

SEMMELWEIS EGYETEM
DOKTORI ISKOLA

Ph.D. értekezések

2452.

RESZEGI ANDREA MARGIT

Onkológia
című program

Témavezető: Dr. Baghy Kornélia, tudományos munkatárs

Programvezető: Dr. Kopper László, professzor emeritus

A decorin terápiás felhasználhatóságának vizsgálata primer és metasztatikus májdaganatokban

Doktori értekezés

Reszegi Andrea

Semmelweis Egyetem
Patológiai tudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Baghy Kornélia, Ph.D., tudományos munkatárs

Hivatalos bírálók: Dr. Füle Tibor, Ph.D., szaktanácsadó
Dr. Borka Katalin, Ph.D., egyetemi docens

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Tordai Attila, DSc., egyetemi tanár

Tagok: Dr. Pápai Zsuzsanna, Ph.D., osztályvezető főorvos
Dr. Rónai Zsolt, Ph.D., egyetemi adjunktus

Budapest
2020

TARTALOMJEGYZÉK

1.	BEVEZETÉS (IRODALMI HÁTTÉR)	8
1.1.	Májdaganatok	8
1.1.1.	A hepatocelluláris carcinoma epidemiológiája.....	8
1.1.2.	A HCC kialakulása és progressziója	8
1.1.3.	Májmetasztázisok	11
1.1.4.	Kezelési lehetőségek	11
1.2.	Az extracelluláris mátrix	12
1.3.	A proteoglikánok	13
1.3.1.	A kis leucin-gazdag proteoglikánok.....	16
1.4.	A decorin	16
1.4.1.	A decorin szerkezeti és élettani funkciói.....	19
1.4.2.	Kutatások decorin génkiütött modelleken	20
1.4.3.	A decorin lokalizációja a daganatos mikro környezetben.....	20
1.4.4.	A decorin jelátviteli mechanizmusa a daganatokban	22
1.4.4.1.	A decorin hatása a növekedési faktorokra.....	22
1.4.4.2.	A decorin és a RTK-ok kapcsolata.....	24
1.4.4.3.	A decorin intracelluláris jelátviteli szabályozása	26
1.4.4.4.	Decorin szerepe az angiogenesisben és a metasztatikus daganatokban ..	27
1.4.5.	A decorin terápia alkalmazási lehetőségei	28
1.5.	Munkacsoportunk korábbi eredményei	30
2.	CÉLKITŰZÉSEK	32
3.	MÓDSZEREK	33

3.1.	<i>In silico</i> vizsgálatok	33
3.2.	Humán szöveti minták	33
3.2.1.	Humán HCC esetek	33
3.2.2.	Humán colon adenocarcinoma májmetasztázis szöveti minták	36
3.3.	Morfológiai vizsgálatok.....	38
3.3.1.	Immunhisztokémia FFPE mintákon	38
3.3.2.	Fluoreszcens immunhisztokémia fagyasztott metszeteken	39
3.4.	Génexpressziós vizsgálatok.....	40
3.4.1.	RNS izolálás	40
3.4.2.	Reverz transzkripció.....	40
3.4.3.	Real Time Q-PCR.....	41
3.5.	<i>In vitro</i> vizsgálatok	42
3.5.1.	Sejttenyésztés	42
3.5.2.	Interakciós vizsgálat	42
3.6.	Fehérje kimutatási módszerek	43
3.6.1.	Fehérje izolálás	43
3.6.2.	Phospho-Kinase és RTK array	43
3.6.3.	Western blot és dot blot	43
3.6.4.	Humán decorin ELISA	44
3.7.	Állatkísérletek.....	44
3.7.1.	DNS konstrukciók	45
3.7.2.	Hidrodinamikus génbevitel.....	45
3.7.3.	SEAP Reporter Gén Assay	46
3.7.4.	Primer hepatocarcinogenesis modell	46

3.7.5.	Egér c38 colorectális carcinoma kolonizációs modell.....	47
3.8.	Statisztikai analízis	48
4.	EREDMÉNYEK.....	49
4.1.	HCC vizsgálatok.....	49
4.1.1.	<i>In silico</i> humán HCC vizsgálatok.....	49
4.1.2.	Humán HCC TMA eredmények.....	51
4.1.3.	<i>In vitro</i> kísérleti rendszer.....	58
4.1.4.	<i>In vivo</i> primer hepatocarcinogenesis modell decorin túlermelő májban.....	59
4.1.4.1.	Humán decorin expressziója a májban.....	60
4.1.4.2.	Transzfekció sikerességének ellenőrzése	61
4.1.4.3.	Decorin hatékonysága a primer hepatocarcinogenesis modellben.....	63
4.1.4.4.	A decorin hatására bekövetkező jelátviteli változások hepatocarcinogenesis modellben	65
4.2.	Colon adenocarcinoma májmetasztázis vizsgálatok.....	71
4.2.1.	Humán colon adenocarcinoma májmetasztázis TMA eredmények	71
4.2.2.	<i>In vitro</i> kísérleti rendszer.....	74
4.2.3.	<i>In vivo</i> kolonizációs modell.....	75
4.2.3.1.	Humán decorin génbevitel sikerességének ellenőrzése	75
4.2.3.2.	Decorin hatékonysága a kolonizációs modellünkben	77
4.2.3.3.	A decorin molekuláris hatása a kolonizációs modellben	78
5.	MEGBESZÉLÉS	84
5.1.	Decorin szerepe a HCC-ban	84
5.2.	Decorin szerepe colon adenocarcinoma májmetasztázisában	91
6.	KÖVETKEZTETÉSEK.....	95

7. ÖSSZEFOGLALÁS	97
8. SUMMARY	98
9. IRODALOMJEGYZÉK.....	99
10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE	120
11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	122

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AFP	alfa foetoprotein
AP4	transzkripció faktor AP4
BCLC	Barcelona Clinic Liver Cancer staging, barcelonai stádiumbeosztás
BM	bazális membrán
BSA	borjú szérum albumin
CDK	ciklin-dependens kináz
CM	kondicionált médium
CRC	colorectalis carcinoma
CTGF	kötőszöveti növekedési faktor
CS	chondroitin-szulfát
DAB	diamino-benzidin
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DCN	decorin
DCN ^{-/-}	decorin knockout, decorin génkiütött
DEN	dietil-nitrózamin
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium; tápfolyadék
DMSO	dimetilszulfid
DS	dermatán-szulfát
ECM	extracelluláris mátrix
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
EGFR	epidermális növekedési faktor receptor
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay, enzimhez kapcsolt immunszorbens vizsgálat
ErbB2	receptor tirozin-protein kináz erbB-2 (erithroblasztóma B2)
ERK 1/2	extracelluláris szignál szabályozott kináz 1/2
FBS	magzati marhaszérum
FFPE	formalinban fixált paraffinba ágyazott

FGFR	fibroblast növekedési faktor receptor
GAG	glükózaminoglikán
GRIP	glypican-szerű integráns membrán proteoglikán
GS	glutamin-szintetáz
GSK3	glikogén szintáz kináz 3
HBV	hepatitis B vírus
HCC	hepatocelluláris carcinoma
HCV	hepatitis C vírus
HE	hematoxilin-eozin
HGF	hepatocyta növekedési faktor
HS	heparán-szulfát
HSC	hepatic stellate cells
IC	immuncitokémia
IGF-1R	inzulin-szerű növekedési faktor 1 receptor
IHC	immunhisztokémia
InsR	inzulin receptor
KS	keratán-szulfát
LRR	leucine-rich repeats, leucin-gazdag domén
MAPK	mitogén aktivált protein kináz
MFs	myofibroblastok
NAT	non-adjacent tissue, nem tumoros környező szövet
PBS	foszfát pufferelt sóoldat
PDGFR	vérlemezke eredetű növekedési faktor receptor
PG	proteoglikán
PKB	protein kináz B
pLIVE	Liver In Vivo Expression-expressziós vektor
PP	propeptid
PVDF	polivinilidén-fluorid
Rb	retinoblasztóma fehérje
ROS	reaktív oxigéngyökök

RTK	tirozin kináz receptor
SEAP	secreted alkaline phosphatase, szekretált alkalikus foszfatáz
SLIP	syndecan-szerű integráns membrán proteoglikán
SLRP	small leucine-rich proteoglycan, kis leucin-gazdag proteoglikán
SMA	α -simaizom actin
SP	szignál peptid
TAA	tioacetamid
TBS	tris puffereelt sóoldat
TGF- β	transzformáló növekedési faktor béta
TMA	tissue microarray, szöveti microarray
VEGFR	vascularis endothelialis növekedési faktor receptor
WB	western blot
WT	wild type; vad típus

1. BEVEZETÉS (IRODALMI HÁTTÉR)

1.1. Májdaganatok

1.1.1. A hepatocelluláris carcinoma epidemiológiája

A májdaganatok epidemiológiája összetett, és nehézséget jelent a nagy számú másodlagos daganat elkülönítése a primer tumoroktól. A máj leggyakoribb primer malignus tumora a hepatocelluláris carcinoma (HCC), mely a primer daganatos esetek 75-85%-át teszik ki, de meg kell említeni a jóval ritkább a cholangiocarcinomát, az angiosarcomát, illetve a gyermekkori hepatoblastomát is (1).

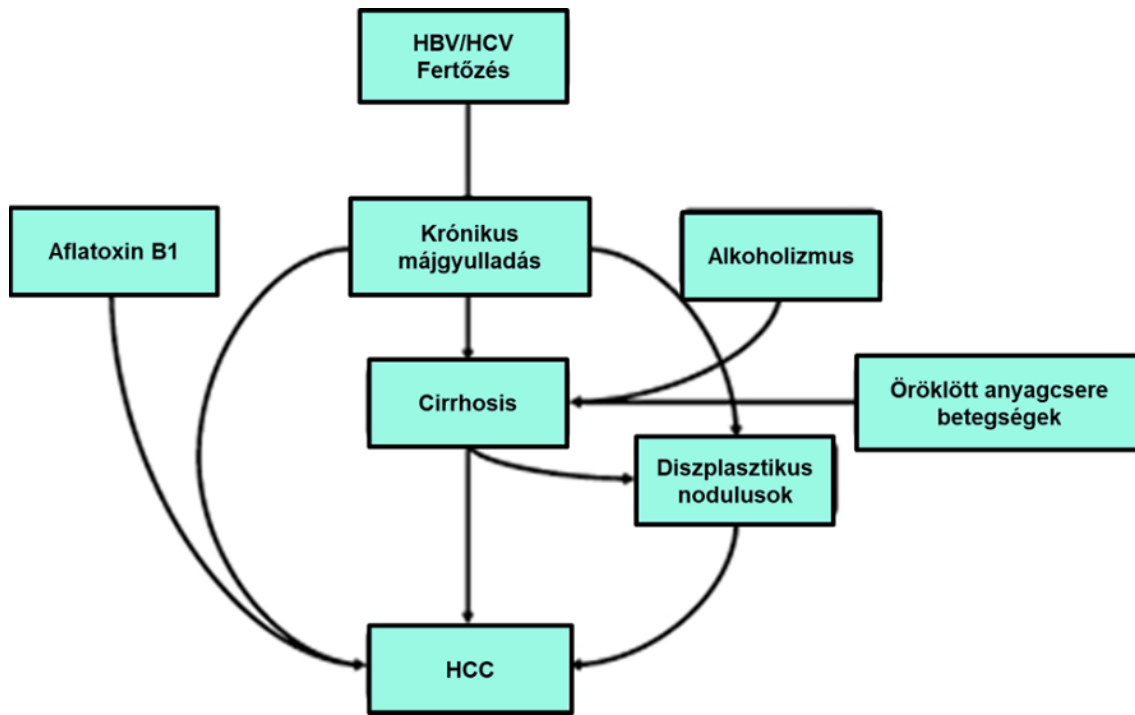
A daganatos megbetegedések közül a HCC világszerte a negyedik leggyakoribb daganatos megbetegedés. 2018-ban 841 000 új esetet és 782 000 halálesetet regisztráltak a világon. Mind az incidenciát, mind pedig a mortalitást tekintve a betegség előfordulása férfiak körében 2-3x gyakoribb, mint a nőknél. Évente 500 000–1 000 000 új májrákos esetet regisztrálnak, különösen nagy előfordulással a fejlődő országokban, Észak- és Nyugat-Afrikában (Egyiptom, Gambia, Guinea) Kelet- és Délkelet-Ázsiában (Mongólia, Kambodzsa és Vietnam), Melanézia és Mikronézia/Polinézia, ám a betegség előfordulási gyakorisága Európában is folyamatosan növekszik (2).

A HCC kialakulásának fő kockázati tényezői a hepatitis B (HBV), és a hepatitis C (HCV) vírus, az aflatoxinnal szennyezett ételek fogyasztása, az öröklött anyagcserebetegségek, a 2. típusú cukorbetegség, elhízás, alkoholfogyasztás és a dohányzás (2, 3). Ugyanakkor a kockázati tényezők régióként eltérők lehetnek. A legmagasabb kockázatú területeken (Kína, Kelet-Afrika) a fő rizikó faktor a krónikus HBV fertőzés, és az aflatoxin expozíció, míg más országokban (Japán, Egyiptom) a HCV fertőzés a domináns ok (2, 3). Mongóliában a HBV és a HCV vírusfertőzés, a HBV hordozók HCV-vel történő együttes fertőzése, valamint az alkoholfogyasztás hozzájárulnak a betegség kialakulásához (2, 4).

1.1.2. A HCC kialakulása és progressziója

A HCC kialakulásának pontos mechanizmusa nem ismert, egy többlépcsős folyamat eredményeképpen jön létre (1. ábra). A korábban említett rizikófaktorok hatására a májban

krónikus hepatitis, valamint cirrhosis alakulhat ki, így a cirrhotikus májban dysplasticus nodulusok jönnek létre. Ezek precancerosus elváltozásnak felelnek meg, melyekből évek múlva HCC fejlődhet ki. Az esetek csupán 10-20%-a alakul ki nem cirrhotikus májban, többsége viszont kissejtes dysplasticus nodulusokból cirrhosis talaján fejlődik ki (5). A nem cirrhotikus májban kialakuló HCC főbb rizikófaktora a diabetes mellitus és a nem alkoholos zsírmáj, az esetek kis részében játszik szerepet az alkohol és a vírushepatitisek (6).



1. ábra A HCC kialakulásának sematikus ábrája (5)

A májdaganatok kialakulásának molekuláris mechanizmusában számos tényező játszhat szerepet. Fontos megemlítenünk a sejtciklus szabályozásának két kulcsszereplőjét, a TP53 gént és a retinoblastomát, melyek működési zavarai a májdaganatok kialakulásban is bizonyított. Az ázsiai populációban kialakult májdaganatok 13-33%-ban találtak p53 mutációt, mely eltérést hordozó májdaganatok általában nagyobbak és szövettanilag differenciálatlanok. Ezekben az esetekben gyakori a TP53 gén 249. kodonjának GC → TA mutációja, melyet az aflatoxin B fertőzöttséggel hoztak összefüggésbe (7).

A májdaganatokban leggyakrabban a Wnt jelátviteli út kulcs molekulája, a β -catenin protoonkogén fehérje mutációja vagy egyéb onkogén aktivációja figyelhető meg. A Wnt jelátviteli útvonal számos élettani és patológias folyamat szabályozásában vesz részt, ilyen a sejtdifferenciáció, proliferáció, apoptózis, embrionális fejlődés szabályozása, illetve a daganatos folyamatok. Az embrionális fejlődés során a kanonikus Wnt útvonalnak fontos szerepe van, melynek során a β -catenin aktiválódik. Ennek feltétele, hogy az APC/GSK/axin komplex ne jöjjön létre és ne foszforilálja a β -catenint, így a fehérje aktivált állapotában a sejtmagba transzlokálódik, ahol a T sejt faktorral komplexet alkotva transzkripciós faktorként működik és további gének kifejeződését indukálja (8). A kifejlett szervezetben, így a májban is, normális körülmények között a kanonikus Wnt jelátviteli út már nem aktív, a β -catenin ubiquitinálódik és lebomlik, így nem kerül a sejtmagba. Számos tanulmány számol be a Wnt útvonal fokozott aktivációjáról májdaganatok esetében, ahol ezt főleg a HCV fertőzéssel hozták összefüggésbe (9-11).

A humán daganatok jelentős részében kimutatható az epidermális növekedési faktor receptor (EGFR)-MAPK, a c-Met és az Akt útvonalak fokozott működése. Utóbbi aktivációja következtében az apoptózis gátlás mellett, foszforilálódik és inaktívulódik a Wnt útvonal egyik kulcsfehérjéje a GSK3. Ennek következtében a fent ismertetett útvonal aktiválódik. Az EGFR, az ErbB család tagja, mely endogén ligand kötés hatására a Wnt jelátvitelhez hasonlóan különféle élettani mechanizmust képes befolyásolni. Az EGFR pontmutáción, illetve amplifikáción alapuló funkcionyeréses mutációját HCC-ben szintén leírták (12).

A transzformáló növekedési faktor béta-1 (TGF- β 1) szerepe a fibrogenesis és carcinogenesis eseményeiben attól függ, hogy milyen stádiumában van a folyamat. A carcinogenesis korai eseményei során, amikor a TGF- β receptor II megőrzött, a TGF- β tumorszuppresszorként viselkedik. Az előrehaladott májdaganatok esetén azonban a receptor gyakran hiányzik a tumorsejtek felszínéről, miközben a TGF- β fokozott mennyiségben mutatható ki a daganatszövetben. Ennek alapján feltételezhető, hogy ilyenkor a növekedési faktor más hatást fejt ki. A növekedési faktor késői hatásai már az angiogenesis és az epitheliális-mesenchymalis tranzíció (EMT) stimulálásához, valamint a strómális komponensekre gyakorolt hatásához köthetők, melyek a tumorinváziót segítik elő (13).

A májdaganatok kialakulása és progressziója során számos epigenetikai változást ismertettek, melyek gének csendesítéséhez vagy fokozott aktivitásához vezetve segítik elő a malignus transzformációt. A májdaganatokra a globális hipometiláció mellett a szupresszor gének hipermetilációja is jellemző. Kóros hipermetilációról számoltak be a RASSF1A, p15, p16, p21, E-cadherin GADD45 β esetén, míg a STAT1 és a RAS gén hypometilált (14, 15).

1.1.3. Májmetasztázisok

A máj a metasztázis képzés legfőbb célszerve. Számos daganat adhat ide áttétet, ilyenek például az emlőrák, gyomorrák, hasnyálmirigyrák, vastagbélrák, végbélrák, de adhat májáttétet a vesedaganat, a tüdőrák és sok más rosszindulatú betegség is. A májáttétek leggyakrabban colorectális eredetűek, ugyanis a bélrendszerből összegyűlő vérmennyiség teljes egésze először a máj szűrőrendszerén halad keresztül, lehetőséget adva a szétszóródó daganatsejteknek a májban való meglepedésre (16).

1.1.4. Kezelési lehetőségek

A HCC korai stádiumban diagnosztizálva, mielőtt az továbbterjedne a máj állományában, vagy áttérjedne a környéki nyirokcsomókra, illetve más szervekre, kezelhető műtéti rezekcióval vagy májátültetéssel (2, 17, 18). Mivel a HCC döntő hányada cirrhotikus májban alakul ki, a rezekciót csupán a betegek kb. 15%-nál lehet elvégezni és általában rossz a prognózisa, medián túlélési idejük kevesebb, mint 1 év. A colorectális eredetű májáttétek máig egyetlen kuratív terápiás lehetősége a sebészi rezekció (19).

Számos egyéb kezelési lehetőség létezik HCC esetén, ami ugyan végleges gyógyulást nem eredményez, de jobb életminőséget és hosszabb túlélést biztosíthat. Ilyenek a percutan etanol injekció, vagy radiofrekvenciás abláció (RFA), a sugárkezelés, kemo- és radioembolizáció. Ide tartozik a nemrégiben megjelent daganatellenes terápia új módszere a célzott támadáspontú gyógyszerek alkalmazása is, melyek közül az első forgalomban lévő gyógyszer a Sorafenib (Nexavar) egy vascularis endothelialis növekedési faktor receptor (VEGFR) és vérlemezke eredetű növekedési faktort receptor (PDGFR), valamint Raf kináz gátló molekula (20, 21). Az Egyesült Államok Élelmezési és Gyógyszerészeti Igazgatósága (FDA) 2017-ben jóváhagyta egy második vonalbeli célzott terápiás készítmény, a

Regorafenib (Stivarga) alkalmazását, a korábban Sorafenibbel kezelt betegek kezelésére (22). A Sorafenib mellett, első vonalban alkalmazható tirozin kináz receptor (RTK) gátló a lenvatinib (Lenvima), melyet 2018-ban engedélyezett az FDA, olyan betegek számára, akik műtéti úton nem kezelhetőek (22, 23).

