, amelyek potenciálisan részt vesznek a CFTR-rel összefüggésben kialakuló sejt- és szövetkárosodás kialakulásában. Philippe és munkatársai primér légúti epitelsejteken írták le cisztás fibrózissal (CF) összefüggésben, hogy fokozódik az  $\text{IP}_3$ -függő  $\text{Ca}^{2+}$ -felszabadulás, emelkedik a szarko/endoplazmatikus retikulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPáz (SERCA) pumpa aktivitása, továbbá csökken a plazmamembrán  $\text{Ca}^{2+}$  pumpa (PMCA) funkciója, amellyel párhuzamosan fokozódik a mitokondriális  $\text{Ca}^{2+}$ -felvétel. Különösen az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  jelátvitel megváltozása - mint például a tartós intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  túlterhelés, amelyet a

károsodott SERCA- és PMCA-aktivitás közvetít - a hasnyálmirigy acinális és duktális epitél sejtjeiben az AP jól ismert jellemzője. Nemrégiben Bozoky és munkatársai kimutatták, hogy a kalmodulin a CFTR-ral alternatív kötési konformációban lép kölcsönhatásba. A szerzők felvetették, hogy a CFTR kalmodulinhoz való kötődése lehetővé teheti a CFTR számára a kalmodulin rekrutálását, és ezt követően más kalmodulin által szabályozott fehérjék, például az intracelluláris  $Ca^{2+}$  homeosztázis szabályozásában részt vevő fehérjék aktivitásának meghatározását. Az azonban, hogy ezek a szubcelluláris változások, hogyan befolyásolják a gasztrointesztinális traktus epitélsejtjeinek működését alkoholos pankreatitiszben és hepatitiszben, jelenleg nem ismert.

Ezért célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk az etanol hatását a CFTR aktivitására és expressziójára kolangiocitákban, és elemezzük az etanol által közvetített CFTR-károsodás hatását az intracelluláris  $Ca^{2+}$  homeosztázisra a hasnyálmirigy duktális epitél sejtjeiben és a kolangiocitákban független modellek felhasználásával.

## **ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK**

### **Etika**

Az állatok felhasználása az NIH iránymutatásainak és a 2010/63/EU irányelvnek megfelelően történt (XXI./2523/2018). A humán minták, köztük a kadáver donor hasnyálmirigy- és májminták gyűjtését és felhasználását az EU szabványok betartásával végeztük 37/2017-SZTE.

### **Sejtvonalak és állatok**

A HeLa sejteket a gyártó protokollja szerint tenyésztettük. A CFPAC-1 sejtek Michael Gray ajándékai voltak. A Cfr KO egereket Ratcliff és munkatársai bocsájtották rendelkezésünkre.

### **A hasnyálmirigy duktális fragmentek és acinus sejtek izolálása**

A hasnyálmirigy duktális fragmentumokat sztereomikroszkóp alatt izoláltuk. A hasnyálmirigy acinus sejtek izolálásához a szövetet 4-es típusú kollagenázzal injektáltuk, centrifugáltuk, majd a pelletet reszuszpendáltuk Media 199-ben.

### **Egér és humán organoid kultúrák**

Az egér hasnyálmirigy duktális és máj organoidokat Clevers és Tuveson protokollja szerint hoztuk létre. A humán hasnyálmirigy-szövetmintákat transzplantációs donoroktól gyűjtöttük.

### **Humán CF-specifikus indukált pluripotens őssejtek előállítása**

CF-beteg vagy egészséges donorok hajhagymáiból izolált keratinociták átprogramozásával CF-specifikus és kontroll indukált pluripotens őssejteket hoztunk létre. A CF-beteg a p.F508del és a p.L1258Ffs\*7 összetett heterozigóta mutációkat hordozta.

### **Konstrukciók és transzfekció**

HeLa sejteket Lipofectamine2000 segítségével EGFP-hPMCA4b, mCherry-CFTR-3xHA és mCherry-CFTR-3xHA(S768A) kódoló plazmidokkal transzfektáltunk. A Site-directed mutagenézist a Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit segítségével a gyártó protokollja szerint végeztük. A Cftr csendesítéséhez a csatornákat 50 nM siCFTR vagy siGLO-Green transzfekciós indikátorral transzfektáltuk Opti-MEM-ben.

### **Fluoreszcens mikroszkópia**

Az intracelluláris  $[Ca^{2+}]_i$ , pH és a  $Cl^-$  szintek mérése Fura-2-AM, BCECF-AM, illetve MQAE festékek segítségével történt. A mitokondriális membránpotenciál ( $\Delta\Psi_m$ ) változásait tetrametilrodamin-metilészterrel (TMRM) követtük. A méréseket egy MT-20 megvilágítórendszerrel felszerelt Olympus IX71 fluoreszcens végeztük.