1.2. Az extracelluláris mátrix

Az extracelluláris mátrix (ECM) minden szövetben és szervben megtalálható nem celluláris komponens. Az ECM nem csupán a szövetek szerkezeti integritását adja és mechanikai támaszt nyújt, hanem kiemelkedő szabályozó szerepe van különféle sejtéletteni folyamatokban, mint a morfogenezis, differenciáció, proliferáció, túlélés, migráció és homeosztázis (24). Az ECM alapvetően vízből, fehérjékből és poliszacharidokból álló komponens, de összetétele szövetenként eltérő és specifikus (24). Az ECM-ot alkotó fehérjék csoportjai a fibrilláris komponensek, mint a kollagén és elasztin; az adhezív glikoproteinek, melyeknek fő képviselői fibronectin és a lamininek; valamint a proteoglikánok és a hyaluronsav (25). Az ECM legnagyobb mennyiségben jelen lévő komponense a kollagén, melynek 28 altípusát különböztetjük meg (25, 26). A fibrilláris kollagének az I, II, III, V, XI, XXIV, és XXVII. típusú kollagéneket foglalja magába, melyek rostokba szerveződve a legnagyobb mennyiségben vannak jelen a szövetben (25). Ezek, illetve más kollagénekkel, ECM fehérjékkel, valamint proteoglikánokkal együttesen nagyméretű fibrilláris struktúrát hoznak létre, melyek egymással és más ECM molekulákkal interakcióba lépve egy komplex háromdimenziós mátrixhálózatot alakítanak ki (25, 27). Az adhezív glikoproteinek (laminin, fibronectin, entactin) kötik össze a sejteket a sejtmátrix struktúrájával és aktív szerepet játszanak a sejtek és szerkezeti elemek összerendezésében (28).

A fent említettek szerint az ECM szerkezeti-mechanikus funkciói mellett, számos fiziológiás és patológiás szabályozásban is szerepet játszik. A daganatos mikrokörnyezet celluláris komponensekből (pl. aktivált csillagsejtek, gyulladásozó sejtek, erek), bioaktív komponensekből és az ECM-ból áll (29). Az embrionális fejlődés, valamint a homeosztázis biztosítása érdekében az ECM komponenseket szigorú szabályozottság jellemzi (29, 30). Daganatos átalakulás során az ECM-ban mennyiségi és minőségi változások történnek, a tumorsejtek képesek manipulálni a mikrokörnyezetüket saját túlélésük érdekében (bioaktív

anyagokat szabadítanak fel és tesznek elérhetővé maguk számára, mint pl. növekedési faktorok, angiogenezist szabályozó molekulák), ezáltal biztosítva a proliferatív jelátvitel fenntartását (29, 30). A kóros ECM megváltoztatja a stróma sejtek viselkedését, melyek ezáltal a daganat túlélésének kedvező mikrokörnyezetet hoznak létre. (29, 30).

A HCC általában cirrhosis vagy fibrosis talaján alakul ki, melyet az ECM jelentős átalakulása jellemez (31). Hepatocarcinogenesis során, a felgyorsult hepatocytá regeneráció mellett a DNS hibajavítás elégtelen, mely a mutációk fokozatos felhalmozódásával rosszindulatú átalakuláshoz vezet (32). A tumoros átalakulást az ECM fehérjék fokozott felhalmozódása jellemzi. Profibrotikus citokinek, növekedési faktorok, reaktív oxigéngyökök (ROS) szabadulnak fel, kollagéntermelő sejtek aktiválódnak, melyek végső soron szöveti átalakuláshoz vezetnek, ezzel torzítva a máj normál architektúráját (33).

Az elmúlt évtizedekben a kutatások célpontjává vált a tumor és a mikrokörnyezet közötti kapcsolat felderítése. Munkám során az ECM proteoglikánjainak egyik neves képviselőjével, a decorin tumorbiológiában betöltött szerepével foglalkoztam.

1.3. A proteoglikánok

A proteoglikánok (PG) fehérje vázából és ahhoz kovalensen kötődő (O-glikozidos kötéssel) glükózaminoglikán (GAG) molekulából álló vegyületek, melyek a szervezetben mindenütt jelen vannak, előfordulhatnak intracellulárisan, a sejt felszínén, vagy az ECM-ban (1. táblázat) (34-36).

A proteoglikánok szerkezeti diverzitásának köszönhetően a szervezetben számos létfontosságú funkciót töltenek be. Szerkezeti szerepük mellett, aktív szerepet játszanak a molekuláris interakciókban, sejtadhézióban, motilitásban, proliferációban, differenciációban és szöveti morfogenezisben (34, 35). Az egészséges májszövet legjellemzőbb proteoglikánja a transzmembrán syndecan-1 (34, 37). A máj károsodása következtében a proteoglikánok mennyisége igen gyorsan változik (34).

A proteoglikánok GAG láncai ismétlődő diszacharid egységekből állnak, melyek mindegyike különböző mértékben szulfatált vagy acetilezett hexózaminból (D-glükózamin, N-acetil-glükózamin, vagy N-acetil-galaktózamin) és uronsavból (glükuronsav vagy iduronsav) épül fel (34, 36). Ezen láncok hossza változó, de a fehérjemaghoz kötődő láncok

számát a kapcsolódási helyek száma határozza meg, amelyeket Ser-Gly dipeptid motívumok jelölnek (34). A heparán-szulfát (HS) gerincét glükuronsav és N-acetil-D-glükózamin alkotja, a kondroitin-szulfát (CS) glükuronsavból és N-acetil-galaktózaminból áll, a dermatán-szulfát (DS) iduronsavat és N-acetil-galaktózamint tartalmaz, a keratán-szulfát (KS) pedig uronsav helyett szulfatált galaktózt tartalmaz N-acetil-glükózamin egységekkel (34). A heparán-szulfát D-glükózaminjainak részleges szulfatálása N-acetilált és N-szulfatált régiók változó doménszerkezetét hozza létre (34). Ez utóbbi kölcsönhatásba léphet többek között növekedési faktorokkal, növekedési faktor receptorokkal, citokinekkal, lipoproteinekkal és vírusokkal (34).

Csoportosíthatjuk őket szerkezetük, lokalizációjuk, GAG cukorláncuk és funkciójuk alapján (1. táblázat) (34). A GAG cukorláncokat heparán-szulfát, dermatán-szulfát, kondroitin-szulfát és keratán-szulfát csoportokba sorolhatjuk (1. táblázat) (38). Lokalizációjuk szerint megkülönböztetünk intracelluláris proteoglikánokat, mint a serglycint, a membrán-asszociált proteoglikánok közé soroljuk a syndecant, glypicant, betaglycant és a CD44-et. A pericelluláris PG-ok a bazálmembrán proteoglikánjai, melyek az erek, epeutak bazális membránjában találhatóak, illetve a hyalectanok (hyaluronsavat és lectint kötő PG-k) (1. táblázat) (34). Az extracelluláris proteoglikánok közé soroljuk a kis leucin-gazdag proteoglikánokat, melynek csoportjába tartozik a disszertációmban részletesen tárgyalt decorin is, melyről irodalmi összefoglaló a következő fejezetekben olvasható (1.4-1.5).

1. táblázat A proteoglikánok csoportosítása. SLIPs: syndecan-szerű transzmembrán proteoglikánok, GRIPs: glypican csoportba sorolható sejtfelszíni proteoglikánok, SLRPs: kis leucin-gazdag proteoglikánok, hyalectanok: hyaluronsavat és lectint kötő PG-ok, BM: bazális membrán (34)

<i>Lokalizáció</i>	<i>Típus</i>	<i>Gén név</i>	<i>GAG</i>
Intracelluláris	Serglycin	SRGN	HS/CS
Membrán	<u>SLIPs:</u>		
	Syndecan-1	SDC-1	HS/CS;
	Syndecan-2,-3,-4	SDC-2,-3,-4	HS
	<u>GRIPs:</u>		
	Glypican 1-6	GPC 1-6	HS/CS
	<u>Részidős PG-ok</u>		
Betaglycan	TGFBR3	HS/CS	
CD44	CD44	CS	
Extracelluláris	<u>SLRPs</u>		
	<i>I. Csoport</i>		
	Decorin	DCN	DS/CS
	Biglycan	BGN	CS
	Asporin	ASPN	-
	<i>II. Csoport</i>		
	Fibromodulin	FMOD	KS
	Lumican	LUM	KS
	Keratocan	KERA	KS
	PRELP	PRELP	-
	Osteoadherin	OMD	KS
	<i>III. Csoport</i>		
	Epiphycan	EPYC	CS/DS
	Osteoglycin	OGN	-
	Opticin		
	<i>IV. Csoport</i>		
	Chondroadherin, Nyctalopin, Tsukush		
	<i>V. Csoport</i>		
	Podocan, Podocan-szerű fehérjék		
	Pericelluláris	<u>BM zone</u>	
Agrin		AGRN	HS
Collagen XVIII		COL18A1	HS
Aggrecan		ACAN	CS/KS
<u>Hyalectanok</u>			
Versican		VCAN	CS
Neurocan		NCAN	CS
Brevican		BCAN	CS

1.3.1. A kis leucin-gazdag proteoglikánok

A kis leucin-gazdag proteoglikánok (SLRP=Small Leucine-Rich Proteoglycans), az ECM-ban található proteoglikán család, melyek jellegzetessége, hogy az interakciós doménjükben leucin-gazdag ismétlődések (LRR=Leucine-Rich Repeats) találhatóak, melyeket N- és C-terminálisan cisztein-gazdag régió határol (39). Az első SLRP fehérje kristályszerkezetét Kobe és munkatársai azonosították, pancreas ribonukleáz-inhibitor analízisével (40, 41). A fehérje központi LRR doménje leucin és egyéb kis hidrofób egységekben gazdag ismétlődésekből álló régió (39). Ezek az ismétlődések 11 aminosav LxxLxLxxNxL (x=bármilyen aminosav) jellegzetes mintázatát mutatják, ahol a leucin helyettesíthető izoleucinnal, valinnal vagy ritkábban más hidrofób aminosavakkal (42). Az egyes LRR régiók hossza 20-39 aminosav között változhat a különböző SLRP-ben, valamint számos másodlagos struktúrából állhat, mint az α -helix, poliprolin-II-helix, β -redő, 310-helix és β -lemez (39). Az SLRP család 18 tagból áll, és 5 alosztályba sorolható a fehérjék és a genom szintek konzerválódása és homológiája alapján, valamint a meghatározott távolsággal és kromoszomális szerveződéssel rendelkező N-terminális cisztein-gazdag régió jelenléte alapján (43). Az SLRP családjának I. osztályába tartozik a *decorin*, biglycan, asporin és ECM2; II. osztályba soroljuk a fibromodulint, a lumicant, keratocant, PRELP-t (proline arginine-rich end leucine-rich repeat protein) és az osteoadherint, a III. osztály tagjai az optacin, epiphycan és az osteoglycin, a IV. osztályba sorolható a chondroadherin, nycotalopin és a tsukush, illetve az V. csoport képviselői a podocan és a podocan-szerű fehérjék (1. táblázat) (39).

1.4. A decorin

A decorin az SLRP családjának I. osztályába tartozó fehérje. A csoport sajátossága, hogy a tagok mindegyikének, aszimmetrikus szerkezete van, erősen konzervált intron-exon kapcsolódással, valamint két diszulfidhidat tartalmazó N-terminális cisztein régió (Cx3CxCx6C) jellemzi őket (39). A decorin és a biglycan két szerkezetileg nagyon hasonló képviselője a csoportnak, melyeket egy vagy két kondroitin- vagy dermatán-szulfát lánc alkot. Az asporin szerkezeti sajátossága, hogy hiányzik a Ser-Gly dipeptid mintázat és a

glikozilációhoz szükséges aminosavaik. Az ECM2-t tizenhárom LRR és három N-glikozilációs hely jellemzi (39).

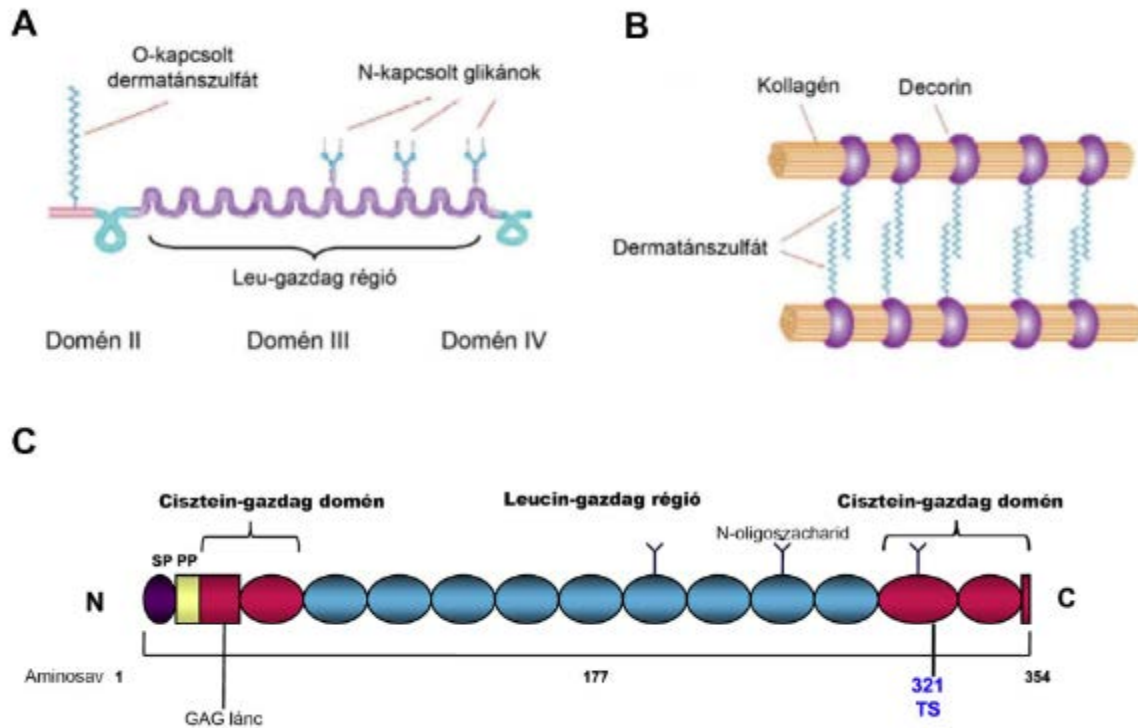
A decorin (NM_133507) ~100 kDa méretű, az ECM kis proteoglikánja, mely 40 kDa méretű core-proteinből és hozzá kapcsolódó egy darab GAG láncból áll, ami lehet kondroitin- vagy dermatán-szulfát (2. ábra) (44). A decorint 1986-ban humán embrionális csillagsejt vonalból klónozták először és „small proteoglycan II”-nek, valamint PG40-nek, nevezték el a központi fehérje mérete után. Az általánosan ismert decorin nevet 1988-ban kapta, arról, hogy az ECM-ban a kollagén szálakhoz kötődik, azokat „dekorálja” (45). A decorin gén az emberben a 12q23, míg egérben a 10-es kromoszómán található meg (46). A humán decorin 359 aminosavból és 4 doménből áll (46).

Az I. domén 16 aminosavas szignál peptid szakaszból és 14 aminosavas propeptidből áll. A szignál peptid felel a decorin durva endoplazmatikus retikulumba történő juttatásáért, majd ez lehasad a fehérjéről, így nem vesz részt az érett proteoglikán felépítésben. A propeptid a GAG oldalláncok kialakulásának szabályozásában vesz részt, azáltal, hogy felismeri és megköti a GAG bioszintézis kaszkád első enzimét, a xilozil-transzferázt, így xilózt helyez a Ser 4 aminosavra. Ezután a fehérje a Golgiba kerül (44, 46).

A II. domén negatívan töltött, a decorin egyetlen szulfatált GAG oldallánca itt kapcsolódik O-glikozidos kötéssel a 4-es pozícióban lévő szerinhez. Konszenzus szekvenciája: (aminosav)-(aminosav)-X-Ser-Gly, ahol a Ser-Gly dipeptid előtt legalább egy, bármilyen típusú, negatív töltésű aminosav helyezkedik el. Ez a domén egy erősen konzervált cisztein-gazdag régiót is tartalmaz, melynek konszenzus szekvenciája: Cx₂₋₃CxCx₆₋₉C, ahol a Cys-eket diszulfid hídak kötik össze (2. ábra) (46).

A III. domén az interakciós domén, amely 10 db tandem LRR régiót tartalmaz, valamint a proteoglikán aminosavainak 60-80%-a itt található. Konszenzus szekvenciája: LxxLxLxxNxLSxL, ahol az L: leucin, izoleucin, vagy valin lehet, az S: szerin vagy treonin, X helyén pedig bármilyen aminosav állhat. A humán decorinban itt található az a 3 db Asn-hoz kapcsolt N-oligiszacharid, melynek szerepe a molekula önaggregációjának késleltetése az ECM-hoz, illetve sejtfelszíni fehérjékhez való kapcsolódás által. A III. domén LRR3-6 régiója segítségével valósul meg a decorin I-es típusú kollagénhez történő kapcsolódása. Ezt a szakaszt N- és C-terminálisan cisztein-gazdag régiók határolnak (2. ábra) (44, 46).

A IV. domén a C-terminális domén, kb. 50 aminosavból épül fel, az itt található 2 ciszteint diszulfid híd köti össze. Az így kialakult hurok fontos szerepet játszik a fibrillogenesis szabályozásában. Az N- és C-terminális diszulfid hídjai fontos szerepet töltenek be a decorin-kollagén interakció megvalósításában (2. ábra) (46).

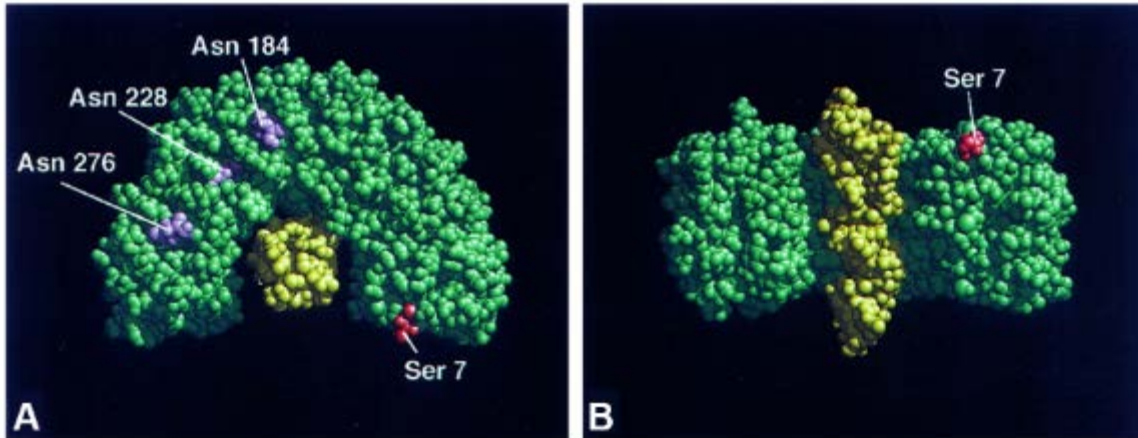


2. ábra (A) A decorin szerkezete. (B) A decorin kollagénhez való kötődése. (C) A decorin vázlatos felépítése. A decorin molekula N-től C-terminális rész felé haladva szignál peptidből (SP), propeptidből (PP), GAG oldallánc-kötő szerin aminosavból, N-terminális cisztein-gazdag régióból, központi LRR régióból és C-terminális cisztein-gazdag régióból áll. A LRR régiónak 3 db N-oligoszacharid-kötő oldallánca van (44).

Térbeli szerkezete:

A humán decorin 3D térbeli szerkezetét elsőként Weber és munkatársai a sertés ribonukleáz-inhibitor kristályszerkezete alapján modellezték, ugyanis mindkét fehérje LRR régiókat tartalmaz és magas szerkezeti homológiát mutat (41). A decorin patkó alakú molekula, két karja közötti távolság 6,5 nm, az apex és az alap közötti rész 4,5 nm hosszúságú, a molekula vastagsága pedig 3 nm (41). Az ív alakú molekulához egy GAG lánc

és azonos oldalon három N-oligosaccharid oldallánc csatlakozik. Az LRR régió belső, konkáv felszínét β -redők, a külső, konvex részét α -hélixek alkotják (41). A konkáv felszínhez csupán egy 3 nm hosszú kollagén hármas hélix kapcsolódása lehetséges (3. ábra) (41, 46).



3. ábra A humán decorin térbeli szerkezete. A zöld színű modell a decorint, a sárga a kollagént reprezentálja, a piros szín a GAG kapcsolódási helye a Ser 7 aminosavhoz, lila pedig az N-oligosaccharid kapcsolódási helyeket mutatja. Asn: aszparagin; Ser: szerin (41).

1.4.1. A decorin szerkezeti és élettani funkciói

A decorin fontos szerepet tölt be a kollagén fibrillogenesisében, képes kötődni az inakban, bőrben, ligamentumokban, és egyéb kötőszövetben előforduló I, II, IV. típusú kollagénekhez (47). A kollagén rostok közötti távolság a fehérje vázhoz kapcsolódó GAG oldalláncok által szabályozott (2. ábra). A fibrillogenesis mellett, a decorin részt vesz a kollagén „turnover” és degradáció szabályozásában is (48). A kötőszövet felépítésében betöltött kiemelkedő szerepét számos kutatás bizonyítja. Danielson és Schaefer eredményei szerint (49, 50), a $DCN^{-/-}$ állatok bőre fragilis, a kollagén morfológiája abnormalis, a degradációja pedig fokozott, szemben a decorint expresszáló csoporttal. Egy másik tanulmány szerint a decorin expresszió és glikolizáció rendellenességének szerepe van az Ehlers-Danlos szindróma és a Marfan szindróma kialakulásában (51, 52), továbbá Jarvelainen és munkatársainak vizsgálatai bebizonyították (53), hogy a DCN hiányos egerekben a sebgyógyulás elégtelen.