### **Génexpressziós elemzés**

RNS-t teljes hasnyálmirigyszövetből, izolált duktális fragmentumokból, valamint hasnyálmirigy- vagy máj organoidokból izoláltunk. A relatív génexpressziós elemzést  $\Delta\Delta Cq$  technikával végeztük. Az RNS-szekvenálást Illumina NextSeq 500 műszerrel végeztünk egér és humán hasnyálmirigy duktális organoidokon. A génexpressziós mintázatot a TPM (transzkript/millió) értékek alapján határoztuk meg.

### **Immunfluoreszcens- és immunhisztokémiai jelölés és Duolink® Proximity Ligation Assay**

Az izolált hasnyálmirigy-ductuszokat vagy organoidokat fagyasztás után metszettük és festettük immunfluoreszcens mikroszkópiához. A sejtvonalakat fedőüvegre növesztettük. A CFTR immunhisztokémiai jelölését egy Leica Bond-MAX automatizált IHC festő rendszerrel végeztük. A Duolink® vizsgálatot az antigén-feltárást követően nedves kamrán végeztük a gyártó protokollja szerint. A képeket 40X olajimmerziós objektívvel (Zeiss, NA: 1,4) Zeiss LSM880 konfokális mikroszkóppal készítettük.

### **Közvetlen sztochasztikus optikai rekonstrukciós mikroszkópia (dSTORM)**

A fedőüvegre növesztett HeLa sejteket megfelelő plazmidokkal transzfektáltuk. A dSTORM képeket Nanoimager S (Oxford Nanoimaging ONI Ltd.) készülékkel készítettük.

### **Transzmissziós elektronmikroszkópia**

A hasnyálmirigy-szövetet fixálás után Embed812-be ágyaztuk, majd Leica ultramikrotómmal ultravékony metszeteket vágunk. A képeket egy Jeol 1400 plus elektronmikroszkóppal készítettük 12000X nagyítással.

### **FAEE által kiváltott akut hasnyálmirigy-gyulladás egerekben**

A FAEE által kiváltott AP-t vad típusú (WT) FVB/N egerekben idéztük elő. Az állatok két alkalommal kaptak intraperitoneális etanol (1,35 g/testsúlykg) és palmitoleinsav (POA;150 mg/testsúlykg) vagy ezzel egyenértékű térfogatú vivőanyagot tartalmazó (25% DMSO, 75%

steril víz) injekciót. A kezelt csoportok 90 perccel az etanol/POA vagy a hordozó első injekciója előtt egy adag aurintrikarbonsavat (ATA) (5 mg/testsúlykg) kaptak intraperitoneálisan vivőanyagban (25% DMSO, 75% steril víz). A hasnyálmirigy-gyulladás súlyosságát a szövettani metszetek elemzésével és a szérum amiláz-aktivitás mérésével értékeltük.

### **Statisztikai elemzés**

A statisztikai elemzést Graphpad Prism szoftverrel végeztük.

## **EREDMÉNYEK**

### **A CFTR hiánya károsítja a plazmamembrán $Ca^{2+}$ pumpa működését a hasnyálmirigy duktális epitél sejtekben**

Hipotézisünk szerint a krónikus alkohol fogyasztás által okozott csökkent CFTR-expresszió önmagában elegendő ahhoz, hogy megzavarja a gasztrointesztinális epitél sejtek  $Ca^{2+}$  homeosztázisát. Korábban már megállapítottuk, hogy az etanol akut expozíciója az ER-ből  $Ca^{2+}$ -t szabadít fel és aktiválja az extracelluláris  $Ca^{2+}$  beáramlást a hasnyálmirigy duktális epitél sejtekben. Annak vizsgálatára, hogy a csökkent Cfr-expresszió megzavarja-e az intracelluláris  $Ca^{2+}$  homeosztázist, vad típusú (WT) és Cfr KO egerekből izolált hasnyálmirigy-ductuszokat karbakollal kezeltünk. Míg a maximális  $Ca^{2+}$  felszabadulás válasza nem különbözött a két csoport között, a  $Ca^{2+}$  jel platófázisának meredeksége - amely a citoszólból történő  $Ca^{2+}$  extrúziót reprezentálja - szignifikánsan magasabb volt a Cfr KO duktális fragmentumokban a WT-hoz képest. A következő kísérlethez WT és Cfr KO egerekből generált egér hasnyálmirigy organoidokat (MPO) használtunk. A WT organoidokat 100 mM etanollal (EtOH) és 200  $\mu$ M palmitinsavval (PA) kezeltük 12 órán keresztül, a kontroll és Cfr KO MPO-k nem kaptak kezelést. Az ER  $Ca^{2+}$  raktárak ürítését követően az extracelluláris  $Ca^{2+}$  újbóli hozzáadásával (25  $\mu$ M ciklopiazonsav (CPA)  $Ca^{2+}$  -mentes közegben) aktiváltuk a raktárfüggő  $Ca^{2+}$  beáramlást. A bazális intracelluláris  $Ca^{2+}$ -koncentrációk szignifikánsan magasabbak voltak az EtOH-val kezelt és a Cfr KO organoidokban. A várakozásoknak megfelelően az ER  $Ca^{2+}$  felszabadulása a CPA-ra adott válaszként alacsonyabb volt az EtOH-val kezelt organoidokban, és nem változott a Cfr KO organoidokban, míg mind az EtOH-val kezelt, mind a Cfr KO organoidok jelentősen csökkent  $Ca^{2+}$  extrúziót mutattak az extracelluláris  $Ca^{2+}$  eltávolítása után. Ugyanez a jelenség megfigyelhető volt Cfr KO duktális fragmentumokban is. Ezután humán hasnyálmirigy organoidokat (HPO) kezeltünk 100 mM EtOH-val és 200  $\mu$ M PA-val egy éjszakán át. Fontos, hogy a kezeletlen HPO-khoz képest a  $Ca^{2+}$  extrúzió jelentősen csökkent az előinkubálás után. Annak megerősítésére, hogy a  $Ca^{2+}$  -

extrúzióban megfigyelt különbség specifikus a CFTR-expresszáló sejtekre, elemeztük a  $\text{Ca}^{2+}$  jelátvitelt a hasnyálmirigy acinus sejtjeiben, amelyekből általánosan hiányzik a CFTR, és nem észleltünk különbséget a karbakolra adott válaszban (maximális intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  felszabadulás vagy extrúzió) a WT és Cfr KO egerek acinusai között. A CFTR funkcionális gátlása 10  $\mu\text{M}$  CFTR(inh)-172-vel - amely jelentősen csökkentette a CFTR aktivitását - nem volt hatással a karbakol által kiváltott  $\text{Ca}^{2+}$  extrúzióra a WT duktális epitél sejtekben. CFPAC-1 sejtekben - amelyek egy CF-beteg hasnyálmirigy duktális adenokarcinómájának májmetasztázisából származnak - a CFTR expressziójának korrekciója, helyreállította a  $\text{Ca}^{2+}$  extrúziót. Ezzel szemben a CFTR expressziójának kiütése a WT duktális fragmentumokban siCFTR-rel csökkentette a  $\text{Ca}^{2+}$  extrúziót a kontrollhoz képest. Tekintettel arra, hogy mind a PMCA, mind a  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  cserélők (NCX) képesek továbbítani a  $\text{Ca}^{2+}$  extrúziót a nem-élénkíthető sejtekben, a SEA0400 és CB-DMB pán-NCX gátlókat használtuk az NCX szerepének felmérésére. Kísérleteinkben, egyik inhibitor sem volt hatással a csökkenés meredekségére. A közelmúltban kimutatták, hogy a STIM1 partner (POST) - egy adaptor fehérje, amely az STIM1-et más fehérjékhez kapcsolja - fokozza a PMCA4 működését. Esetünkben azonban a siSTIM1 gátlása nem volt hatással a  $\text{Ca}^{2+}$  kiáramlásra, ami arra utal, hogy a Stim1-POST interakció nem vesz részt a PMCA szabályozásában epitél sejtekben. Összességében ezek az eredmények azt jelzik, hogy a CFTR expressziójának csökkenése etanol kezelés hatására (és nem az aktivitás hiánya) elegendő a PMCA aktivitás redukcióján keresztül a  $\text{Ca}^{2+}$  homeosztázis megváltoztatásához.

### **Az etanol nincs hatással a PMCA4 expressziójára a hasnyálmirigy duktális epitél sejtekben**

Jelenleg négy emlős PMCA gént ismert, amelyek hozzájárulnak a citoszólikus  $\text{Ca}^{2+}$  extrúzióhoz. A Pmca1 és Pmca4 expresszióját MPO, és a PMCA1 és PMCA4 expresszióját HPO mintákban teljes transzkriptom analízis segítségével mutattuk ki, egérben a Pmca1, emberben pedig a PMCA4 mutatta a legmagasabb expressziót. Megjegyzendő, hogy a Pmca2 és Pmca3 expressziós szintje minden mintában a kimutatási határ alatt volt. Az RT-PCR és az azt követő végpontelemzés megerősítette a Pmca1 és a Pmca4 expresszióját a teljes hasnyálmirigyszövetben, valamint az izolált egér hasnyálmirigy-ductuszokban. A PMCA1 és PMCA4 immunfluoreszcens festése az MPO-k keresztmetszeteiben a PMCA4 apikális lokalizációját mutatta ki, míg a PMCA1 egyenletesen oszlott el az apikális és a bazolaterális membránokon. Emellett a PMCA4 és a CFTR erős ko-lokalizációját figyeltük meg az apikális membránon (Mander korrelációs együttható:0,906), ezért a downstream elemzésben a PMCA4-