A kötőszövet szerkezeti biztosításán túl, a decorin számos más élettani folyamat szabályozásában is részt vesz, ilyenek a differenciáció, migráció, proliferáció, adhézió, továbbá fontos szerepet tölt be a gyulladásra bekövetkező válaszreakció kialakításában és a tumor növekedés szabályozásában is (47). Ez utóbbit három szinten képes befolyásolni: a decorin közvetlen hatással van egyes primer tumorok növekedésére és progressziójára, szerepe van az angiogenesis szabályozásában, illetve gátolja a metasztázisok kialakulását (47).

1.4.2. Kutatások decorin génkiütött modelleken

A decorin daganatgátló szerepének megerősítésére az 1990-es évek végén elkezdődött DCN^{-/-} egérek kísérletek további bizonyítékként szolgáltak (49). DCN^{-/-} egerekben magas zsírtartalmú diéta esetén spontán béldaganat alakult ki. Ezekben a modellekben a decorin hiánya csökkent sejt differenciációval és fokozott proliferációval járt, melyek patomechanizmusában a p21^{WAF1/CIP1}, p27^{KIP1}, TFF3 (trefoil factor 3) és E-cadherin fehérjék gátlását, illetve a Wnt jelátviteli útvonal egyik kulcsszereplőjének, a β-cateninnek fokozódását detektálták (54). *In vitro* és *in vivo* vizsgálatok is megerősítették, hogy a decorin az E-cadherin stabilizációja révén tumorszupresszor szereppel bír a colorectális carcinomák kialakulásában (55). E fehérjék azonosítása a decorin tumorelles hatásaira épülő kutatások alappilléreként szolgált. Iozzo eredményei szerint, a decorin és p53 fehérje együttes hiánya agresszív T-sejtes limfómák kialakulásához és ezen állatok korai halálához vezet (56). A decorin hiánya szintén fokozott tumorigenesishez vezetett *in vivo* dietil-nitrózamin (DEN) és tioacetamid (TAA) kezelt egerek májában (részletesen az 1.5. pontban) (57).

Ezek a tanulmányok együttesen arra engednek következtetni, hogy a decorin hiánya fokozott tumor képződéshez vezet, és jelenléte védő szereppel bír számos daganattípus esetében.

1.4.3. A decorin lokalizációja a daganatos mikro környezetben

A decorin daganatokban betöltött biológiai szerepének megértéséhez, elsőként fontos tisztázni a proteoglikán tumor strómában kialakított expressziós mintázatát. Az irodalomban fellelhető kutatások jelentős része *in vitro* vizsgálatokon alapul, így a decorin szövetben

betöltött szerepéről kevés információ áll rendelkezésünkre. Ugyanakkor a jelenlegi irodalmi adatok szerint, a különböző eredetű és stádiumú daganatos szöveteken végzett vizsgálatok alapján, a decorin expressziója egyfajta mintázatot mutat, ugyanis legtöbb esetben mennyisége csökken az előrehaladott daganatok strómájában, szemben a környező szövetekkel és normál szövethez képest. Humán emlődaganat strómájában a decorin mennyisége mind mRNS, mind pedig fehérje szinten alulexpresszált, a kontroll mintával és a tumor környező szövettel (NAT=non-adjacent tissue, nem tumoros környező szövet) szemben (58). Csökkent decorin expressziót mértek számos más rosszindulatú daganatban is, mint például a tüdő (59), petefészek (60) és endometrium daganatokban (61). Ezen felül, nyirokcsomó-negatív emlőrákban és lágyrésztumorokban a decorin csökkent expressziója rossz prognózisra utal (62, 63). A decorin mennyiségének csökkenését figyelték meg húgyhólyag urothelialis carcinoma, cervix laphám- és adenocarcinoma, vastagbél és vese adenocarcinoma, ovarium mucinosus, serosus cystadenocarcinoma és endometroid carcinoma, hasnyálmirigy adenocarcinoma, prosztata adenocarcinoma, rectum adenocarcinoma, gyomor adenocarcinoma, here embrionális carcinoma és seminoma strómájában a normál szövetekhez képest. A Human Protein Atlas online adatbázis normál és tumoros mintáinak összehasonlítása is arra enged következtetni, hogy a daganatok növekedéséhez alacsony decorin expresszió szükséges (64, 65). Összehasonlítva a tüdő laphám- és adenocarcinoma decorin expresszióját normál tüdőszövettel, a decorin expressziójának szignifikáns csökkenését figyelték meg mind a kétféle tumorban (66). Iozzo és mtsai (67) szerint alacsony és magas grádusú urothelialis carcinoma esetében csökkent decorin expresszió mérhető a stómában. További vizsgálatok azt mutatták, hogy a decorin expressziója csökken a myeloma multiplex, monoklonális gammopathia (68) és nyelőcső laphámrák esetében is (69). Számos tanulmány a decorin expressziójának teljes hiányáról számol be a különféle daganatok tumor parenchymájában, ideértve az urothelialis, a prosztata, a myeloma és a májdaganatot is (57, 70-74).

Humán vastagbél daganatban és emlőcarcinomában a korábbi mintázattól eltérően, magas decorin expressziót figyeltek meg a tumor strómájában (75-79). Ezekben az esetekben elképzelhető, hogy strómában megtalálható nagy mennyiségű decorin jelenléte gátolhatja a különféle RTK-okat, ezáltal blokkolva a tumor proliferációját.

Érdekes módon, transzkripciós vizsgálatok során krónikus limfoid leukémiában (CLL) magas decorin mRNS szint mérhető a korai stádiumban, ezzel szemben a daganat előrehaladott szakaszában a proteoglikán expressziója csökken (80). Hasonló tendenciát figyeltek meg a lágyrész sarcomákban is (81). Ezek alapján, valószínűsíthető, hogy a malignus viselkedés összefüggésben lehet az endogén decorin mennyiségével, amely potenciális biomarkerként szolgálhat a betegség korai és a késői stádiumának megkülönböztetésében.

1.4.4. A decorin jelátviteli mechanizmusa a daganatokban

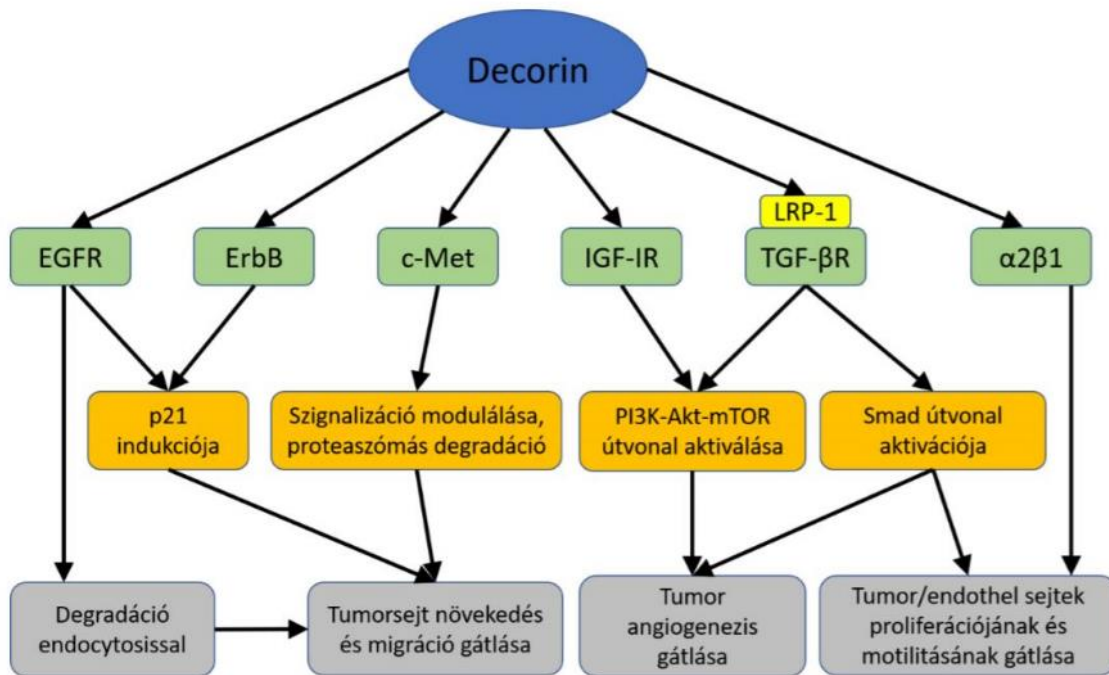
1.4.4.1. A decorin hatása a növekedési faktorokra

Elsőként Yamaguchi és Rouslahti írták le a decorin és a TGF- β 1 kapcsolatát 1990-ben. A proteoglikán képes közvetlenül kötődni a TGF- β 1-hez, ezáltal befolyásolja működését és jelátviteli útvonalait (4. ábra) (82). A decorin fehérje váza felismeri a TGF- β összes izoformáját (TGF- β 1, TGF- β 2 és TGF- β 3), majd kölcsönhatása révén hatékonyan gátolja a tumorsejtek növekedését és terjedését (82, 83). A decorin képes eltávolítani a TGF- β -t és más citokineket a keringésen, vagy a húgyúti traktusokon keresztül, illetve kihorgonyozni a kollagénrostokhoz. Az ECM-hoz rögzített ligand, már nem képes a TGF- β receptorral (TGF β RI és TGF β RII) való interakcióra (84). Ennek nyomán elmarad a Smad2, a Smad3 és az Erk1/2 jelátviteli útvonal aktiválása. Az események következtében a csillagsejtek nem aktiválódnak, nem fokozódik az ECM fehérjék termelése, így pl. kísérletes májfibrogenézis modellben, a vad genotípusú állatok májában a fibrosis kisebb mértékű lesz, mint a DCN^{-/-} egerekben (85, 86). A decorin számos *in vitro* kísérleti rendszerben szintén gátolja a TGF- β aktivitását (87-89). A decorin, mint fiziológias TGF- β inhibitor, gátolja a citokin szerepét a gyulladási folyamatokban, és a szöveti regenerációban is (83, 84, 90).

A decorin a TGF- β szupercsalád egy másik tagjához, a myostatinhoz is képes kötődni, ami fokozott izomregenerációt eredményez (91-93). A myostatint ugyanakkor a daganatos cachexia kialakulásának és fenntartásának egyik kulcsszereplőjének tartják, így ennek gátlása ígéretes célpont lehet (94-96).

A decorin az LRR12 régióján keresztül kötődik a kötőszöveti növekedési faktorhoz (CTGF) és negatívan szabályozza azt (88, 97). Ennek a növekedési faktornak fontos szerepe

van a fibrosis progressziójában, az ECM fehérjék termelésében, a kemotaxisban, a sejtproliferáció és a differenciáció szabályozásában, valamint a gyulladásos folyamatokban is (98-100). A CTGF család egyik tagja, a Wnt által indukált szekretált protein-1 (WISP-1, más néven CCN4), mely számos daganatban onkogén szerepéről ismert, ahol fokozza a sejt migrációt és elősegíti az EMT-t (101). Ezt a fehérjét a decorin a dermatán szulfát GAG oldallánca segítségével képes kötni, és ezáltal a Wnt jelátviteli útvonalat szabályozni (102).



4. ábra A decorin ismert célpontjai és azok szerepe a jelátviteli folyamatokban (103).

A decorin további, bizonyított interakciós partnere a TGF- β család egyik újabb tagja, az onkogénként ismert aktivin C. A két faktor kölcsönhatása következtében az aktivin C caveola-mediált endocitózissal internalizálódik, ezáltal gátolt proliferációt és migrációt eredményez a humán vastagbél-daganatos sejtekben (104).

Hasonló mechanizmussal gátolja a decorin a PDGF-t is (105), ezáltal megakadályozza annak receptorhoz való kötődését, így késlelteti a tumorképződést TAA indukált egerek májában (4. ábra) (106).

A decorinnak fontos szerepe van az inzulin jelátviteli szabályozásában is. Amellett, hogy képes kölcsönhatásba lépni az inzulin-szerű növekedési faktor receptorral (IGF-1R) és az inzulin receptorral (InsR) (részletesen az 1.4.4.2. fejezetben), kis affinitással az IGF-1-et is képes megkötni, így az endogén ligandokkal együtt verseng a receptor kötőhelyekért (4. ábra) (88, 107). Ebben az esetben a decorin koncentrációfüggő módon viselkedik, így a nagy mennyiségben jelenlévő szolubilis decorin hatékonyan tudja gátolni az IGF-1 jelátvitelét (88).

1.4.4.2. A decorin és a RTK-ok kapcsolata

A decorin tumorszuppresszor hatását elsőként különféle RTK-ok gátlásával hozták összefüggésbe (108).

A decorin első tanulmányozott RTK interakciós partnere, az ErbB család tagjaként ismert EGFR volt (4. ábra). Az A431 laphámrák sejtvonalon végzett részletes elemzés rámutatott, hogy a decorin az LRR régiója segítségével a receptor szűk régiójához kötődik, részben átfedésben az EGF kötőhelyével, így létrejön a receptor dimerizációja és autofoszforilációja (109-112). Az interakció által elindított útvonal eredményeként mitogén aktivált protein kinázok (MAPK) aktiválódnak, intracelluláris kalcium mobilizálódik, és a p21^{WAF1/CIP1}, egy ciklin-dependens kináz inhibitor indukciója következik be, valamint a kaszpáz-3 aktiválása (113, 114). Mindezek hatására a sejtproliferáció gátlás alá kerül, apoptózis, angiogenesis és onkogén szuppresszió következik be a sejtekben (64, 88, 108). A decorin ezen kívül fokozza az EGFR caveola-mediált endocitózist és lizoszómális degradációját, mely csökkenti a membránban található receptor mennyiségét (108, 115).

Különféle tanulmányokban bizonyították, hogy a magasabb decorin expresszió csökkenti az EGFR aktivitását, ami p53 és p21^{WAF1/CIP1} fehérjék indukciójához vezetett. Ennek hatására a sejtek a ciklus G1 fázisában megrekednek, a sejtproliferáció gátlás alá kerül (116). Ugyanakkor munkacsoportunk kísérletei alapján a decorin hiánya fokozza az EGFR foszforilációt, mely az ERK1/2 aktivációjához, fokozott hepatocarcinogenesishez vezet kísérletes egér modellekben (57).

A decorin az ErbB család további tagjaival is képes interakcióba lépni, az ErbB4-hez való kötődése következtében a decorin megakadályozza az ErbB4 és ErbB2 dimerizációját,

ami proliferáció és differenciáció gátlásához vezet emlőcarcinoma sejtekben (88, 117, 118). Goldoni és munkatársainak *in vitro* vizsgálatai szerint decorin hatására az ErbB2-t expresszáló emlő adenocarcinoma sejtvonal sejtjeinek proliferációja csökken (117).

A decorinnak ugyancsak fontos interakciós partnere a hepatocytá növekedési faktor (HGF) receptora, a c-Met, melyhez való kötődés eredményekképpen a receptor erős Tyr foszforiláción megy keresztül. Így hasonlóan az EGFR-nél tapasztaltakhoz, a c-cbl mennyisége felhalmozódik és bekövetkezik a receptor proteoszómalis degradációja (64, 119). Ennek következtében további „downstream” jelátviteli útvonalakat befolyásol, gátolja a Myc és β -catenin expresszióját, ezáltal csökkent tumorigenesiszt és metasztázis képződést eredményez (119, 120). A gátolt Met receptor nyomán fokozódik az antiangiogén TIMP-3 fehérje expressziója, és ezzel egyidejűleg gátoltak az angiogén HIF-1 α és a VEGFA faktorok (121).

Az elmúlt években a decorinnal kapcsolatos kutatások célpontjává vált a proteoglikán különféle tirozin kinázokra kifejtett szerepének a tanulmányozása. Jelenlegi irodalmi adatok szerint, a decorin eddig azonosított interakciós partnerei: az IGF-1R, az InsR és ligandjaik (107, 122, 123), a PDGFR α és ligandja (106), illetve a VEGFR2 (124, 125) és az MSPR (más néven RON) (57). A korábban megszokott mintázattól eltérően, az IGF-1 receptorra a decorin nem a receptor caveola-mediált endocitózisa és internalizációja révén fejt ki hatását. Ebben az esetben az IRS-1, az IGF-1 és az Akt/ERK/p70S6K jelátviteli úton át kerül a sejtproliferáció gátlás alá (67, 123, 126, 127). A decorin ugyan a daganatos környezetben gátolja az IGF-1R aktivációját, ugyanakkor normál szövetben IGF-1R-agonistaként viselkedik (107). Munkacsoportunk egyik legfrissebb eredménye szerint, melyben négyféle humán hepatoma sejtvonalon vizsgáltuk a decorin molekuláris mechanizmusait, azt tapasztaltuk, hogy a különböző hepatoma eredetű sejtvonalakon az IGF-1R, valamint az InsR aktivitása eltérően változik decorin expozíció hatására (128). A HuH7 sejtekben decorin kezelés hatására kezdetben az IGF-1R és az InsR fokozott foszforilációját figyelhettük meg, majd 48 h elteltével a receptor aktivitása gátolt volt. Ezek az eredmények rávilágítanak arra, hogy a decorin és IGF-1R kapcsolata rendkívül összetett folyamat, és viselkedését nagyban meghatározza a tumor típusa és mikrokörnyezete (128).

Tehát összegzésképpen, a decorin számos módon érheti el daganatgátló szerepét, akár fokozva, vagy gátolva a különböző RTK-ok aktivitását és azok további jelátviteli útvonalaikat.

1.4.4.3. A decorin intracelluláris jelátviteli szabályozása

A decorin, különböző RTK-ok gátlásával számos downstream jelátviteli útvonalat képes befolyásolni, melyeknek fontos szerepe van a tumorsejtek proliferációjában, túlélésében, és angiogenesisében. Ilyen, gyakran tanulmányozott útvonalak a Ras/MEK/ERK, illetve a PI3K/Akt/mTOR jelutak, melyek bármilyen szintű meghibásodása fokozott tumorigenesishez vezethet (12, 129).

A decorin Met receptorhoz történő kötődése a β -catenin és a Myc onkoproteinek szelektív degradációjához vezet (4. ábra) (64, 120). Amennyiben a Met-hez az endogén ligandja a HGF kötődik, olyan jelátviteli kaszkádot indít el, melynek eredményeként az APC/axin/GSK-3 β komplex foszforilálja a β -catenint, így az ubiquitinálódik és lebomlik. Számos daganatban, úgy tűnik, hogy a β -catenin stabilizálása a Wnt jelátviteltől függetlenül történik. A β -catenin nem bomlik le, a magba transzlokálódik ahol a T sejt faktorról alkotva transzkripciós faktorként működik és aktiválja a Myc onkogén expresszióját (130). A Myc képes a sejtproliferációt stimuláló molekulák széles skáláját szabályozni, ilyen célpontja az AP4 (TFAP4), amely egy bázikus helix–loop–helix leucin-zipzár transzkripciós faktor, ismert represszora a p21^{WAF1/CIP1} tumorszupresszor fehérjének (131). Számos tudományos közlemény alátámasztja, hogy a decorin daganatgátló szerepét képes a p21^{WAF1/CIP1} indukcióján keresztül is kifejtetni (45, 108). A fentiekből adódóan a decorin Met receptorhoz való kötődését követően bekövetkezik a β -catenin és a Myc degradációja, melyet a 26S proteoszóma vált ki (120, 132), így a Myc hiányában, az AP4 transzkripciós faktor nem aktiválódik, mely a p21^{WAF1/CIP1} tumorszupresszor gátlását váltaná ki, így a p21^{WAF1/CIP1} aktivitása fokozódik decorin hatására (57, 120). Ugyan a fent említett jelátviteli útvonalat először a Met receptor esetében ismertették, ugyanez vonatkozhat más RTK-okra is.