re fókuszáltunk. A gasztrointesztinális őssejtekben a CFTR expressziójának elvesztése lúgos pH-t eredményez, amely, különböző gének Wnt/ $\beta$ -katenin-mediált expresszióját idézi elő. Ez befolyásolhatja a PMCA4 expresszióját a hasnyálmirigy duktális sejtekben. Ennek tesztelésére qRT-PCR segítségével összehasonlítottuk a Pmca4 relatív expresszióját kontroll, EtOH/PA kezelt és Cfr KO MPO sejtekben. Míg a Pmca4 expressziója a kontroll és az EtOH/PA-val kezelt WT MPO-kban nem mutatott szignifikáns változást, a Cfr KO duktális organoidokban mérsékelten megnövekedett a WT kontrollhoz képest, ami arra utal, hogy a  $Ca^{2+}$ -efflux különbség nem a csökkent génexpresszióknak köszönhető. Ezután arra voltunk kíváncsiak, hogy a CFTR EtOH-kezelés miatti elvesztése megváltoztatja-e a PMCA4 apikális membrán-specifikus lokalizációját. Míg az immunfluoreszcens mikroszkópia az EtOH/PA kezelt és Cfr KO MPO-kban csökkent CFTR-szintet mutatott az apikális membránon a kezeletlen WT-hez képest, a PMCA4 minden mintában megtartotta apikális lokalizációját. Ezt követően a CFTR és a PMCA4 jelenlétét a HPO-k apikális plazmamembránján immunfluoreszcens jelöléssel igazoltuk. A HPO-k EtOH/PA-val történő éjszakai inkubálása a CFTR csökkent, foltos apikális mintázatát eredményezte, a PMCA4 megtartotta apikális membránlokalizációját. Az alkoholos kezelés a PMCA4 citoszolikus eltolódását eredményezte. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a CFTR hiánya csökkenti a PMCA4 aktivitását a hasnyálmirigy duktális epitél sejteinek apikális membránján, de nem befolyásolja a PMCA4 expresszióját, sem annak lokalizációját.

### **A cisztás fibrózisos betegekből származó iPSC-eredetű organoidok rekonstruálják a PMCA funkció megváltozását.**

Eredményeink arra utalnak, hogy CF-ben a genetikai mutációk által okozott csökkent CFTR-expresszió a hasnyálmirigy duktális sejtek  $Ca^{2+}$  extrúzióját is megzavarhatja. Ezért megvizsgáltuk eredményeink relevanciáját a CF-betegekből generált humán iPSC-eredetű hasnyálmirigy-organoidokban. A klasszikus CF-ben érintett donorokból származó CF-iPSC-vonalak létrehozásához a betegek keratinocitáin lentivirális átprogramozást alkalmaztunk, majd az iPSC-eket *in vitro* hasnyálmirigy-irányba differenciáltattuk, végül 3D-szuszpenziós kultúrában exokrin hasnyálmirigy-organoidokat generáltunk. Immunfluoreszcens festéssel kimutattuk, hogy míg a CF-betegekből származó organoidokban a CFTR jele hiányzott (amit a CFTR-korrektor VX-809 (10  $\mu$ M) 12 órás inkubációja jelentősen helyreállított), a PMCA4 jelen volt mind a kontroll, mind a CF-betegekből származó iPSC organoidokban. Az ER  $Ca^{2+}$  raktárak kimerítését követő  $Ca^{2+}$  elvonás a kontrollhoz képest jelentősen csökkent a CF organoidokban, ami megerősítette a más modellrendszerekben kapott korábbi eredményeinket. Fontos, hogy 10  $\mu$ M VX-809 12 órán keresztül történő előkezelés jelentősen javította a  $Ca^{2+}$ -

extrúziót, ami azt jelzi, hogy a CFTR-korrektor kezelés képes helyreállítani a csökkent PMCA-aktivitást és ezáltal a  $\text{Ca}^{2+}$ -extrúziót a CF organoidokban.

### **Az etanol csökkenti a CFTR expressziót és a PMCA aktivitást a kolangiocitákban**

Bár a kolangiociták szekréciós funkciója nagymértékben függ a CFTR-aktivitástól, a CFTR funkció vagy expresszió alkoholhoz kapcsolódó változásait alkoholos hepatitiszben (AH) soha nem vizsgálták. A formalin-fixált, paraffinba ágyazott májmintákon végzett immunhisztokémiai vizsgálat kimutatta, hogy az AH-s betegeknél a kontrollokhoz képest az apikális CFTR eloszlása a kolangiocitákban jelentősen károsodott. Ezt a jelenséget *in vitro* rekonstruáltuk WT egérből származó máj organoidokban (MLO), amelyek pozitívak a KRT19 epiteliális sejtvonalmarkerre. A CFTR luminális membránlokalizációt mutatott a kezeletlen MLO-kban, ami az EtOH-val kezelt MLO-kban jelentősen csökkent és a citoszól felé tolódott anélkül, hogy a *Cftr* génexpressziós szintje biológiailag relevánsan megváltozott volna. Az MLO-k későbbi funkcionális elemzése az EtOH/PA-val kezelt MLO-kban a kontrollhoz képest jelentősen csökkent apikális  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  cserélő aktivitást mutatott. Míg az extracelluláris  $\text{Cl}^-$  eltávolítás a kontroll MLO-kban az intracelluláris  $\text{Cl}^-$  markereként használt MQAE fluoreszcencia CFTR-függő növekedését eredményezte, az alkoholkezelés a CFTR-függő  $\text{Cl}^-$  extrúzió jelentős csökkenését eredményezte. Végül a  $\text{Ca}^{2+}$  mérések szignifikánsan csökkent PMCA-aktivitást mutattak ki az etanollal előinkubált, valamint a *Cftr* KO organoidokban a WT kontrollhoz képest, ami arra utal, hogy a CFTR csökkent apikális eloszlása rontja a PMCA működését a kolangiocitákban. A *Pmca4* génexpresszió változása nem érte el a biológiailag releváns szintet az MLO-kban. Fontos, hogy ezek az eredmények kiemelik, hogy az EtOH-expozíció megváltoztatja a CFTR lokalizációját és aktivitását kolangiocitákban, ami csökkent ionszekrécióhoz és az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  homeosztázishoz zavarához vezet.

### **A PMCA4 interakciója a CFTR-ral a hasnyálmirigy duktális epitelsejtek apikális membránjában**

Megfigyeléseink arra utalnak, hogy a PMCA4 aktivitása megköveteli a CFTR-ral való szoros kapcsolatot. Ennek vizsgálatára Duolink proximity ligation assay-t (PLA) végeztünk az endogén PMCA és a CFTR között. Megjegyzendő, hogy a nem specifikus antitestkötés elkerülése érdekében tengerimalacból izolált hasnyálmirigy duktális fragmentumokat használtunk, amelyek reprodukálták a PMCA4 és a CFTR apikális ko-lokalizációját. A Duolink PLA azt sugallta, hogy a PMCA4 és a CFTR <40 nm-es közelségben van egymáshoz. A kölcsönhatást ezután a dSTORM segítségével még nagyobb felbontásban vizualizáltuk. A

CFTR-t és a PMCA4-et kódoló plazmidokkal kotranszfektált HeLa sejtekben tökéletes átfedést (<20 nm) figyeltünk meg a két fehérje között a plazmamembránban, ami fizikai közelségre utal.

### **A CFTR által kötött kalmodulin szabályozza a PMCA4 aktivitását a hasnyálmirigy duktális epitél sejtjeiben és kolangiocitákban.**

A CFTR nemrégiben leírt alternatív kalmodulin-kötődése feltehetően más fehérjék szabályozását is lehetővé teszi. Ezért feltételeztük, hogy az ilyen típusú kalmodulin-CFTR kölcsönhatás a későbbiekben befolyásolhatja a kalmodulin által szabályozott PMCA4 aktivitását. Először, a kalmodulin erős ko-lokalizációját igazoltuk a CFTR-ral és a PMCA4-gyel a duktális epithelsejtek apikális membránján dSTORM-mal az MPO-k keresztmetszetein. Míg a kalmodulin erősen asszociált az apikális membránhoz a WT MPO-kban és MLO-kban, addig az EtOH-val kezelt és a Cfr KO MPO-kban és MLO-kban disszociált az apikális membránról és a citoszólba diffundált. Hasonló lokalizációs mintázatot figyeltünk meg a Cfr KO duktális fragmentumokban. Ezután azt kívántuk elemezni, hogy a károsodott kalmodulin-CFTR kölcsönhatás milyen hatással van a PMCA4 aktivitására epithelsejtekben. Mivel a kalmodulin generális kiütése vagy gátlása szerteágazó downstream hatással járhat, HEK-293 sejteket kotranszfektáltunk PMCA4-gyel és CFTR-ral vagy a kalmodulin kötőhelyén mutációt hordozó CFTR-ral (CFTR(S768A)). Megjegyzendő, hogy mind a CFTR, mind a CFTR(S768A) a plazmamembránhoz lokalizálódott és ko-lokalizált a PMCA4-gyel. Míg a PMCA4 és a CFTR együttes transzfektációja jelentősen növelte a  $Ca^{2+}$ -extrúzió meredekségét, a PMCA4 önmagában mérsékelt aktivitást mutatott. Ami azonban még fontosabb, hogy a CFTR(S768A) transzfektált sejtek jelentősen csökkent PMCA4-aktivitást mutattak a WT CFTR-transzfektált sejtekhez képest. A dSTORM klaszterelemzés 34%-os csökkenést mutatott a PMCA4-CFTR(S768A) ko-lokalizációs arányában a PMCA4-CFTR-hoz képest, ami arra utal, hogy a kalmodulin/CFTR kölcsönhatás hiánya elegendő a PMCA4 aktivitásának, valamint a fehérje nanodomain stabilitásának csökkenéséhez az apikális plazmamembránon.