A daganatos proliferáció során a sejtmagon belül a következő folyamatok ismertek: A fent említett jelátviteli útvonat során, a c-Myc aktiválja az AP4 transzkripciós faktort, amely gátolja p21^{WAF1/CIP1} ciklin-dependens kináz inhibitor expresszióját, amely így nem képes

blokkolni a CDK4/CyclinD1 komplexet. A szintetizálódott ciklin D1 fehérjék a Cdk 4 és Cdk 6 ciklin-függő kinázhoz kötődnek, és az ilyen módon aktiválódott kinázok a retinoblastoma (Rb) fehérjét fogják elsődlegesen foszforilálni. Ezek az események a Rb-E2F komplexek részleges disszociációjához vezetnek. A disszociálódott, és így a gátlás alól felszabaduló E2F transzkripciós faktorok további enzimeket aktiválnak, így restriktív ponton túllépve a sejt G1 fázisba lép és ezzel a sejtciklust aktív állapotba hozza. A decorinról ismert, hogy a p21^{WAF1/CIP1}-en felül további ciklin-dependens kináz inhibitorok indukciójára képes, ilyen a p27^{KIP1} (54, 55, 133), p15^{INK4b} (134) és a p57^{KIP2} (135), melyek indukciója révén gátolt a G1/S átmenet. Munkacsoportunk korábbi kutatásai alapján a decorin nem csupán a G1/S átmenetet képes gátolni, hanem a sejtciklus további lépését a G2-ből M fázisba történő belépést is (128). A tanulmány során alkalmazott Hep3B hepatoma sejtek mind a p53, mind pedig a retinoblastoma (Rb) gének deléziós mutációját hordozzák (136), ezért a sejtciklus gátlása G1/S pontban biztosan nem történik meg. Kísérleti rendszerünkben a decorin kezelés hatására a magas pAkt mellett, a pCDK1 és Wee1 expressziója is megemelkedett, illetve csökkent a Cdc25A foszfatáz aktivitása is. Ismert, hogy a megnövekedett Akt aktivitás replikációs stresszhez vezethet, amely aktiválja az ATR/Chk1/Wee1 útvonalat, így megállítja a sejtciklust a CDK1 foszforilációján keresztül G2/M fázis átmenetnél (137). Mindezek együtt jól magyarázzák a fent leírt decorin által kiváltott sejtciklus blokádot (128).

1.4.4.4. Decorin szerepe az angiogenesisben és a metasztatikus daganatokban

A daganatok növekedésének és metasztázisképzésének üteme nagymértékben függ neovascularizációs képességüktől. A szolid daganatokban az érújdonképződés során az endothelsejtek különböző növekedési hatásokra szaporodásnak indulnak. A folyamat legfontosabb résztvevői a TGF- β , az angiopoetin-1, a PDGF és más angiogén citokinek (4. ábra). A tumorok által termelt angiogén citokinek közül kiemelendő a VEGF. A decorin szerepe az angiogenesisben ellentmondásos: egyrészt kimutatták, hogy segíti az endothel sejtek terjedését, megkönnyíti adhéziójukat és migrációjukat (TGF- β és IGF-IR) (138). Másrészt, angiogenezis gátló szerepét is bizonyították tumorokban: *in vitro* vizsgálatban a humán endothelsejtek migrációja és differenciációja csökkent a decorin expresszáló sejtek esetén a vad típusú tumorokhoz képest. *In vivo* vizsgálatban a decorint termelő tumor

xenograftok neovascularizációja csökkent (139). Munkacsoportunk eredményei alapján a decorin képes kötődni a PDGF-hez, ezáltal megakadályozza annak receptorhoz való kötődését (106).

Az elmúlt évek tanulmányai, arra világítottak rá, hogy a decorin nem csupán primer daganatok gátlásában viselkedik hatékonyan, hanem a metasztázisok kialakulását is képes gátolni. Goldoni és munkatársainak *in vitro* kísérletei eredményei szerint (117), decorin hatására az ErbB2-t expresszáló emlő adenocarcinoma sejtek proliferációja csökken. *In vivo* kísérletek során a decorin hatékonyan megelőzi az emlődaganat metasztázis képzését a tüdőben, melynek patomechanizmusában az EGFR gátlása áll (117). További sikeres kutatások bizonyítják a decorin jótékony hatását, ugyanis gátolja az emlődaganat metasztázisképzését tüdőben, valamint csontban (117, 140, 141). Shintani munkacsoportja (142) a decorin áttétképzést gátló hatását osteosarcoma tüdőmetasztázis modellen vizsgálta, melynek eredményei szerint a decorint termelő osteosarcoma áttétképző képessége csökkent a kontroll, decorint nem termelő csoportokhoz képest. Decorint expresszáló onkolitikus adenovírusal fertőzött állatmodellekben a humán prostata carcinoma áttétképzése a csontban jelentősen alacsonyabb volt, a vad típusú kontrollhoz képest (143).

1.4.5. A decorin terápiás alkalmazási lehetőségei

Az elmúlt évtizedben számos *in vivo* tanulmányban bemutatták, hogy a decorin hatékonyan gátolja a tumor progresszóját. Különböző kísérletek irányultak a decorin adenovírus-mediált génterápiával történő terápiás alkalmazhatóságára (144, 145). Ígéretes stratégiaként jelentek meg ezek a géntechnológiával módosított vírusok, melyek megcélazzák és elpusztítják a tumorsejteket, anélkül, hogy a normál sejtekre toxikusan hatnának (146). A decorin ilyen típusú génterápiája sikeresnek bizonyult tüdő-, vastagbél- és laphámsejtes carcinoma sejtekben, melynek molekuláris hátterében az EGFR hatékony gátlása állt (147). Xu és mtsai tanulmányaikban (148), adenovírus-mediált decorin géntranszfer segítségével hatékonyan gátolták a Met és Wnt/ β -catenin jelátviteli útvonalakat, így megakadályozva a prosztata carcinoma csontmetasztázisának kialakulását. A decorin fokozott expressziója az osteosarcoma sejtekben csökkent motilitást és inváziót, valamint az állatok jobb túlélését eredményezte (142). A vírus által bejuttatott decorin csökkentette az

emlőrák progresszióját, valamint azok áttétképzését (140, 141, 149). Ma és munkatársai tanulmányai szerint (150), *in vivo* glióma modellben a vírus által közvetített decorin génterápia gátolta a tumor növekedését és jótékony hatással volt a túlélésre is. Ez a gátló hatás közvetlenül korrelált a decorin expressziós szintjével.

A fent említett adenovírus terápiás alkalmazásának lehetőségei több ponton is akadályba ütköztek. Egyrészt, az ECM általában gátolja a vírusok terjedését, beleértve a daganatok terápiája során alkalmazott vírusvektorokat is (144, 151), továbbá a klinikai vizsgálatokban részt vevő betegek eseteit, egy erősen immunszuppresszált tumor mikrokörnyezet jellemzi (144, 152). A decorin, mint az ECM egyik fő szabályozója képes a daganatos strómát úgy átalakítani, hogy ezáltal fokozza a vírus penetrációját, illetve a TGF- β gátlásával képes ellensúlyozni az intratumorális immunszuppressziót (152, 153). Choi kutatásai során (152) olyan mutáns decorin típusokat jutattak be adenovírus segítségével, mely különböző affinitással kötődtek a kollagénnhez. A kísérletben bemutatott modellben a decorin csökkent tumornövekedést és jobb túlélést eredményezett, melyet az ECM átrendezése révén sikerült elérni. Hasonló mechanizmussal gátolta a decorin a melanoma tüdőbe történő áttétképzését is (152).

Az *in vivo* génterápiás vizsgálatok mellett, számos *in vitro* kísérletben számoltak be a rekombináns decorin sikeres alkalmazásáról. A decorin magfehérje A431 laphámrák sejtvonalba történő bejuttatása, valamint a decorin cDNS emlőcarcinoma sejtekbe történő transzfekciója gátolta az EGFR aktivitást, indukálta apoptózist és gátolta a tumornövekedést (112, 114, 118). A decorin szisztémás alkalmazása gátolta az emlőrákos sejtek növekedését és metabolizmusát, és gátolta a tüdő áttétek kialakulását is (113, 117). A decorin szinergizáló hatást mutatott a karboplatin petefészek tumorsejtek növekedésének gátlásában (154), ugyanakkor hasnyálmirigy tumorsejtekben csökkentette a karboplatin és gemcitabin citosztatikumok hatásait (155). Ezek a vizsgálatok rávilágítanak arra, hogy a decorin szövetspecifikus módon fejt ki hatását, ugyanakkor klinikai körülmények között figyelembe kell venni, hogy a decorin képes negatívan módosítani a kemoterápiás szerek hatékonyságát.

Annak ellenére, hogy számos sikeres preklinikai vizsgálat alátámasztja a decorin terápiás alkalmazhatóságát, valamint bizonyított annak daganatgátló és antifibrotikus hatása, mégsem alkalmazzák klinikai forgalomban. Ennek egyik legfőbb oka, hogy a decorin mérete,

annak GAG oldalláncából adódó heterogenitása miatt változó, így nem felel meg a gyógyszerelőírásokra vonatkozó kritériumoknak (83). A GAG oldallánc viszont nélkülözhető lehetne a decorin daganatgátló hatásának eléréséhez, ugyanis legtöbb esetben, mint pl. a növekedési faktorokkal, vagy a RTK-kal történő interakció a proteinmaghoz való kötődés révén történik, ennek előállítása irányított mutagenesisel megvalósítható lehetne (83, 156), tehát terápiás alkalmazhatóságának lehetősége nem megalapozatlan.

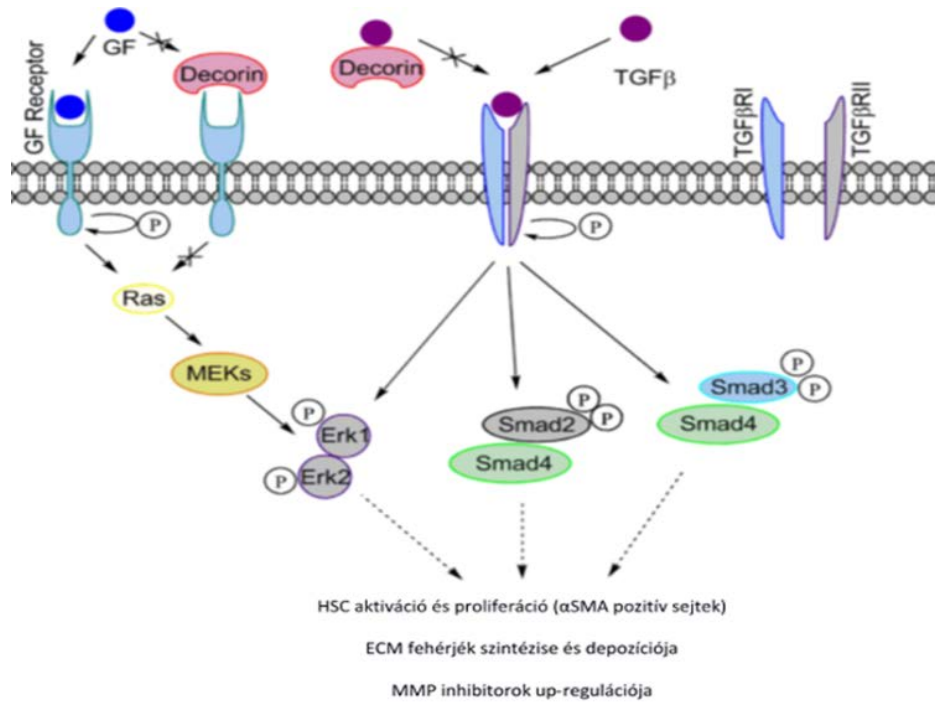
1.5. Munkacsoportunk korábbi eredményei

Munkacsoportunk korábbi vizsgálatai kimutatták, hogy TAA kezelt DCN^{-/-} egerek májában a fibrogenesis fokozott a vad típusú csoporthoz képest. A kollagénhez nem kötődő, szolubilis decorin képes a profibrotikus TGF- β -hoz kötődni, így megakadályozza a növekedési faktor receptorokhoz (TGF β RI és TGF β RII) való kötődését. Ennek nyomán elmarad a Smad2, a Smad3 és az Erk1/2 jelátviteli útvonal aktiválása (5. ábra). Az események következtében az csillagsejtek nem aktiválódnak, nem fokozódik az ECM fehérjék termelése, így a TAA-dal kezelt, vad típusú állatok májában a fibrosis kisebb mértékű lesz, mint a DCN^{-/-} egerekben (86).

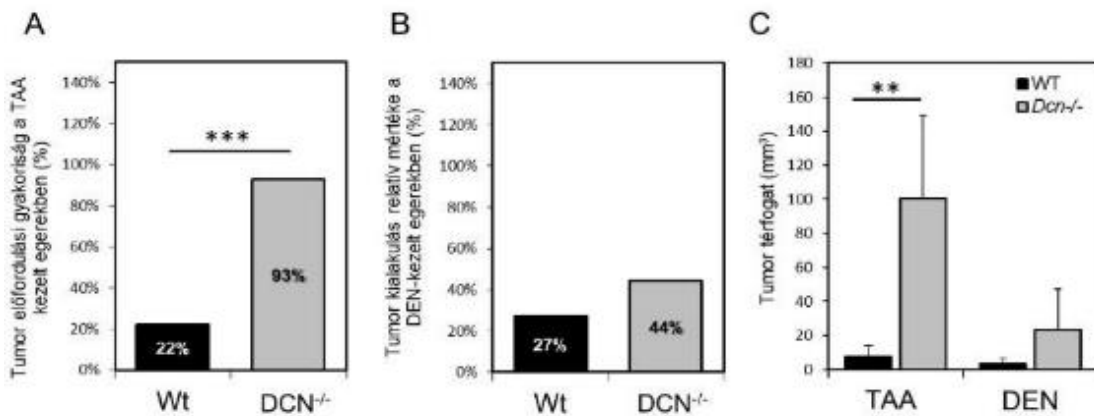
Kutatócsoportunk további eredményei alapján a DCN^{-/-} egerekben fibrogenesis mellett a hepatocarcinogenesis is fokozott (6. ábra). Ebben a kísérleti rendszerben a DCN^{-/-} és vad típusú állatokat kétféle hepatocarcinogénnel, TAA-dal, illetve dietil-nitrozaminnal (DEN) kezelték. A TAA citokróm p450 enzimek segítségével a májban metabolizálódik, ott előbb fibrosist, majd cirrhosist hozva létre. A TAA krónikus expozíciójának hatására a hepatocytá hyperregeneráció eredményeként a HCC cirrhotikus májban alakul ki. Ezzel szemben a nagy dózisú DEN direkt DNS mutációkat hoz létre a hepatocytákban, a DEN-nel kezelt állatok esetében nem jön létre kötőszövetes átépülés, a HCC nem cirrhotikus májban alakul ki. A DCN^{-/-} egerekben a HCC kialakulása mindkét kísérleti rendszerben fokozott volt a vad típusú csoporthoz képest. A tumorok térfogatát összehasonlítva azt láthatjuk, hogy a TAA-dal kezelt állatokban kb. ötször nagyobb tumorok alakultak ki, mint a DEN-nel kezelt egerek májában (6.C ábra) (57).

A leírt állatkísérletes eredményekre alapozva munkám során a decorin, mint RTK gátló terápiás felhasználhatóságának lehetőségeit vizsgáltam primer és colon adenocarcinoma

májmetasztázisában, mind *in vitro*, *in silico*, humán mintákon és állatkísérletes körülmények között.



5. ábra A decorin és a TGF-β receptorok interakciójának következményei a máj fibrotikus átalakulása során (86).



6. ábra Tumorképződés vad típusú és DCN^{-/-} egerek májában. (A) Tumorképződés TAA-dal kezelt állatokban (%) (B) Tumorképződés DEN-nel kezelt állatokban (%) (C) Daganatok térfogata (mm³) **p<0,01; ***p<0,001; Wt: vad típus; DCN^{-/-}: decorin knockout (57).

2. CÉLKITŰZÉSEK

Hipotézisünk szerint a decorin, mint fiziológias tirozin kináz receptor inhibitor, számos daganat proliferációjának hatékony gátlószere lehet. A korábbi állatkísérletes eredményekre alapozva, munkám célja a decorin szerepének, valamint molekuláris hátterének tanulmányozása hepatocelluláris carcinómában és colon adenocarcinoma májmetasztázisában.

Feltételezéseinket három szinten történő vizsgálatokkal terveztük bizonyítani:

- Humán HCC, valamint colon adnocarcinoma májmetasztázis szöveti microarray vizsgálatokat terveztünk, melyben a decorin, az α -simaizom actin és az EGFR fehérje, illetve mRNS szintű változásait tanulmányoztuk.
- *In vitro* olyan kísérletes rendszert terveztünk, melyben LX2 humán csillagsejt vonalat különféle (HLE, HepG2, Hep3B, HuH7) hepatoma, valamint colon adenocarcinoma (HT29) sejtek kondicionált médiumában növesztettük. Vizsgáltuk a különféle tumor sejtvonalak csillagsejtek (LX2) decorin termelésére adott változásait.
- Olyan *in vivo* modell rendszert hoztunk létre, melyben a decorint túltermelő májban (decorin expressziós vektor bejuttatásával) vizsgáltuk a primer hepatocarcinogenesis folyamatát, valamint a c38 egér colorectális carcinoma sejtvonal kolonizációját a májban.

Kutatásaim további céljai között szerepelt a fent bemutatott kísérleti rendszerek molekuláris hátterének feltérképezése, a résztvevő molekulák mennyiségi- és minőségi változásainak kimutatása, valamint átfogó képet kapni a decorin szerepéről primer- és metasztatikus májdaganatokban.

3. MÓDSZEREK

3.1. In silico vizsgálatok

Az *in silico* vizsgálataink során az online elérhető ArrayExpress adatbázis (European Bioinformatics Institute, Saffron Walden, UK) (157) E-MTAB-950 kísérleti adatait használtuk fel (<https://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/experiments/E-MTAB-950/>). Az adatbázisban összesen 112 HCC eset génextpressziós értékei találhatóak, valamint 10 olyan minta is elérhető, amely ugyanazon HCC-s beteg tumoros és nem tumoros környező májszövet adatait tartalmazza. Kontrollként 36 normál minta található. A vizsgált HCC esetek etiológiája: HBV és HCV fertőzés. Az adatbázisból a decorin és az α -simaizom actin (SMA) expressziós értékeit elemeztük és értékeltük R-programozási nyelv segítségével. A decorin génextpressziós értékeit az SMA mRNS mennyiségekre vonatkoztattuk, ezzel kiküszöbölve a decorin termelő csillagsejtek számának eltéréséből adódó decorin mennyiségi változásokat. A betegség progresszióját (cirrhosis, nagyon korai HCC, korai HCC, előrehaladott HCC, nagyon előrehaladott HCC) az adatbázisban feltüntetett kategóriák szerint használtuk fel, melynek pontos kritériumrendszeréről nincs további információnk. A barcelonai stádiumbeosztásnál (BCLC 0, BCLC A, BCLC B, BCLC C) szintén az adatbázisban fellelhető adatokat használtuk. Az eredmények statisztikai kiértékelése két csoport esetén Mann-Whitney vagy T-teszttel, több csoport összehasonlítása esetén ANOVA analízist (analysis of variance=varianciaanalízis) követően Tukey's post hoc teszttel történt.

3.2. Humán szöveti minták

3.2.1. Humán HCC esetek

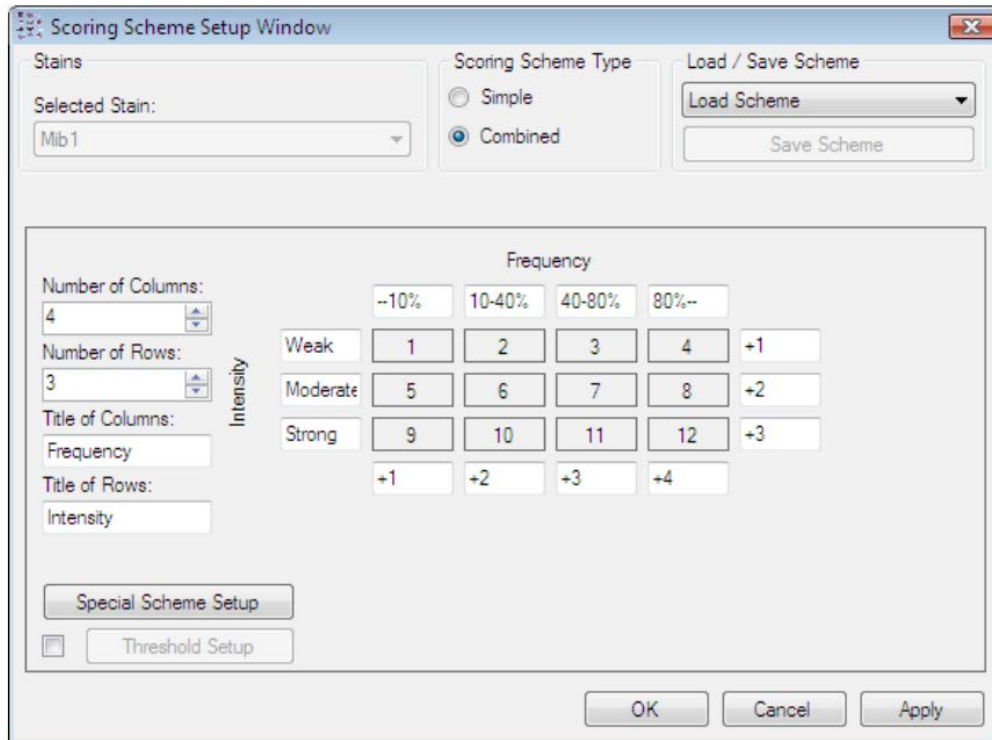
A humán HCC esetek szöveti microarray (tissue microarray, TMA) blokk összeállításához a Semmelweis Egyetem, I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet biopsziás archív anyagait használtuk fel, melyet a 2. táblázatban összegeztem. A biopsziás jegyzőkönyvek alapján összesen 37 db paraffinba ágyazott mintát gyűjtöttünk össze, ebből 19 cirrhosis talaján kialakult HCC, 9 db pedig nem cirrhotikus májban kialakult HCC volt. Kontrollnak 9 db haemangioma melletti ép májszövetet használtunk. A hematoxilin-eozin festett metszetek alapján 2 mm-es reprezentatív tumoros és normál szövethengereket (core-

okat) gyűjtöttünk, és illesztettünk egy 70 mintás TMA blokkba. A TMA blokkok HCC mintái minden beteg esetén tartalmazta a tumor stromát és tumor körüli részt (környező cirrhotikus és nem cirrhotikus májállomány) külön-külön core-okban. A TMA lemez elkészítése számítógép-vezérelt TMA Master géppel történt (3DHISTECH Kft, Budapest). Ezt követően a blokkokat metsztük majd hematoxin-eozin festést, illetve decorin, SMA és EGFR immunfestést végeztünk rajtuk (lásd 3.3.1. fejezet). A metszeteket Panoramic 250 Flash II géppel digitalizáltuk (3DHISTECH Kft). A TMA lemezen végzett immunhisztokémiai reakció kiértékelését két egymástól független patológus végezte 12 score-rendszer alapján (nincs festődés = 0, alacsony decorin intenzitás = 1-6, erős decorin pozitivitás = 7-12) Panoramic Viewer (3DHISTECH Kft), TMA Module 2.0 Bundled szoftver használatával, a felhasználói kézikönyv 4.1.2 „Combined Scoring Scheme” fejezete alapján. A software az adott score értéket a szövetminta festődésének intenzitása és a frekvenciájának kombinációjából számolja az 7. ábra szerint. A két független eredményt átlagoltuk, a statisztikai analízist Graphpad Prism szoftver segítségével végeztük. A humán HCC mintákat decorin negatív, alacsony és magas decorin expresszióval rendelkező csoportokba kategorizáltuk.

Hogy pontosabb képet kapjunk a csillagsejtek decorin termelő aktivitásáról, a decorin mennyiségét az SMA mennyiségére vonatkoztatva is meghatároztuk, így kiküszöbölve a decorin termelő csillagsejtek számának különbségéből eredő decorin mennyiségi változásokat.

2. táblázat A TMA blokk összeállításához felhasznált biopsziás esetek adatai

Cirrhosis talaján kialakult HCC				
Beteg ID	Nem	Kor	Szövet típusa	Etiológia
01	férfi	51	cirrhotikus	HCV
02	nő	62	cirrhotikus	HCV
03	férfi	85	cirrhotikus	HCV
04	férfi	75	cirrhotikus	ismeretlen
05	férfi	74	cirrhotikus	ismeretlen
06	nő	58	cirrhotikus	ismeretlen
07	nő	80	cirrhotikus	HCV
08	férfi	55	cirrhotikus	HCV
09	férfi	61	cirrhotikus	HCV
10	férfi	52	cirrhotikus	HCV
11	nő	53	cirrhotikus	HCV
12	nő	57	cirrhotikus	NASH
13	férfi	63	cirrhotikus	aethyl
14	férfi	71	cirrhotikus	HCV
15	férfi	71	cirrhotikus	HBV
16	nő	78	cirrhotikus	HCV
17	férfi	30	cirrhotikus	HBV
18	férfi		cirrhotikus	HBV, aethyl
19	férfi		cirrhotikus	HCV
Nem cirrhotikus májban kialakult HCC				
20	férfi	72	nem cirrhotikus	ismeretlen
21	nő	73	nem cirrhotikus	ismeretlen
22	férfi	70	nem cirrhotikus	ismeretlen
23	férfi	33	nem cirrhotikus	ismeretlen
24	férfi	27	nem cirrhotikus	adenoma
25	férfi	89	nem cirrhotikus	ismeretlen
26	férfi	71	nem cirrhotikus	ismeretlen
27	férfi	54	nem cirrhotikus	HCV
28	férfi	82	nem cirrhotikus	ismeretlen
Kontroll minták				
29	nő	42	haemangioma	
30	nő	46	haemangioma	
31	nő	43	haemangioma	
32	nő	46	haemangioma	
33	nő	56	haemangioma	
34	nő	68	haemangioma	
35	nő	37	haemangioma	
36	nő	43	haemangioma	
37	nő	40	haemangioma	



7. ábra A Panoramic Viewer (3DHISTECH Kft), TMA Module 2.0 Bundled szoftverének scorolási metodikája. A szoftver segítségével egyszerre jellemezhető a festődés jelintenzitása és frekvenciája. Intenzitás: gyenge (1+): 1-4, közepes (2+): 5-8, erős (+3): 9-12; Frekvencia: +1: >10%, +2: 10-40%, +3: 40-80%, +4: <80%.

3.2.2. Humán colon adenocarcinoma májmetasztázis szöveti minták

A humán colon adenocarcinoma májmetasztázis microarray analízishez a Semmelweis Egyetem, I. Sz. és II. Sz. Patológiai Intézet biopsziás archív anyagait használtuk fel. A TMA blokk összeállításához 30 db humán FFPE mintát használtunk, mely minden beteg esetén külön-külön coreokban tartalmazta mind a normál colon, primer tumor, májmetasztázis és metasztázis körüli nem tumoros szövetet. A biopsziás minták adatait a 3. táblázat tartalmazza.

3. táblázat A TMA blokk összeállításához felhasznált biopsziás minták adatai.
 *x=nincs adat; ** Növekedési mintázat meghatározása: Höppener et al. (2019) tanulmánya alapján történt (158); ID=azonosító; LM=májmetasztázis.

Beteg ID	Nem	Kor	Grade:	T:	N:	M*:	Növekedési mintázat LM**
1	nő	61	II	3	1	x	„replacement”
2	nő	45	I	3	1	x	„desmoplasticus”
3	férfi	64	II	3	1	1	„desmoplasticus”
4	nő	46	II	3	0	x	„desmoplasticus”
5	férfi	48	II	4	2	x	„replacement”
6	nő	66	II	4	1	x	„desmoplasticus”
7	férfi	69	II	3	0	x	„desmoplasticus”
8	férfi	68	II	3	2	x	„replacement”
9	férfi	52	II	4	1	1	„desmoplasticus”
10	nő	56	II	3	0	x	„desmoplasticus”
11	nő	73	II	3	0	x	„desmoplasticus”
12	nő	69	II	3	0	2	„replacement”
13	férfi	69	II	3	2	1	„replacement”
14	nő	66	II	3	1	x	„desmoplasticus”
15	nő	53	II	1	0	x	„replacement”
16	nő	68	II	3	2	x	„desmoplasticus”
17	férfi	67	III	3	2a	x	„replacement”
18	nő	35	II	3	2a	x	„desmoplasticus”
19	férfi	66	II	2a	0	x	„desmoplasticus”
20	férfi	66	III	3	2a	1	„replacement”
21	férfi	59	II	3	1	1	„desmoplasticus”
22	férfi	49	III	3	1	1	„desmoplasticus”
23	férfi	51	III	3	1	1	„replacement”
24	nő	61	II	4a	2b	1	„replacement”
25	férfi	76	III	3	x	x	„desmoplasticus”
26	férfi	57	III	3	1	x	„desmoplasticus”
27	férfi	43	II	1	1	x	„desmoplasticus”
28	nő	59	II	2	0	x	„desmoplasticus”
29	nő	70	II	3	0	1	„desmoplasticus”
30	férfi	56	II	3	0	x	„desmoplasticus”

A TMA lemez elkészítése a fentiekben már ismertett módon történt, számítógép-vezérelt TMA Master géppel. Ezt követően a blokkokat metszettük, majd hematoxin-eozin festést, illetve decorin és SMA immunhisztokémiai reakciókat végeztünk rajtuk (lásd 3.3.1 fejezet). A metszeteket Panoramic 250 Flash II géppel digitalizáltuk, majd Panoramic

Viewer, v1.15 DensitoQuant szoftver használatával értékeltük. A H-score értékeket a festődés intenzitása (0, 1+, 2+ vagy 3+) és a pozitívan festett szövet (százalék) szorzata alapján számítottuk, az így kapott H-score érték 0 és 300 között változhat. A colorectális tumorok esetében azért térünk el a HCC minták kiértékelésénél bemutatott 12-es score rendszertől, mert mind a normál vastagbél nyálkahártya, mind pedig a primer colon adenocarcinoma minták esetében abundáns decorin intenzitást mértünk, ennek kiértékelése a 12-es score rendszerrel lehetetlen lett volna, ugyanis a software nem tudott volna különbséget tenni a minták között. Az immunhisztokémiai reakciók kiértékelését két egymástól független patológus végezte, az így kapott eredményeket átlagoltuk, a statisztikai analízist Graphpad Prism szoftver segítségével végeztük. A növekedési mintázat „desmoplasticus” és „replacement” kategóriákba törő csoportosítása Höppener et al. (2019) tanulmánya alapján történt (158).

3.3. Morfológiai vizsgálatok

3.3.1. Immunhisztokémia FFPE mintákon

Formalinban fixált, paraffinba ágyazott (FFPE) metszeteket kétszer váltott xylolban (5-5 perc) deparaffináltuk, ezt követően leszálló alkoholsorban (abszolút alkohol, 70%, 50%-os etil-alkohololdat, desztillált vízzel hígítva) végül 5 perc dH₂O-ban inkubálva rehidráltuk. Az antigén feltárás konvencionális kuktában történt, magas hőmérsékleten és -nyomáson TRIS-EDTA pufferben (10 mM TRIS, 1 mM EDTA, 0.05% Tween-20, pH 9) 20 percig. A mosási lépést (3x5 perc 0,05% Tween-20 detergens tartalmú PBS-sel (továbbiakban PBST)) követően az endogén peroxidáz aktivitását gátoltuk 10% H₂O₂ oldattal (metanolban hígítva), mellyel 10 percig, szobahőn inkubáltuk a mináinkat. A nem-specifikus fehérjekötések blokkolása 5 w/v%-os BSA (bovine serum albumin) /PBS oldatban történt, 1 órán keresztül, szobahőmérsékleten. Ezt követően a metszeteket az elsődleges ellenanyag (decorin, SMA, EGFR) megfelelő hígításában egy éjszakán át 4 °C-on inkubáltuk (4. táblázat). PBST pufferben történő mosást (3x5 perc) követően a megfelelő másodlagos ellenanyaggal (HRP-vagy biotin-konjugált) inkubáltuk a metszeteket 1 órán át, szobahőmérsékleten. Az alkalmazott ellenanyagok és hígításaik listáját az 4. táblázat összegezi. Biotinált másodlagos ellenanyag esetén a jelerősítés Vectastain ABC kittel (Vector Laboratories Inc, Burlingame,

CA, USA) történt a gyártó utasításai alapján. Az immunreakciót diamino-benzidin (DAB) (Dako, Glostrup, Denmark) kromogén szubsztrát oldattal hívtuk elő. A sejtmagokat hematoxilinnel festéssel tettük láthatóvá. A metszeteket Pannoramic 250 Flash II géppel digitalizáltuk (3DHISTECH Kft).

4. táblázat Az kísérletekhez használt ellenanyagok és hígításaik * DakoCytomation Glostrup Dánia, Invitrogen/Life Technologies Carlsbad CA, Sigma-Aldrich St. Louis, MO, Abcam Cambridge Egyesült Királyság, Cell Signaling Technology Danvers, MA

Antigén specificitás	Faj	Gyártó*	Cat.No	Hígítás IHC	Hígítás WB
Decorin	Nyúl poliklonális	Sigma	HPA003	1:50	1:500
Smooth Muscle	Egér monoklonális	DakoCytomatio	m0851	1:50	-
EGFR	Nyúl poliklonális	Sigma	HPA018		1:1000
pEGFR (Tyr1068)	Nyúl monoklonális	Cell Signaling	3777	-	1:1000
pIGF-1R (Y1161)	Nyúl poliklonális	Abcam	ab39398	-	1:1000
pAkt (Thr308)	Nyúl monoklonális	Cell Signaling	2965	-	1:1000
pAkt (S473)	Nyúl monoklonális	Cell Signaling	4058	-	1:1000
pERK1/2	Nyúl monoklonális	Cell Signaling	4377	-	1:1000
β -actin	Egér monoklonális	Sigma	A2228	-	1:2000
Másodlagos ellenanyag	Faj	Gyártó*	Cat.No	Hígítás IHC	Hígítás WB
Anti-nyúl immunglobulin/HRP	Kecske poliklonális	DakoCyto	P 0448	1:200	1:2000
Anti-egér immunglobulin/HRP	Kecske poliklonális	DakoCyto	P 0447	1:200	1:2000
Alexa Fluor® 568, anti-nyúl IgG	Kecske poliklonális	Invitrogen	a-11011	1:200	-

3.3.2. Fluoreszcens immunhisztokémia fagyasztott metszeteken

A 10 μ m vastagságú metszeteket -20 °C-os metanolban (20 perc) és acetonnal (10 mp) fixáltuk, majd szárítottuk. A mosási lépést követően (3x5 perc PBST-ben) a nem-specifikus kötőhelyek telítése céljából 5 w/v% BSA/PBS oldattal inkubáltuk a metszeteket 37 °C-on, 30 percen keresztül. Ezt követően a mintákat 4 °C-on, egy éjszakán át anti-DCN ellenanyag megfelelő hígításával inkubáltuk (4. táblázat). Újabb PBST pufferes mosást (3x5 perc) követően Alexa Fluor® 568, anti-nyúl IgG másodlagos ellenanyaggal szobahőmérsékleten, 30 percen át inkubáltuk a lemezeket. A sejtmagok festéshez 4'-6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI)-t (PBS-ben hígítva, 1:50, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) használtunk. Majd egy végső mosási lépést követően a lemezeket fluoreszcens fedő médiummal (Mounting

medium, Dako) fedtük. A metszeteket Nikon Eclipse E600 fluoreszcens mikroszkópban vizsgáltuk, mikroszkópos képeket a Lucia Cytogenetics version 1.5.6 program segítségével készítettünk.

3.4. Génexpressziós vizsgálatok

3.4.1. RNS izolálás

Teljes RNS izoláláshoz sejtminták esetén a sejteket 3x mostuk steril PBS-sel, majd 500 µl Trizol reagensben (Invitrogen) felkapartuk a sejteket. 5 perces inkubálást követően a mintákhoz 200 µl kloroformot adtunk, majd 13 000 g fordulatszámmal 15 percig, 4 °C-on centrifugáltuk. A felső vizes fázist új eppendorfba pipettáztuk, majd ehhez 70 µl 3 M-os nátrium-acetátot, ezt követően 700 µl izopropanolt adtunk. Újabb centrifugálás lépést követően a pelletet először abszolút etanollal, majd 75%-os etanollal mostuk. Centrifugálást követően a pelletet szobahőmérsékleten kiszárítottuk, majd 30 µl DEPC vízben oldottuk.

Az FFPE minták RNS izolálásához első lépésként a tumorokat hematoxilin-eozin festett lemezei alapján azonosítottuk, majd ez alapján a natív metszetekről PALM MicroBeam lézer mikrodisszektor segítségével tumor- és a tumor környező szövetet gyűjtöttünk (Carl Zeiss™ Membrane Slides 1.0 PEN). Az RNS izolálásához PureLink FFPE Total RNA Isolation Kitet (Life Technologies, Carlsbad CA, USA) használtunk a gyártó utasításai alapján. Az RNS koncentrációját és tisztaságát NanoDrop ND-1000 spektrofotométerrel (NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, USA) határoztuk meg. Az így izolált RNS-t -80 °C-on tároltuk felhasználásig.

3.4.2. Reverz transzkripció

A cDNS szintézist 1 µg tisztított RNS-ből, High Capacity cDNA Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) segítségével a gyártó ajánlása szerint hajtottuk végre. A reakció a StepOne Plus system (Life Technologies) készülékben zajlott. A reverz transzkripció összemérésének adatait az 5. táblázat tartalmazza. Az átfírt cDNS mintákat további felhasználásig -80 °C-on tároltuk.

5. táblázat A reverz transzkripció metodikája

Komponens	Bemért mennyiség/ reakció			
RT Buffer (10x)	2 µl			
25 x dNTP mix (100 mM)	0,8 µl			
Random Primer (10x)	2 µl			
Reverz transzkriptáz (50 U/µl)	1 µl			
RNáz mentes dH ₂ O	4,2 µl			
RNS templát	10 µl			
	1. lépés	2. lépés	3. lépés	4. lépés
Hőmérséklet (°C)	25	37	85	4
Időtartam (perc)	10	120	5	∞

3.4.3. Real Time Q-PCR

A gének expressziójának vizsgálatához TaqMan® Universal PCR Master Mix-et (Applied Biosystems) használtunk, illetve a vizsgált génre specifikus primereket (decorin (DCN, Assay ID: Hs00370383_m1, Life Technologies), SMA (ACTA2, Assay ID: Hs.PT.56a21389192), gliceraldehyd-3-foszfát dehidrogenáz (GAPDH) (GAPDH, Assay ID: Hs.PT.39a22214836, Integrated DNA Technologies) és 18S RNS (Part No.:4319413E)), valamint 50 ng cDNS templátot. Egy reakció végtérfogata 20 µl volt. A mintákat triplikátumokban 96-lyukú plate-ben mértük össze. A Real Time Q-PCR reakció a StepOne Plus system (Life Technologies) készülékben zajlott. A PCR reakció metodikáját a 6. táblázat tartalmazza. Az mRNS értékek meghatározásához a Real Time Q-PCR eredményeinkből származó $2^{-\Delta\Delta CT}$ értéket használtuk fel, melyet a belső kontrollra (housekeeping génre) való normalizálással kaptunk meg.

6. táblázat A real-time PCR reakció metodikája

Komponens	Bemért mennyiség		
cDNS templát (50 ng)	2 µl		
Gene Expression Assay (primer) (20x)	1 µl		
TaqMan® Universal PCR Master Mix (2x)	10 µl		
dH ₂ O	7 µl		
	Hőmérséklet	Időtartam	Ciklus
Kezdeti denaturáció	95 °C	10 perc	1
Denaturáció	95 °C	15 mperc	40
Anelláció & Szintézis	60 °C	1 perc	

3.5. In vitro vizsgálatok

3.5.1. Sejttenyésztés

Sejtes kísérleteink során, a HCC vizsgálatokban négy különböző humán hepatoma sejtvonal kondicionált médiumával (HuH7, HLE, HepG2, Hep3B) dolgoztunk, colon adenocarcinoma vizsgálatokhoz pedig a HT29 humán colon adenocarcinoma sejtek kondicionált tápfolyadékát használtuk, valamint mindkét kísérlet esetén az LX2 humán csillagsejt vonalat használtuk a csillagsejt-tumorsejt-decorin interakció vizsgálatára. A HuH7, HLE sejtvonalakat a JCBR Cell Bankból (JCRB0403, JCRB0404; Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank; Osaka, Japán), a HepG2, Hep3B sejteket pedig az ATCC-től (ATCC® HB-8065™; HB-8064™ American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, Egyesült Államok) szereztük be. Az LX2 humán csillagsejt vonalat Dr. Scott Friedman (Mount Sinai School of Medicine, New York, Egyesült Államok) bocsátotta rendelkezésünkre.

A sejteket 37 °C-on 5% CO₂ mellett, 1000 mg/l (5,5 mmol/l) glükóz tartalmú Dulbecco's Modified Eagle's médiumban (DMEM-1000) (Sigma Aldrich, St Louise, MO, USA) tenyésztettük, 10% [v/v] FBS (fetal bovine serum; Sigma Aldrich), 100 U/ml penicillin és 100 µg/ml streptomycin (Sigma Aldrich) jelenlétében.

3.5.2. Interakciós vizsgálat

A kondicionált médium (CM) elkészítéséhez a sejteket (HuH7, HLE, HepG2, Hep3B, HT29) 80% konfluenciáig növesztettük, majd mostuk PBS-sel és friss médiummal inkubáltuk 16 órán keresztül, majd az összegyűjtött, szűrt tápfolyadékot -80 °C-on tároltuk felhasználásig.

Az interakciós vizsgálatához, az LX2 sejteket 6-lyukú tenyésztő edényen növesztettük 80% konfluenciáig, ezt követően 24 órán keresztül a megfelelő tumor sejt kondicionált médiumában inkubáltuk, majd cseréltük FBS mentes tápfolyadékra és 16 óra elteltével gyűjtöttük a médiumot fehérje meghatározás, illetve a sejteket RNS vizsgálatok céljából. A kontroll mintákhoz CM helyett friss DMEM médiumot adtunk, további lépései teljesen azonosak voltak a fent leírtakkal. A mintákat felhasználásig -80 °C-on tároltuk.

3.6. Fehérje kimutatási módszerek

3.6.1. Fehérje izolálás

A homogenizálás a fagyasztott májszövetek esetén folyékony nitrogénben, fagyasztva porítással történt. Az elporított mintához tömegének megfelelő mennyiségű lízis puffert (1 mg szövethez 10 µl puffer) (20 mM TRIS pH=7,5, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0,5% Proteáz inhibitor koktél (Sigma Aldrich, St Louise, MO, USA) 2 mM Na₃VO₄, 10 mM NaF) adtunk. Sejtkultúrák esetén egy 6-lyukú tenyésztő edényről a sejteket PBS mosást követően 0,25 ml/lyuk lízis pufferben, sejtkaparó segítségével gyűjtöttük össze. A mintákat ultrahangos szonikátor segítségével homogenizáltuk, majd 30 percig jégen inkubáltuk. Ezt 15 000 g-n, 4 °C-on, 20 perc centrifugálás követte, majd a felülúszó fehérje koncentrációját Bradford Assay (Bio-Rad) segítségével határoztuk meg (159).