### **A PMCA4 gátlása károsítja a mitokondriális funkciót, növeli az apoptózist, és súlyosabb etanol-indukált akut pankreatitist eredményez.**

A következő lépésben a károsodott CFTR-expresszió szerepét kívántuk felmérni ebben a jelenségben. A transzmissziós elektronmikroszkópia nem mutatott különbséget a mitokondriumok térfogat/sejt arányában a Cfr KO és a WT hasnyálmirigy duktális epitél sejtek között. Ezután 100  $\mu$ M karbakol adása a mitokondriális membránpotenciál ( $\Delta\psi_m$ ) jelentős csökkenését eredményezte EtOH/PA előkezelt és Cfr KO - de nem WT- MPO sejtekben, ami

arra utal, hogy a tartós intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  emelkedés károsítja a mitokondriális működést. A megfelelő működéshez a PMCA4 ATPáz az oxidatív foszforiláció és a glikolízis által termelt ATP-re támaszkodik. Mivel az EtOH csökkenti a mitokondriális ATP-termelést, az F1F0-ATPázt oligomycinnel gátoltuk, ami nem volt hatással a PMCA működésére a duktális sejtekben. A mitokondriumokból felszabaduló citokróm c intracelluláris eloszlása - az apoptózis jellemzője - azonban jelentősen megnőtt a Cfr KO-ban a WT hasnyálmirigy duktális epitél sejtekhez képest, ami arra utal, hogy a tartós  $\text{Ca}^{2+}$  emelkedés és a mitokondriumok működésének zavara apoptózishoz vezet. Továbbá, a Cfr KO hasnyálmirigy duktális epitél sejtekben a WT sejtekhez képest magasabb volt a kaszpáz 9 citoplazmatikus szintje, ami tovább erősíti az apoptózis esélyét. Végül a PMCA4 gátló aurintrikarbonsav (ATA) alkalmazásával alkohol által kiváltott akut pankreatítisz egérmódelben elemeztük, hogy a károsodott PMCA4 funkció függetlenül fokozhatja-e a hasnyálmirigy- és májbetegségek súlyosságát. A hasnyálmirigy duktális organoidok inkubálása  $10\ \mu\text{M}$  ATA-val 30 percig az *in vitro*  $\text{Ca}^{2+}$  mérések előtt a PMCA4 aktivitásának szignifikáns csökkenését eredményezte a kontrollhoz képest, ami megerősítette az ATA PMCA4 funkciót gátló hatását. Ezután egyszeri ATA-injekciót (intraperitoneálisan,  $5\ \text{mg/kg}$ ) adtunk WT FVB/N egereknek 90 perccel az első EtOH/POA-injekció előtt. Az ATA-val előzetesen kezelt állatoknál a vehikulum kontrollhoz képest szignifikánsan emelkedett a hasnyálmirigy-ödéma és -nekrózis pontszáma, ami párhuzamosan szignifikánsan emelkedett szérum amiláz-aktivitással járt. Ezek az eredmények együttesen azt jelzik, hogy a károsodott PMCA4-aktivitás csökkenti a mitokondriális funkciót, fokozza az apoptózist, és potenciálisan növeli a CFTR-rel kapcsolatos hasnyálmirigy- és feltehetően májbetegségek súlyosságát.

## DISZKUSSZIÓ

Konvencionálisan a CFTR-t egy cAMP-aktivált  $\text{Cl}^-$ csatornának tekintik, habár az elmúlt években bebizonyosodott a  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , vagy a  $\text{Ca}^{2+}$  homeosztázisban részt vevő más komponensekkel való szabályozhatósága is. Ezeknek a kölcsönhatásoknak a szubcelluláris jelátviteli eseményekre vagy a CFTR aktivitására gyakorolt downstream hatásai még nem jól ismertek. Tanulmányunkban először azt mutattuk ki, hogy a  $\text{Ca}^{2+}$  -extrúzió jelentősen károsodott az etanollal kezelt és a Cfr KO hasnyálmirigy duktális sejtekben a csökkent PMCA-aktivitás miatt. Több független *in vitro* modellrendszer, köztük HPO-k és CF betegekből generált iPSC-eredetű organoidok segítségével kimutattuk, hogy az apikális CFTR hiánya -és nem a funkciója- befolyásolja a PMCA aktivitását. Fontos, hogy a CFTR expresszió VX-809-

el történő korrekciója, úgy tűnik, helyreállítja az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  jelátviteli változásokat. Az elhúzódó intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -túlterhelés az AP egyik jellemzője. A leggyakoribb patogén faktorok - köztük az epesavak vagy a nem oxidatív EtOH-metabolitok - az ER  $\text{Ca}^{2+}$  raktárak kiürülését váltják ki, és aktiválják az extracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -beáramlást, ami károsodott folyadék- és  $\text{HCO}_3^-$  szekrécióhoz vezet. Az ezt követő tartós intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -túlterhelés mitokondriális károsodást vált ki, ami ATP-csökkenéssel és sejtkárosodással jár, tovább rontva az ATP-függő  $\text{Ca}^{2+}$ -kivonást.