3.6.2. Phospho-Kinase és RTK array

A foszfo-kináz és a foszfo-tirozin kináz receptorok aktivitásának méréséhez Proteome Profiler Phospho-Kinase Array Kit-et, valamint Proteome Profiler Mouse Phospho-RTK Array Kit-et (R&D Systems, Minneapolis, USA) használtunk a gyártó utasításai alapján. Csoportonként 3 máj poolozott mintájából Phospho-Kinase Array esetén 1800 µg /2000 uL összfehérjét, Phospho-RTK Array esetén pedig 1000 µg /1500 uL fehérjét mértünk minden egyes membránra. A membránok kemilumineszcens jeleit iBright FL1500 Imaging System rendszer (Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA USA) segítségével tettem láthatóvá. A jelek denzitás-értékeit pedig Image J software (Version 1.50b, NIH, USA) segítségével értékeltem ki.

3.6.3. Western blot és dot blot

Western blot esetében a mintákat 1x-es Laemli mintapufferben, 1,5% β-merkaptoetanollal, 95 °C-on, 5 percig denaturáltuk. A 10%-os SDS-poliakrilamid géltre mintánként 20 µg összfehérjét vittünk fel és választottunk el. A gélelektroforézis 30 percig, 200 V-on, konstans áramerősség mellett történt Mini Protean vertikális elektroforézis rendszeren (Bio-Rad, Hercules, CA). Az elválasztott fehérjék átvitele a gélről PVDF (Merck Millipore, Billerica, MA) membránra 1,5 órán keresztül állandó 100 V feszültségen történt.

Dot blot esetében 200 µl sejtmédiumot vittünk fel párhuzamosonként a dot blot készülék lyukaiba, majd vákuum-pumpa segítségével PVDF membránra blottoltuk.

A blottolás hatékonyságát mindkét esetben Ponceau-festéssel határoztuk meg. A membrán nem-specifikus kötőhelyeinek telítésére 5 w/v% tejport (Bio-Rad) (PBS-ben oldva) használtunk 1 órán keresztül, szobahőmérsékleten. Ezt követően a mintákat egész éjszakán át 4°C-on rázattuk az elsődleges ellenanyagok (decorin, EGFR, pEGFR (Tyr1068), pIGF-1R (Y1161), pAkt (Thr308), pAkt (S473), pERK1/2, β-actin) megfelelő hígításaiban (4. táblázat). Mosási lépést követően (3x5 perc TBST) a membránokat a megfelelő HRP-konjugált másodlagos ellenanyaggal inkubáltuk 1 órán át, szobahőmérsékleten. A kemilumineszcens jeleket SuperSignal West Pico kemilumineszcens szubsztrát kit (Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA USA) segítségével hívtuk elő, és iBright FL1500 Imaging System rendszer segítségével vizualizáltuk. A jelek denzitás-értékeit pedig Image J software (Version 1.50b, NIH, USA) segítségével értékeltük ki. Az alkalmazott ellenanyagok listáját és azok hígításait az 4. táblázat összegezi. Belső kontrollként β-actint használtunk.

3.6.4. Humán decorin ELISA

A humán decorin mennyiségét az egerek szérumból enzimhez kapcsolt immunszorbens vizsgálattal (ELISA) határoztuk meg, Human Decorin ELISA Kit (Sigma, St. Luis, MO USA) segítségével, a gyártó utasításai szerint. Csoportonként 10-10 egér mintáját vizsgáltunk, duplikátumokban, melyek átlagértékeit használtuk a statisztikai elemzésekhez. A kolonizációs kísérletnél a 21. napon vett szérumból történt a decorin meghatározás, a hepatocarcinogenesis vizsgálatoknál pedig az 5 hónapos, valamint 10 hónapos egereknél történt mintavétel. Az ELISA plateket Labsystem Multiskan MS 352 készülékkel (LabSystems, Finnország) 570 nm-en dokumentáltuk.

3.7. Állatkísérletek

Az *in vivo* vizsgálatok az állatkísérletek végzéséről szóló 40/2013. (II. 14.) Korm. Rendelet alapján, az Állatkísérleti Tudományos Etikai Tanács jóváhagyásával zajlott (Engedélyszám: PEI/001/2457-6/2015.). Kísérleteinket a 3R elvek (replacement, reduction,

refinement) érvényesítésének figyelembevételével végeztük. Kísérleteinkhez Intézetünkben szülemző beltenyészett, vad típusú C57BL/6 egereket használtuk.

3.7.1. DNS konstrukciók

A DNS plazmid konstrukciók előállításához standard molekuláris biológiai módszereket alkalmaztunk. A hidrodinamikus génbevitelhez, a humán decorin cDNS-t pGEM-1 expressziós vektorba történő klónozását követően, pLIVE vektorba szubklónoztuk, a BamHI és XhoI restrikciós hasítóhelyek közé. A pLIVE (Liver *In Vivo* Expression) (Mirus Bio, Madison, WI, USA) vektor sajátossága, hogy az expresszió albumin promóter és α -fetoprotein enhancer II által vezérelt, mely biztosítja a hosszan tartó, magas szintű decorin kifejeződést a transzfektált egerek hepatocytáiban. Pozitív kontrollként pLIVE-SEAP (secreted alkaline phosphatase) konstrukciót használtuk, melynek aktivitása az egerek véréből könnyedén meghatározható SEAP Kemilumineszcens Assay segítségével, mely közvetett információként szolgál a transzfekció sikerességéről. A transzformálás során a plazmid klónozáshoz *Escherichia coli* DH5 α törzset használtuk, majd a plazmid izolálás QIAprep Spin Miniprep Kittel (Qiagen, Valencia, CA) történt a gyártó utasításai alapján. Az emésztés hatékonyságát 1%-os agaróz gélen ellenőriztük. A klónok ellenőrzése Sanger-féle DNS szekvenálással történt (Simmelweis Egyetem).

3.7.2. Hidrodinamikus génbevitel

Az *in vivo* génterápia során 18-25 grammos C57BL/6 vad típusú egereket használtunk. A plazmid DNS-t (pLIVE-SEAP és pLIVE-DCN, illetve pLIVE-SEAP és pLIVE-0) hidrodinamikus génbevitel módszerével, farokvénán keresztül juttattuk az egerek keringésébe a gyártó utasításai alapján (Mirus Bio LLC). A módszer sajátossága, hogy nagy nyomáson, nagy térfogatban (2 ml fiziológiás sóoldatban hígított 15 μ g nagy tisztaságú plazmid DNS), rövid idő alatt (4-7 másodperc) juttattuk be a vektort az állatokba, mely az albumin promóternek és a hidrodinamikus viszonyoknak köszönhetően májsejtekben specifikusan fejeződtek ki. Az egerek a génterápia során altatásban voltak, az injektáláshoz 27G-s egyszer használatos tűt használtunk. Primer hepatocarcinogenesis vizsgálatokhoz kontrollként üres vektorral (pLIVE-0 és pLIVE-SEAP) transzfektált egereket használtunk, a

kezelt csoportokba pedig a DCN gént (pLIVE-DCN és pLIVE-SEAP) juttattuk be. Az egér c38 colorectális carcinoma kolonizációs kísérleteink során pedig, a kontroll egerek pLIVE-0 vektorral, a kezelték pedig pLIVE-DCN vektorral voltak transzfektálva.

3.7.3. SEAP Reporter Gén Assay

A kísérletes hepatocarcinogenesis vizsgálatokhoz pozitív kontrollként pLIVE-SEAP (szekretált alkalikus foszfatáz) vektort alkalmaztunk, melynek szintjét az egerek TAA kezelésének félidőben (5. hónap) levett szérumaiból mértük. A SEAP aktivitását a Phospho-Light™ SEAP Reporter gén assay kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA USA) segítségével határoztuk meg, a gyártó utasításai szerint. A kemilumineszcens jeleket Kodak Image Station 4000MM Digital Imaging System (Carestream Health, Inc. Rochester, NY, USA) géldokumentációs készülék segítségével tettük láthatóvá. A jelek denzitometrált értékeit Image J software-rel határoztuk meg. A méréseket 96-lyukú platen duplikátumokban végeztük, melyek átlagértékeit használtuk a statisztikai elemzésekhez.

3.7.4. Primer hepatocarcinogenesis modell

A kísérletes hepatocarcinogenesis vizsgálatokhoz összesen 36 darab C57Bl/6 egeret használtunk (7. táblázat). A kísérlet során a hidrodinamikus génbevitelt követően (3 nap elteltével) 10 hónapon keresztül az egerek ivóvizéhez 150 mg/l koncentrációban TAA-ot adagoltunk. Kontrollként, azonos korú, azonos genetikai háttérrel rendelkező, kezeletlen állatokat használtunk. Az egereket 10 hónapos TAA expozíciót követően éteres altatásban, cervikális diszlokációval termináltuk. Szérum mintákat a kísérlet félidejében, illetve a végén gyűjtöttük. Termináció során megmértük az állatok test- és májtömegét, illetve meghatároztuk a makroszkopikusan látható daganatok számát. A májminták felét folyékony nitrogénben fagyasztottuk, majd felhasználásig -80 °C-on tároltuk, a másik felét 10%-os formaldehid oldatban fixáltuk és paraffinba ágyasztuk további szövettani vizsgálatok céljából. A tumorok térfogatának meghatározása céljából a hematoxilín-eozin festett metszeteket Panoramic Scan készülék (3DHISTECH Kft) segítségével digitalizáltuk, majd a kiértékelést a Panoramic viewer programmal (3DHISTECH Kft) végeztük. A tumorok térfogatát a

következő képlet alapján számoltuk: $V = (\text{szélesség (mm)}^2 \times \text{hossz (mm)} * \pi) / 6$. A primer hepatocarcinogenesis metodikáját a 8. ábra sematikusan foglalja össze.

7. táblázat A primer hepatocarcinogenesishez használt egércsoportok

Állatszám (db)	TAA	Vektor	SEAP
15	+	pLIVE-0	+
15	+	pLIVE-DCN	+
3	-	pLIVE-0	+
3	-	pLIVE-DCN	+

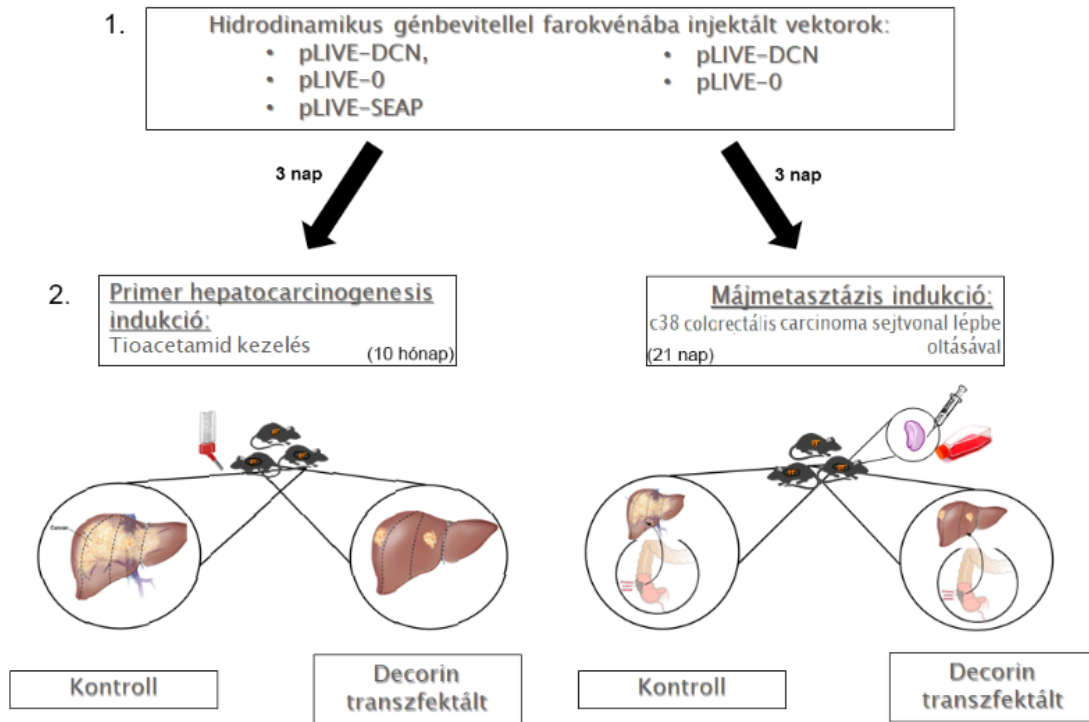
3.7.5. Egér c38 colorectális carcinoma kolonizációs modell

A c38 egér colorectális carcinoma sejtvonalat sorozatos *in vivo* szubkután transzplantációval tartottunk fenn C57Bl/6 egerekben. A szubkután fenntartott c38 tumorokat eltávolítottuk az egérből, majd apró darabokra vágtuk és 0,7 mg/ml kollagenáz IV és 10 ml RPMI-1640 szérummentes közegben (Sigma-Aldrich) 37 °C-on 30 percig emésztettük. Ezt követően a szuszpenziót négy réteg steril gézlapon szűrtük majd centrifugáltuk (10 perc, 800 rpm), a pelletet pedig 10 ml szérummentes RPMI-1640 médiumban vettük fel. Az élő/holt sejtek arányát tripánkék festéssel határoztuk meg. A máj áttétek kialakulását Reposal (70 mg/kg) altatásán lévő egerek 2×10^5 tumorsejt lépbe való oltásával értük el. A fent ismertetett kolonizációs (lép-máj) kísérletet vizsgálataink során májmetasztázis modellezésére használjuk, továbbiakban kolonizációs modellként tárgyaljuk.

A kolonizációs modellünkhöz összesen 30 db C57Bl/6 egeret használtunk (8. táblázat). Kontrollként a fentiekben is említett, azonos életkorú, azonos genetikai háttérrel rendelkező, kezeletlen állatokat használtuk. A hidradinamikus génbevitelt követően 3 nap múlva az egerek lépébe 2×10^5 c38 colorectális carcinoma sejteket oltottunk be. A kísérlet rövidtávú, 21 napos volt. Termináció során megmértük az állatok test- és májtömegét, illetve meghatároztuk a makroszkopikusan látható daganatok számát. A májminták további feldolgozása a fentiekben ismertetett módon történt. A kolonizációs modell metodikáját a 8. ábrában foglaltam össze.

8. táblázat A kolonizációs modellhez használt egércsoportok

Állatszám (db)	c38	Vektor
12	+	pLIVE-0
12	+	pLIVE-DCN
3	-	pLIVE-0
3	-	pLIVE-DCN



8. ábra Az állatkísérletek metodikájának sematikus ábrázolása

3.8. Statisztikai analízis

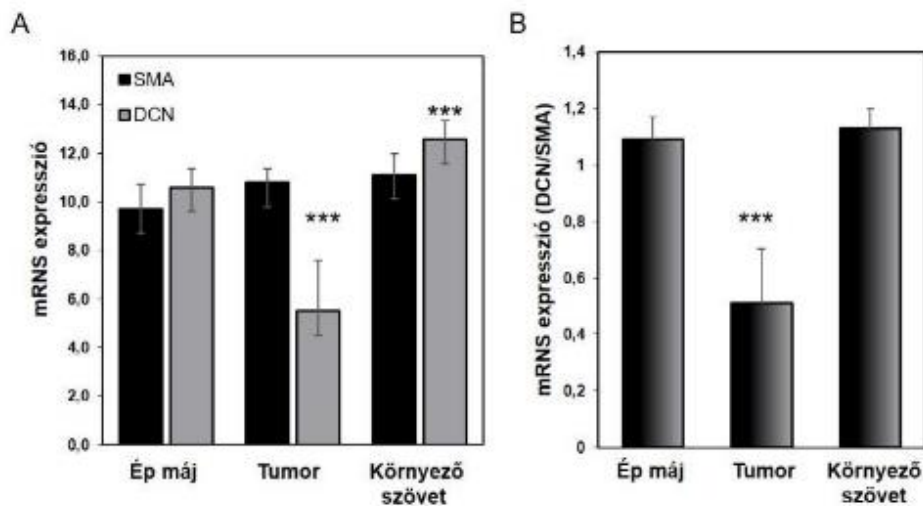
A kísérleteink során minden esetben legalább három, egymástól független biológiai párhuzamost végeztünk. A statisztikai elemzéseket Graphpad Prism 4.03 szoftver (Graphpad Software Inc. La Jolla, CA, USA) segítségével készítettük. Az adatok normál eloszlását a D'Agostino & Pearson omnibus teszt segítségével határoztuk meg. A csoportok közti változásokat az adatok eloszlásától függően nem parametrikus (Mann-Whitney) vagy Student-féle t-teszttel vizsgáltuk. A kontroll és a DCN-nal kezelt csoportok közötti tumorincidencia különbségeit és azok szignifikanciáját χ -négyzet próbával vizsgáltuk. Szignifikáns értékeknek a * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ határoztuk meg.

4. EREDMÉNYEK

4.1. HCC vizsgálatok

4.1.1. *In silico* humán HCC vizsgálatok

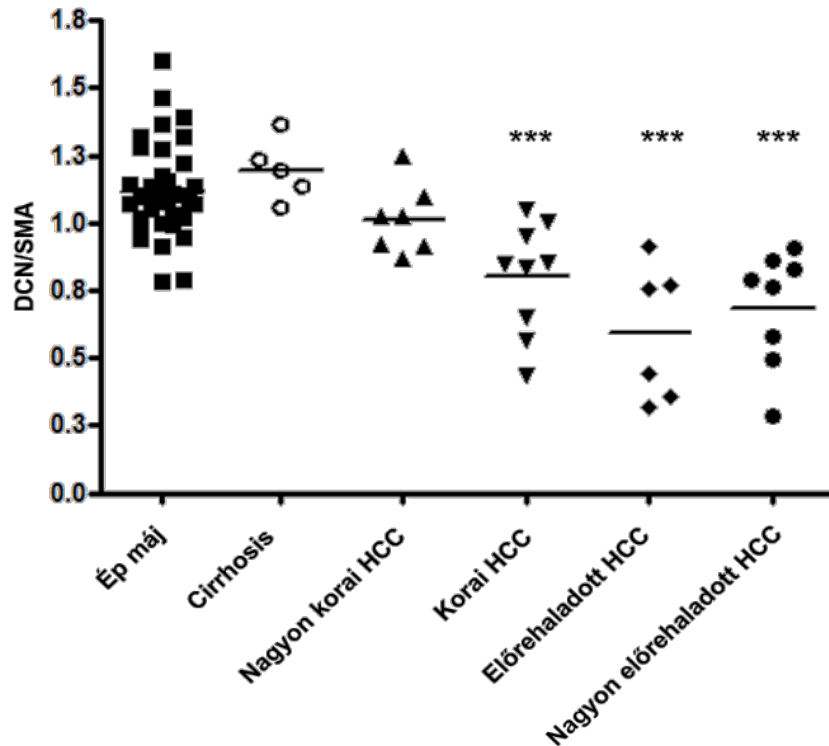
Az ArrayExpress adatbázis E-MTAB-950 kísérleti adataiból nyert vizsgálatok alapján a HCC-ban szignifikánsan csökkent a decorin mRNS expressziója a normál májmintákhoz, valamint a tumort környező szövethez képest ($p < 0,001$) (9.A ábra). Ugyanakkor a tumort környező kötőszövetben mérsékelt decorin mRNS növekedést figyeltünk meg az ép májhoz viszonyítva (9.A ábra). A decorin expresszió mellett vizsgáltuk a minták SMA mRNS mennyiségét is, így kiküszöbölve a decorin termelő csillagsejtek számának különbségéből adódó decorin mennyiségi változásokat. Az SMA jól tükrözi az aktivált csillagsejtek számát, melyek a decorin termelésének fő forrásai. A decorin SMA-ra vonatkoztatott relatív expressziója szignifikánsan csökkent a tumor mintákban, az ép májhoz és a tumort környező szövethez képest ($p < 0,001$) (9.B ábra).



9. ábra A decorin és az SMA génextpressziós változásai humán HCC esetekben az ArrayExpress E-MTAB-950 kísérleti értékei alapján. A decorin és SMA mRNS expressziós értékei normál, tumoros és tumort környező szövetekben (A), valamint a decorin SMA-ra vonatkoztatott relatív expressziója (B). A HCC-ben szignifikánsan alacsonyabb DCN/SMA mRNS expressziót mértünk, a normál mintához és a tumor környező szövethez képest. *** $p < 0,001$ $n_{normal}=36$, $n_{HCC}=112$

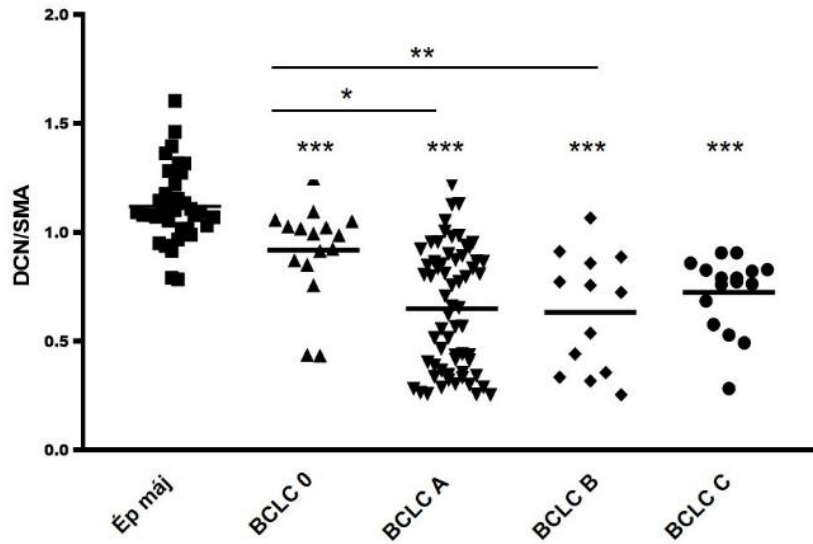
Számításaink kimutatták, hogy ez a különbség nem függ az aktivált csillagsejtek számától, ugyanis a decorin abszolút értéke és az SMA-ra vonatkoztatott relatív mennyisége egyaránt hasonló változást mutatott (9.A, B ábra). Ugyanakkor nem láttunk szignifikáns különbséget a decorin relatív expressziójában a normál és a nem tumoros környező szövet között (9.B ábra).

Vizsgáltuk azt is, hogy az adatbázisban fellelhető patológiai és klinikai adatok tükrében, hogyan változnak az általunk meghatározott DCN/SMA expressziós értékek. Vizsgálataink során cirrhotikus minták esetében emelkedett decorin expressziót tapasztaltunk az ép májmintához képest, de a változás nem volt szignifikáns (10. ábra). A HCC-k tekintetében azt láttuk, hogy minél előrehaladottabb a betegség, annál alacsonyabb volt a relatív decorin mRNS szintje. Az eltérés a nagyon korai HCC-k esetében még nem, de a korai, előrehaladott és nagyon előrehaladott stádiumok esetében szignifikánsnak bizonyult ($p < 0,001$) (10. ábra).



10. ábra A decorin relatív expressziója szignifikánsan csökken a betegség előrehaladottságának függvényében. *** $p < 0,001$

Vizsgáltuk a decorin viszonyát a barcelonai stádiumbeosztás összefüggésében is (BCLC=Barcelona Clinic Liver Cancer staging). A proteoglikán relatív expressziója a stádium előrehaladottságával szignifikánsan csökkent az ép májmintához viszonyítva ($p<0,5$, $p<0,01$, $p<0,001$) (11. ábra).



11. ábra A DCN/SMA expresszió szignifikánsan csökkent a HCC-ben a barcelonai stádium (BCLC) előrehaladottságával. * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$

4.1.2. Humán HCC TMA eredmények

A TMA mintákon decorin, SMA és EGFR immunhisztokémiai reakciókat végeztünk, valamint vizsgáltuk a fenti targetek mRNS szintű változásait is. A TMA blokk összeállításához használt biopsziás minták adatait és összesített értékeit a 2. és 9. táblázat tartalmazza.

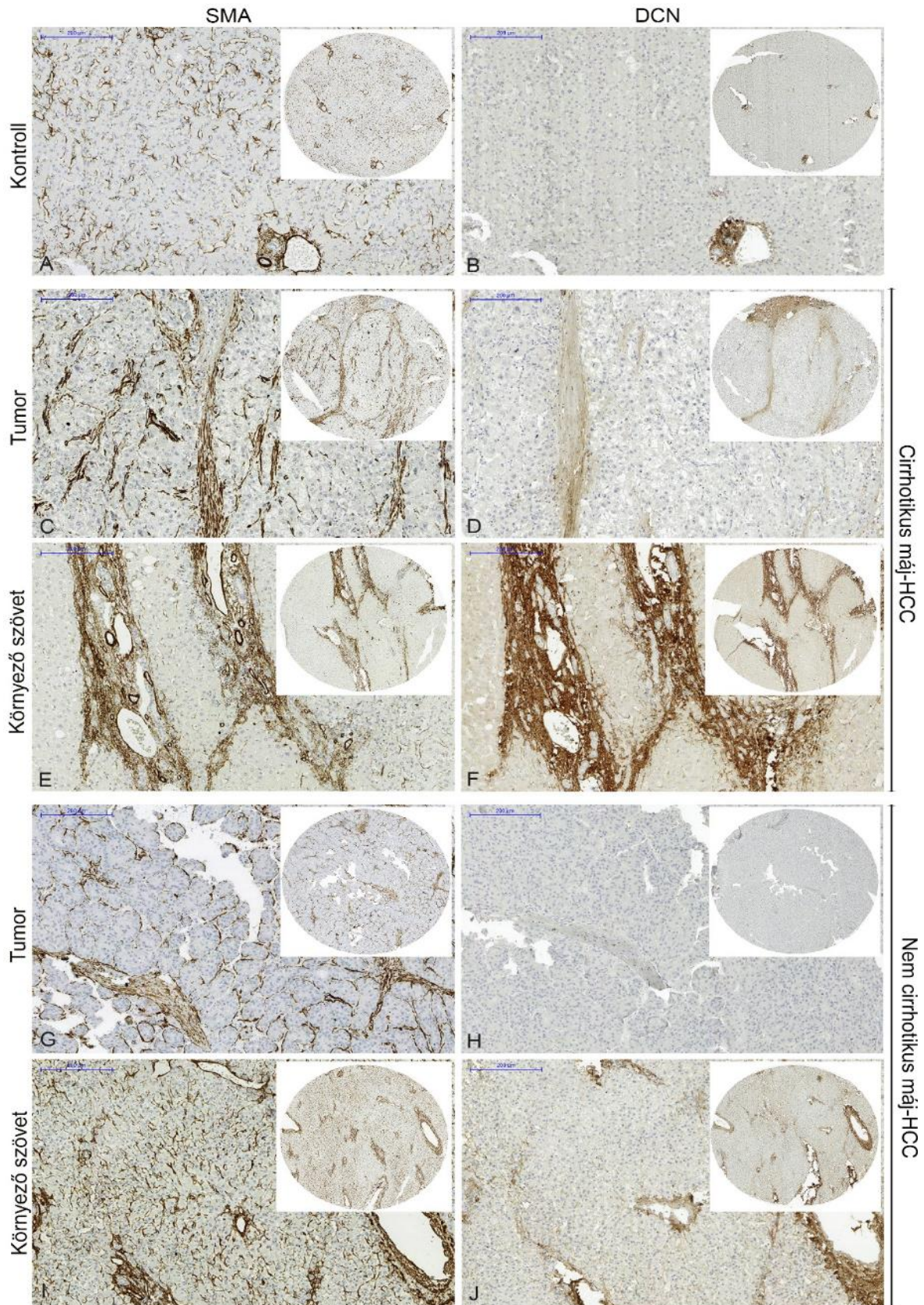
Normál körülmények között, az ép májszövetben a csillagsejtek alacsony mátrixfehérje termelő aktivitással rendelkeznek (12.A ábra). Az ép májban a decorin kis mennyiségben periportális kötőszövetben, a centrális vénák fala körül mutatható ki (12.B ábra).

A cirrhotikus és nem cirrhotikus májban kialakult HCC-ban peritumorálisan az aktivált csillagsejtek száma megnő elsősorban a kötőszövetes septumok mentén, ami SMA festéssel jól látható (12.E, I ábra). A tumor körüli szövetben, akár cirrhotikus, akár nem cirrhotikus

HCC minták esetén, magas SMA intenzitást (12.E, I ábra), valamint ezzel együtt magas decorin expressziót detektáltunk (12.F, J ábra). Összehasonlítva az ugyanazon májból származó tumoros és környező szöveti mintákat azt láthatjuk, hogy mind a cirrhotikus, mind pedig nem cirrhotikus májban kialakult HCC esetében a tumorban és a környező szövetben bár a csillagsejtek nagy számban jelen vannak (12.C, E, G, I ábra), de a tumorban a decorin jelintenzitása gyenge, expressziója szignifikánsan alacsonyabb (12.D, H ábra), mint a környező szövetben ($p < 0,05$, $p < 0,001$) (12.F, J; 13.A, B).

A decorin expresszióról pontosabb képet kapunk, amennyiben a proteoglikán mennyiségét normalizáljuk a SMA intenzitás értékével. A 13. ábra az immunhisztokémiai eredmények összesített kiértékelését mutatja. Érdekes megfigyelésünk, hogy akár cirrhosis, akár nem cirrhosis talaján kialakult HCC esetében a tumort körülvevő parenchima aktivált csillagsejtjei (12.E, I ábra) magas decorin expressziót mutatnak (12.F, J ábra 13.A, B ábra), ezzel szemben a tumorban szintén nagy számban jelenlévő csillagsejtek (12.C, G ábra) decorin termelése jelentősen lecsökken (12.D, H ábra). Tehát a decorin mennyiségének csökkenése a tumorban nem a csillagsejtek számának változásaiból ered (13.B ábra).

Összhangban a fehérje szintű vizsgálattal, hasonló tendenciát figyelhettünk meg mRNS szinten is. A tumort környező szövetben a proteoglikán relatív expressziója jelentős mértékű, mind a tumor strómához, mind pedig az ép májhoz viszonyítva (13.C ábra). Mindez arra enged következtetni, hogy a gátlás már transzkripciós szinten megtörténik.



Cirrhotikus máj-HCC

Nem cirrhotikus máj-HCC

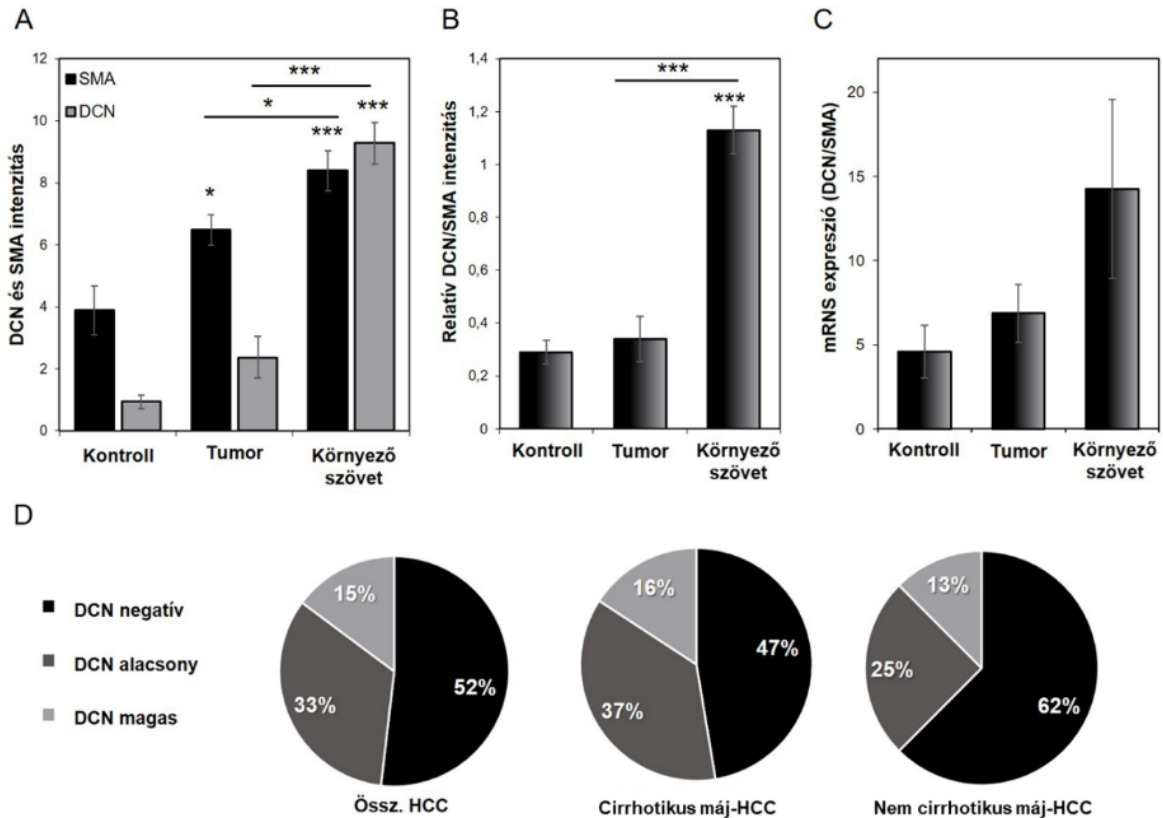
12. ábra A decorin és az SMA immunhisztokémiai analízise ép májban (A, B), cirrhosis talaján kialakult HCC-ben (C, D, E, F), valamint nem cirrhotikus májban kialakult HCC (G, H, I, J) esetén. Minden képpár (A-B, C-D, E-F, G-H, I-J) ugyanazon minták azonos részletét ábrázolják. A HCC-s minták esetében tumoros és tumort körülvevő (környező cirrhotikus és nem cirrhotikus parenchima) szöveteket gyűjtöttünk. Az ép májban a csillagsejtek alacsony decorin termelő aktivitással rendelkeznek, melyet a barna csapadék mutat (A, B). A kontroll májban a decorin a periportális kötőszövetben kis mennyiségben van jelen (B). Érdekes megfigyelésünk, hogy akár cirrhotikus vagy nem cirrhotikus májban kialakult HCC-ben a nagy számban jelenlévő aktivált csillagsejtek (C, G) alacsony decorin expresszióval rendelkeznek (D, H), ezzel szemben a tumort körülvevő parenchima szintén nagy számban jelenlévő aktivált csillagsejtjei (E, I) magas decorin expressziót mutatnak (F, J). Lépték 200 μ m.

Az egyes minták decorin és az SMA jelintenzitását 12-es score-rendszer használatával számszerűsítettük, Panoramic Viewer szoftver segítségével, ezek értékeit a 9. táblázatban összesítettük, és a 13. ábra kördiagrammjaiban szemléltettük. A tumoros mintákat a rájuk jellemző számértékek alapján három csoportba soroltuk: decorint nem expresszáló (score-érték: 0), decorint alacsony mértékben expresszáló (score-érték: 1-6), decorint magasan expresszáló (score érték: 7-12) HCC-k. A csoportosítást elvégeztük külön a cirrhotikus májban kialakult HCC minták és a nem cirrhotikus májban kialakult HCC minták között, valamint úgy is, hogy nem vettük figyelembe a környező májparenchima állapotát.

A cirrhotikus májban kialakult HCC-ban az esetek jelentős része a decorint nem expresszáló csoportot erősítette (47%), kismértékű proteoglikán termelés a minták 37%-a mutatott és 16%-ban magas expressziót detektáltunk (13. ábra). Hasonló megoszlást láthattunk a nem cirrhotikus májban kialakuló minták esetében is, legnagyobb arányban itt is a decorint nem expresszáló tumorok vannak (62%) (13. ábra). A minták negyedében látható alacsony mértékű decorin expresszió (25%), magas decorin expressziót a minták 13% mutat (13. ábra). Összevetve a cirrhotikus és nem cirrhotikus májban kialakult tumoros eseteket, a minták több mint felében negatív decorin expressziót azonosítottunk (52%), 33%-ban volt kismértékű decorin intenzitás és az esetek csupán 15%-a mutatott magas proteoglikán intenzitást (13. ábra). A decorin tumorszupresszor szerepét feltételezve a májban érthető,

hogyan expressziója a tumoros szövetben hiányzik vagy alacsony mértékű. Ezt a tendenciát tapasztaltuk az előbbieken ismertett csoportosítás során is.

Mind a cirrhotikus, és a nem cirrhotikus májban kialakult HCC-k esetében a minták 16, illetve 13%-ában magas decorin expressziót detektáltunk. Elképzelhető, hogy ezekben a mintákban a decorin valamilyen „mutált”, módosult változata van jelen, mely a daganat számára már előnyös.



13. ábra Összesítve a cirrhotikus és nem cirrhotikus májban kialakult HCC-k immunhisztokémiai eredményeik kiértékelését mutatják a diagrammok. Az SMA és a decorin expresszió megoszlása az összesített cirrhotikus és nem cirrhotikus májban kialakult HCC mintákban (A). Ugyanezen minták decorin SMA-ra vonatkoztatott relatív expressziója fehérje és mRNS szinten (B,C). Alacsony decorin expresszió mérhető a tumorban, mely nem a csillagesetek számának különbségéből ered. A decorin expresszió megoszlása a HCC-s mintákban (D). A decorin intenzitás jellemzésére 12-es score-rendszert használtunk. A score rendszer alapján decorin negatív (0), alacsony (1-6) és magas (7-12) decorin expressziós

csoportokat határoztunk meg Az értékelést elvégeztük külön a cirrhosis talaján kialakult HCC-ban, külön a nem cirrhotikus májban kialakult HCC-ban, valamint összesítve a két csoportot is (D). * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ $n_{\text{normal}}=9$; $n_{\text{HCC}}=28$

9. táblázat A TMA blokk összeállításához felhasznált biopsziás minták összesített score értékei (NAT= non-adjacent tissue=tumor környező szövet, SCN= decorin, SMA= α -simaizom actin, ID=azonosító)

Beteg ID	Szövet	Decorin score	SMA score	DCN/SMA intenzitás	Kategória
Cirrhosis talaján kialakult HCC					
01	Tumor	1,5	1	1,5	DCN alacsony
01	NAT	8	6	1,3	
02	Tumor	0	2	0,0	DCN negatív
02	NAT	11	8	1,4	
03	Tumor	0	4	0,0	DCN negatív
03	NAT	11	9,5	1,2	
04	Tumor	0	9	0,0	DCN negatív
04	NAT	9,5	7,5	1,3	
05	Tumor	0	4	0,0	DCN negatív
05	NAT	11,5	10	1,2	
06	Tumor	1,5	8,5	0,2	DCN alacsony
06	NAT	12	11,5	1,0	
07	Tumor	0	4	0,0	DCN negatív
07	NAT	10,5	10	1,1	
08	Tumor	2	1,5	1,3	DCN alacsony
08	NAT	12	12	1,0	
09	Tumor	1	4,5	0,2	DCN alacsony
09	NAT	11,5	7	1,6	
10	Tumor	5	11,5	0,4	DCN alacsony
10	NAT	11,5	12	1,0	
11	Tumor	1,5	4,5	0,3	DCN alacsony
11	NAT	3,5	7,5	0,5	
12	Tumor	11,5	8,5	1,4	DCN magas
12	NAT	11,5	9	1,3	
13	Tumor	0	5,5	0,0	DCN negatív
13	NAT	12	8	1,5	
14	Tumor	3,5	9,5	0,4	DCN alacsony
14	NAT	11,5	9	1,3	
15	Tumor	0	4,5	0,0	DCN negatív
15	NAT	3	6	0,5	
16	Tumor	11,5	12	1,0	DCN magas

16	NAT	11	8	1,4	
17	Tumor	0	7	0,0	DCN negatív
17	NAT	11,5	8	1,4	
18	Tumor	7	12	0,6	DCN magas
18	NAT	12	12	1,0	
19	Tumor	0	4	0,0	DCN negatív
19	NAT	12	5	2,4	
Nem cirrhotikus májban kialakult HCC					
20	Tumor	5	12	0,4	DCN alacsony
20	NAT	1	1,5	0,7	
21	Tumor	0	4	0,0	DCN negatív
21	NAT	11	7	1,6	
22	Tumor	0	11,5	0,0	DCN negatív
22	NAT	1	1,5	0,7	
23	Tumor	7	9,5	0,7	DCN magas
23	NAT	7	12	0,6	
24	Tumor	0	5	0,0	DCN negatív
24	NAT	5,5	12	0,5	
25	Tumor	0	9	0,0	DCN negatív
25	NAT	6,5	7,5	0,9	
26	Tumor	1	9,5	0,1	DCN alacsony
26	NAT	9	8,5	1,1	
27	Tumor	0	4	0,0	DCN negatív
27	NAT	12	7,5	1,6	
28	Tumor	0	4,5	0,0	DCN negatív
28	NAT	2	4,5	0,4	
Kontroll minták					
29	Kontroll	0,5	7,5	0,1	
30	Kontroll	0,5	1,5	0,3	
31	Kontroll	0,5	2,5	0,2	
32	Kontroll	1	3,5	0,3	
33	Kontroll	1	6,5	0,2	
34	Kontroll	2,5	6,5	0,4	
35	Kontroll	1	3,5	0,3	
36	Kontroll	0,5	1	0,5	
37	Kontroll	1	2,5	0,4	

Ezt követően kíváncsiak voltunk, hogy az EGFR, mint a decorin egyik potenciális célpontja milyen expressziót mutat a humán HCC eseteinkben. Az immunvizsgálatok alapján azt látjuk, hogy a decorin az EGFR szintjével ellentétesen mozog (14. ábra). Az EGFR megoszlását vizsgálva magas expressziót detektáltunk a tumorban, ezzel szemben a nem

tumoros környező szövetben intenzitása minimális volt. Ugyanezen szöveti mintán a decorin megoszlását vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a tumorban jelintenzitása alacsony, valamint a kötőszövetben is minimális volt, szemben a nem tumoros környező szövettel, ahol a kötőszövetben abundáns decorin expressziót mértünk.