Az AH az alkoholos májbetegség potenciálisan halálos szövődménye, amelyet korábban hepatocelluláris károsodásnak tulajdonítottak. A közelmúltban kimutatták, hogy a neutrofilek kötődése a kolangiociták sejtfelszínén expresszálandó ITGB1-hez hozzájárul az epitelsejtek károsodásához és az AH-ban kialakuló kolesztázishoz. Más tanulmányok rávilágítottak, hogy a kolesztatikus májkárosodás szerepet játszhat az AH patogenezisében, továbbá a kolangiociták károsodott szekréciója, illetve a kolesztázis súlyosabb kimenetelhez vezet. A kolangiociták károsodásának ez a korábban nem ismert működése az AH-ban megváltoztatta a betegség patogenezisének megértését, és új terápiás stratégiákat vet fel. Ebben a tanulmányban jelentősen csökkent apikális plazmamembrán CFTR-expressziót mutattunk ki a post mortem AH-betegek májmintáiban, amelyhez jelentősen károsodott CFTR-aktivitás társult, valamint kimutattuk az apikális  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -cserélő csökkent aktivitását alkohol-expozíció hatására egér máj organoidokban. Ezenkívül mind az EtOH-val előinkubált WT, mind a Cftr KO máj organoidok, csökkent PMCA-aktivitás miatt redukált  $\text{Ca}^{2+}$ -extrúziót mutattak. A CFTR-mediált szekréció hiánya, valamint a megváltozott intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  homeosztázis károsíthatja a kolangiocita szekréciót, hozzájárulva az AH-val összefüggő kolesztázis és potenciálisan a CF-hez kapcsolódó májbetegség (CFLD) kialakulásához, súlyosan rontva a betegség klinikai kimenetelét.

Kísérleteinkben kimutattuk, hogy a PMCA4 több modellben is ko-lokalizálódik a CFTR-ral a duktális epitél sejtek apikális membránján, továbbá, szuperfelbontású dSTORM segítségével kiemeltük, hogy a CFTR és a PMCA4 20 nm-en belüli közelségben van, ami a két fehérje fizikai kölcsönhatására utal. Korábban Philippe és munkatársai ko-immunoprecipitációs kísérletei azt sugallták, hogy a CFTR kölcsönhatásba lép a SERCA-val és a PMCA-val a légúti epitelsejtekben, bár ennek a kölcsönhatásnak a természetét nem tárták fel. Nemrégiben Bozoky és munkatársai kimutatták a CFTR megnövekedett nyitási valószínűségét a kalmodulin R-doménjéhez való közvetlen kötődésének köszönhetően, ami új mechanizmust jelentett az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  által közvetített CFTR-aktivitás szabályozására. Érdekes módon a szerzők bebizonyították, hogy a kalmodulin alternatív kötődési konformációban kötődik a CFTR-hoz.

Ez a kötési konformáció lehetővé teszi a CFTR számára, hogy kalmodulint rekrutáljon, és ezt követően meghatározza más kalmodulin által szabályozott fehérjék, például a PMCA aktivitását egy makromolekuláris komplexben az apikális plazmamembránon. Kezeletlen WT hasnyálmirigy- és máj organoidokban a kalmodulin az apikális membránhoz társult, és erősen ko-lokalizálódott a CFTR-ral és a PMCA4-gyel. A Cfr KO- és etanollal kezelt organoidokban ez az apikális lokalizáció elveszett, ami arra utal, hogy a CFTR jelenléte az apikális membránon szükséges a kalmodulin toborzásához. Annak igazolására, hogy a kalmodulin és a CFTR kölcsönhatása szükséges a PMCA aktiválásához, a CFTR (CFTR(S768A)) és a PMCA4 kalmodulin-kötőhely mutánsát overexpresszáltuk HEK-293 sejtekben, és jelentősen csökkent  $Ca^{2+}$ -extrúziót mutattunk ki, miközben a CFTR és a PMCA4 közötti kölcsönhatás is jelentősen csökkent.

Az alkohol okozta AP patogenezise során jól ismert, hogy az acináris és duktális epitél sejtek etanol vagy etanol-metabolitok akut expozíciója a  $[Ca^{2+}]_i$  tartós emelkedését idézi elő. Kísérleteinkben akut alkalmazás helyett egy éjszakán át inkubáltuk a duktális epitél sejteket, ami jobban modellezheti az etanol fogyasztás hatásait. Bár mitokondriális morfológiai károsodásra nem találtunk bizonyítékot, de a  $\Delta\Psi_m$  figyelemre méltó csökkenését észleltük, amikor az etanollal kezelt és a Cfr KO MPO-kat karbachollal kezeltük. Ezen túlmenően a citokróm c és a kaszpáz 9 megnövekedett citoszólikus festődése a Cfr KO duktális sejtekben fokozott apoptózisra utalt. Végül a PMCA4 gátlása az alkoholos AP in vivo modelljében jelentősen növelte a betegség súlyosságát, ami arra utal, hogy a károsodott PMCA4 funkció a CFTR károsodott expressziója miatt önmagában is hozzájárulhat az alkoholos pankreatitisz és hepatitisz sejt-károsodásához. Fontos, hogy eredményeink rávilágítanak arra, hogy a PMCA-aktivitás helyreállítása vagy a  $Ca^{2+}$ -extrúzió fokozása nemcsak alkoholos pankreatitiszben és hepatitiszben, hanem a cisztás fibrózissal összefüggő májbetegségben és pankreatitiszben is potenciális terápiás előnnyel járhat. Kimutattuk, hogy a CFTR expressziójának korrekciója szintén javíthatja a PMCA működését. A CF-betegek hármaskombinációs terápiájának hatékonyságát a közelmúltban mutatták ki, és a hasnyálmirigy-funkció tartós javulásáról számoltak be ivacaftort kapó CF-betegeknél. Összességében ebben a tanulmányban egy új szabályozási kölcsönhatást azonosítottunk, amely a kalmodulin CFTR általi apikális rekrutációján alapul, és amely meghatározza a PMCA4 aktivitását és az intracelluláris  $Ca^{2+}$ -extrúziót polarizált epitél sejtekben.

## **AZ ÚJ MEGFIGYELÉSEK ÖSSZEFOGLALÁSA:**

- Bizonyítottuk, hogy az etanol-expozíció vagy genetikai mutációk által kiváltott károsodott CFTR-expresszió, majd a kalmodulin csökkent CFTR-mediált toborzása az apikális membránhoz gyengíti a PMCA4 aktivitását és a  $Ca^{2+}$  extrúziót a hasnyálmirigy duktális epitél sejtjeiben és a kolangiocitákban.

- Az ebből következő zavart  $Ca^{2+}$ -homeosztázis sérült mitokondriális funkcióhoz és fokozott apoptózishoz vezet, és végül a betegség súlyosságának növekedését eredményezi. Eredményeink tehát az intracelluláris  $Ca^{2+}$  jelátvitel egy új szabályozási mechanizmusára világítanak rá, amely hozzájárulhat az alkoholos pankreatítisz- és hepatitisz súlyosságához, és potenciálisan a CF-hez kapcsolódó máj- és hasnyálmirigy-károsodás kialakulásához.

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném kifejezni legőszintébb köszönetemet mentoromnak, Dr. Maléth Józsefnek, a Szegedi Tudományegyetem I. Orvostudományi Klinikáján nyújtott útmutatásáért és támogatásáért. Kiváló felügyelete nélkül ez a doktori értekezés nem jöhetett volna létre. Külön köszönettel tartozom Dr. Pallagi Petrának az együttműködéséért, segítségéért és értékes meglátásaiért mindezen évek alatt. Köszönöm továbbá Prof. Dr. Hegyi Péter, Prof. Dr. Rakonczay Zoltán Jr. és Dr. Venglovecz Viktória tudományos tanácsait. Hálás vagyok Prof. Dr. Lengyel Csabának és Prof. Dr. Ábrahám Györgynek, valamint Prof. Dr. Varró Andrásnak, akik lehetőséget biztosítottak számomra, hogy tanszékeiken dolgozhassak, valamint Prof. Dr. Alexander Klegernek és Meike Hochwielernek a gyümölcsöző kollaborációért. Szeretnék köszönetet mondani kollégáimnak és barátaimnak, Varga Árpádnak, Szabó Viktóriának, Jójárt Boldizsárnak, Papp Noéminek, Kiss Alettának, Dr. Tél Bálintnak, Molnár Tündének, Susánszky Petrának, Tim Crulnak, Ingrid Sendstadnak, Bálint Emese Rékának, Balla Zsoltnak, Görög Mariettának, Katona Xéniának, Németh Margitnak, Molnár Rékának, Fanczal Júliának, Tóth Emesének, Dr. Kui Balázsnak, Katona Máténak és Dr. Németh Balázsnak, a sok segítségért, bátorításért és az együtt töltött szép időkért. Ez a munka nem valósulhatott volna meg Dudás Krisztina, Molnár Melinda, Konczos Zsuzsanna, Magyarné Pálfi Edit, Pritz Tünde, Fritz Rea és Árva Miklósné Zsuzsó segítségével és munkája nélkül. Köszönettel tartozom szeretett családomnak a feltétel nélküli szeretetért, támogatásért és türelméért a doktori munkám során; férjemnek Szabó Gábornak, édesapámnak Prof. Dr. Madácsy Lászlónak, édesanyámnak Siskó Teréziának, nagyszüleimnek id. Prof. Dr. Madácsy Lászlónak, Dr. Kiss Attilának és Dr. Polgár Adriennének, akik arra bátorítottak, hogy a tudománynak szenteljem magam.