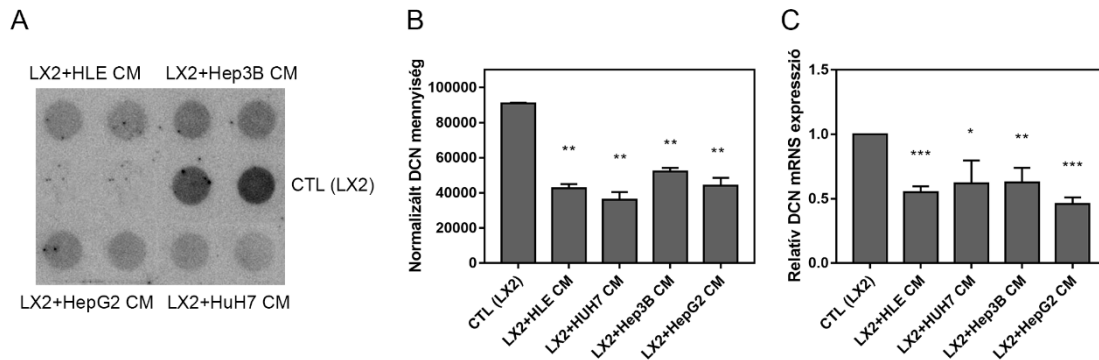


14. ábra Humán HCC szöveti minta decorin és EGFR immunhisztokémiai képe (A), valamint annak reprezentatív kiértékelése (B). A decorin intenzitása az EGFR szintjével ellentétesen mozog. Az „A” ábrán ugyanaz a szöveti core EGFR és decorin immunfestését láthatjuk. A core felső része a tumort jelöli, mely EGFR immunfestéssel pozitív reakciót adott, melyet a DAB barna csapadék jelez. A core alsó része nem tumoros környező szövet, mely EGFR negatív immunreakciót mutat. Decorin festéssel, ugyanez a szöveti core tumorban negatív, a tumor stromában pedig minimális immunpozitivitást mutatott, ezzel szemben a nem tumoros környező szövetben abundáns decorin festődést láthatunk. Lépték 500 μ m. *** $p < 0.001$

4.1.3. *In vitro* kísérleti rendszer

Az *in silico*, illetve a TMA megfigyeléseink alapján arra következtettünk, hogy a tumorban a decorin expresszió csökkenése nem függ a csillagsejtek számától. Ezért kíváncsiak voltunk, hogy a daganatsejtek közvetlenül fejtik-e ki a gátló hatásukat a csillagsejtek decorin termelésére. Ennek bizonyítására olyan kísérletes rendszert hoztunk létre, melyben LX2 humán csillagsejt vonalat HLE, HepG2, Hep3B, HuH7 sejtek kondicionált médiumában növesztettük. Az LX2 sejtek által termelt decorin mennyisége szignifikánsan csökkent a HepG2, HuH7, HLE humán hepatoma sejtvonalak kondicionált médiumának jelenlétében ($p < 0,05$) (15.A, B ábra), a Hep3B sejtek esetében a csökkenés nem

bizonyult statisztikailag szignifikánsnak. A proteoglikán mRNS expressziójában szintén csökkenést figyelhettünk meg a 4 sejtvonal esetén, azonban szignifikáns csökkenést csupán a HepG2 és HuH7 sejtek esetében tapasztaltunk ($p < 0,05$) (15.C ábra). Ezek az eredmények jól korrelálnak a humán HCC mintákon kapott megfigyeléseinkkel, jelezve, hogy a tumorsejtek gátolják a decorin expresszióját, és a decorin tumorszupresszor hatására utalnak.



15. ábra Decorin expresszió mennyiségi változása LX2 sejtek médiumában dot blot analízis segítségével (A), valamint annak denzitometrált kiértékelése (B). Decorin változása mRNS szinten (C). Az LX2 csillagsejtek decorin expressziója csökkent a különböző hepatoma sejtek (Hep3B, HepG2, HLE, HuH7) kondicionált médiumának jelenlétében. CM= kondicionált médium * $p < 0,05$

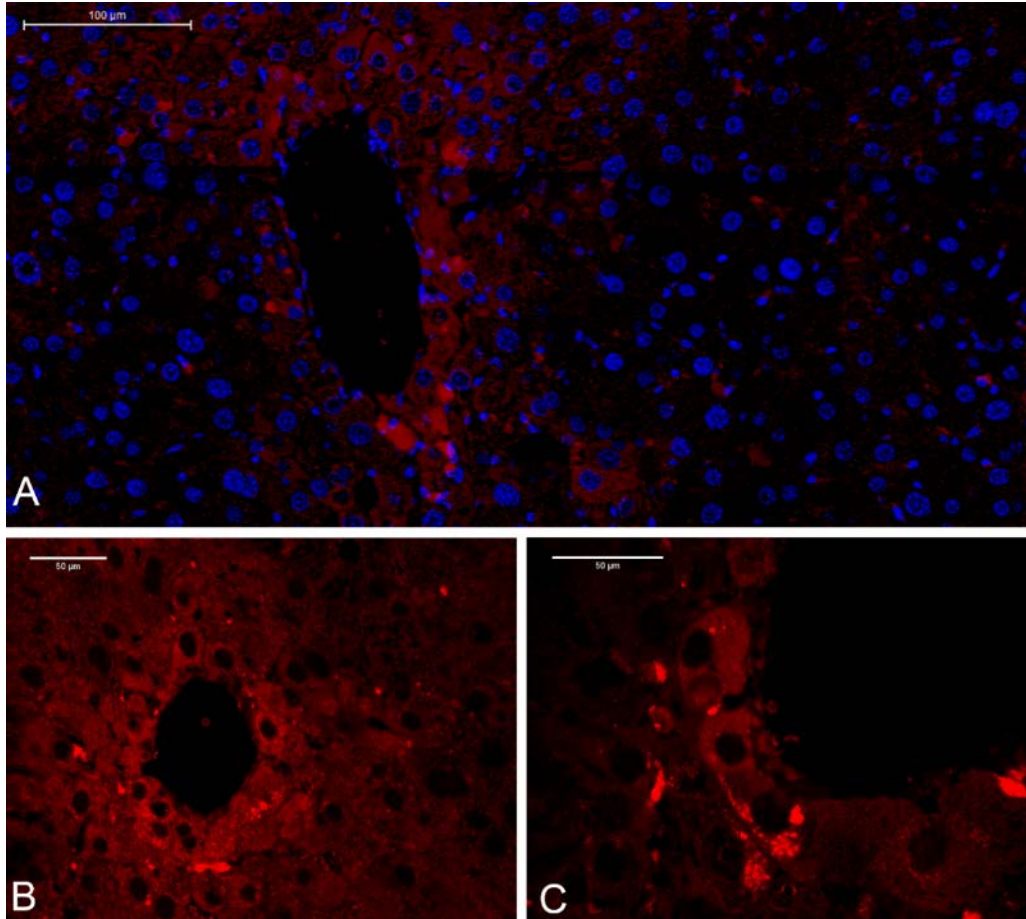
4.1.4. *In vivo* primer hepatocarcinogenesis modell decorint túltermelő májban

Munkacsoportunk korábbi vizsgálatai kimutatták, hogy a DCN^{-/-} egerekben a fibrogenesis mellett a hepatocarcinogenesis is fokozott. E kísérleti rendszerben a DCN^{-/-} és vad típusú állatokat kétféle hepatocarcinogénnel, TAA-dal, illetve DEN-nal kezelték. A DCN^{-/-} egerekben a HCC kialakulása mindkét kísérleti rendszerben fokozott volt a vad típusú csoporthoz képest (57, 106).

Ezen kísérleteinkre alapozva, olyan *in vivo* modell rendszert hozunk létre, melyben a decorint túltermelő egerek májában vizsgáljuk a primer hepatocarcinogenesis folyamatát. Kísérleteinkhez vad típusú C57Bl/6 egértörzset használtuk. *In vivo* munkánk során az egerekből kétféle csoportot hoztunk létre: a pLIVE-üres vektorral transzfektált: kontroll (pLIVE-SEAP+pLIVE-0), valamint a pLIVE-decorin plazmiddal transzfektált: kezelt (pLIVE-SEAP+pLIVE-DCN) csoportot (8. ábra).

4.1.4.1. Humán decorin expressziója a májban

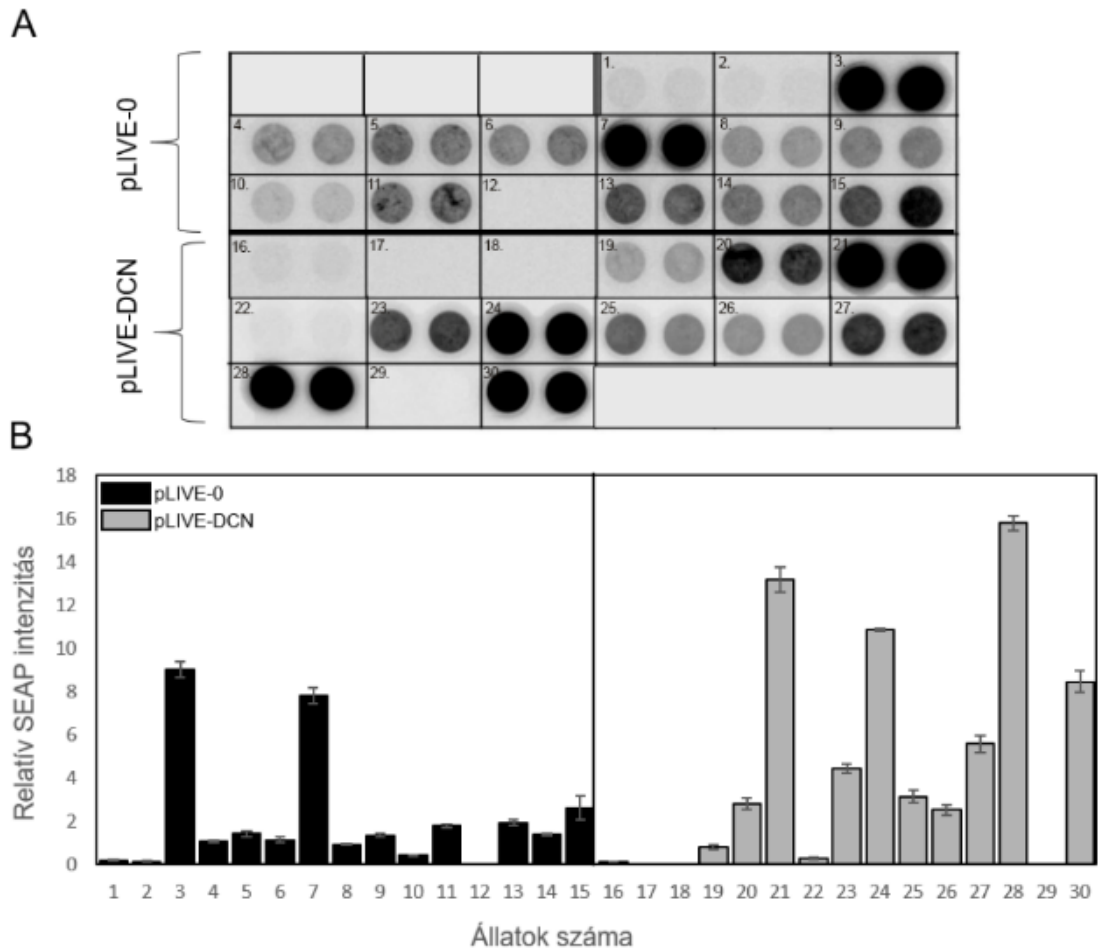
Fluoreszcens festéssel megvizsgáltuk a transzfekcióval bejuttatott humán decorin lokalizációját. A kontroll egerek májában (pLIVE-0) humán decorin festéssel teljesen negatív reakciót kaptunk. A decorin transzfektált TAA kezelt mintákban a bejuttatott decorin különösen a centrális vénák körüli hepatocyták citoplazmájában van jelen (16.A, B, C ábra).



16. ábra A humán decorin lokalizációja a májban hidrodinamikus génbevitelt követően a pLIVE-DCN transzfektált, TAA kezelt egerek májában, mely a centrális vénák körüli hepatocytákban figyelhetjük meg (A,B, C). A „B” és „C” ábra ugyanaz a pLIVE-DCN egér minta humán decorin festését mutatja, különböző nagyításokban. Piros: decorin, Kék: DAPI (sejtmagok) Lépték: A-100 µm; B, C-50 µm.

4.1.4.2. Transzfekció sikerességének ellenőrzése

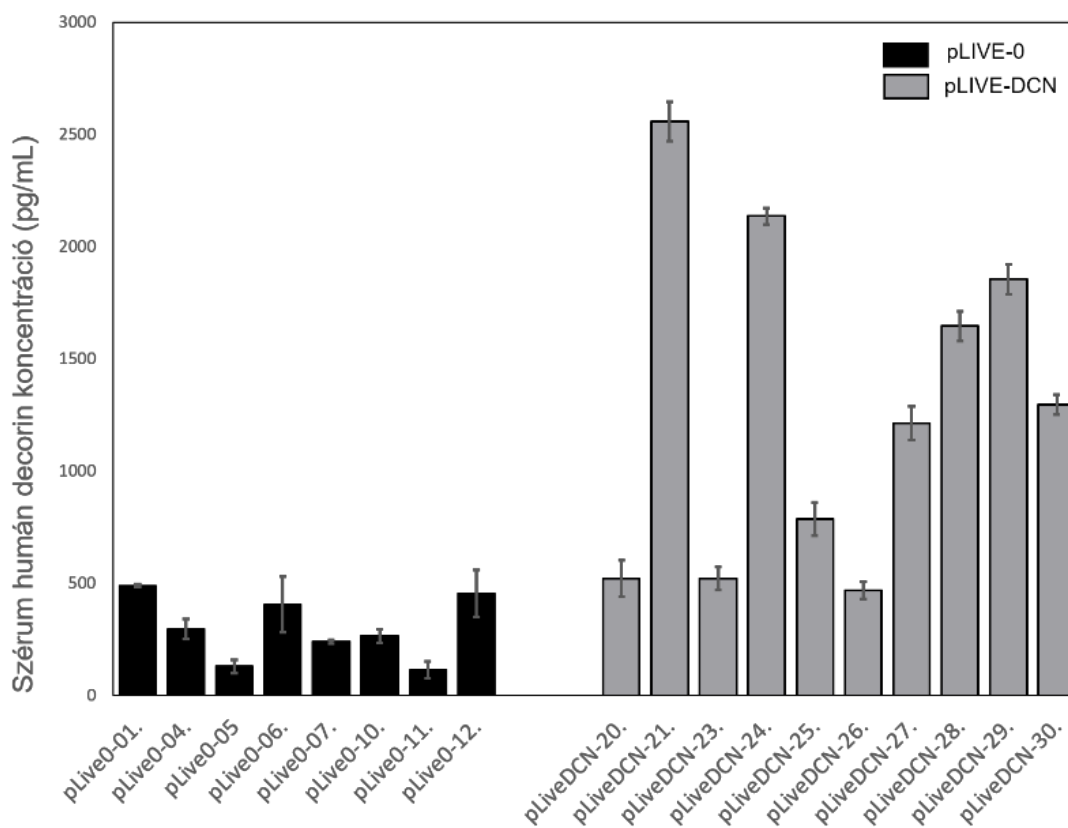
A bejuttatott pLIVE-SEAP kontroll vektorként szolgált, mely közvetett információt szolgáltat a transzfekció sikerességéről, ugyanis az általa kifejeződő alkalikus foszfatáz, kemilumineszcens assay segítségével egyszerűen detektálható az állatok véréből. A 17. „A” ábrán a pLIVE-0, illetve pLIVE-DCN transzfektált, TAA kezelt, öt hónapos egerek szérumból mért kemilumineszcens eredményeket, valamint annak denzitometrált kiértékelését láthatjuk (17.B ábra). Vizsgálataink alapján azt mondhatjuk, hogy a transzfekció sikeres volt, a SEAP vektor aktivitása magas expressziót mutatott az állatok többségében, nagyon alacsony SEAP intenzitást csupán 3 kontroll (pLIVE-0), valamint 4 decorin kezelt (pLIVE-DCN) mintában találtunk (17. ábra). A SEAP szint meghatározása az öt hónapos egerek szérumból történt. A pLIVE-DCN csoportok magasabb SEAP aktivitása abból adódhat, hogy a decorin mennyisége összefügghet az érfalak átjárhatóságával, melyet korábbi kísérleteink alapján is valószínűsíthetünk. Minél alacsonyabb a decorin szint, annál kevésbé átjárható az érfal. Erre ugyan semmilyen irodalmi adat nincs, de előkísérleti rendszerünkben DCN^{-/-} egerekben a hidrodinamikus génbevittel bejuttatott SEAP vektorok aktivitása még a jelen kutatásban bemutatott pLIVE-0 csoporttól is alacsonyabb volt.



17. ábra A SEAP kemilumineszcens assay eredménye (A) és annak denzitométrált kiértékelése (B) az ötödik hónapban vett pLIVE-0 és pLIVE-DCN ranszfektált, TAA kezelt állatok szérumból. A SEAP aktivitása a transzfeccióval bejutatott pLIVE-SEAP vektorok aktivitását mutatja, mellyel a transzfecció sikerességét támasztjuk alá. n=30

Az alkalikus foszfatáz értékek alapján kiválasztottuk a nagyobb aktivitást mutató állatokat, melyekben decorin ELISA segítségével meghatároztuk a vérben keringő humán decorin koncentrációját (18. ábra). A szérumban mért humán decorin koncentráció jó egyezést mutatott az alkalikus foszfatáz aktivitás értékekkel, valamint a kontroll csoporthoz képest a proteoglikán koncentrációja magasabb volt azokban az állatokban, melyekbe humán decorin vektort juttatunk be, ezzel is alátámasztva a géntranszfer sikerességét. A kontroll

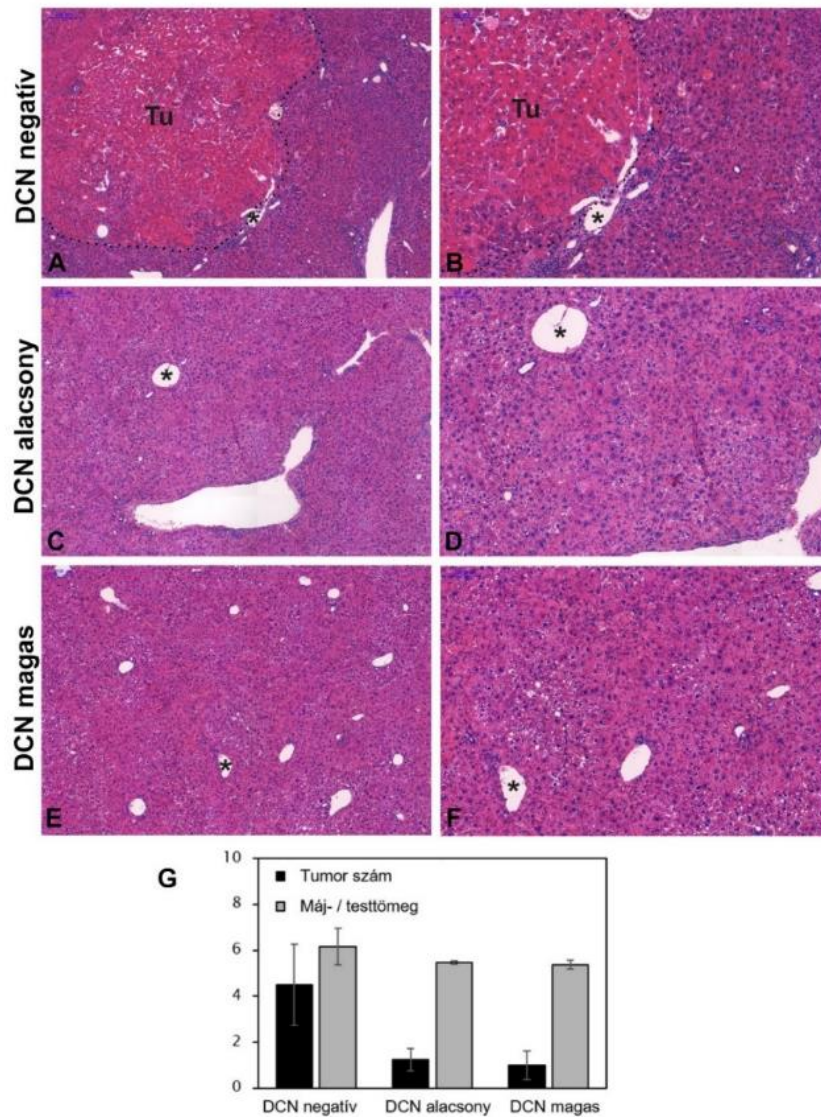
(pLIVE-0) csoportokban mért alacsony szérumban humán decorin szint (<500 pg/ml) az ELISA Assay egér endogén decorinnal való keresztreakciójának tudható be.



18. ábra Az ELISA-val meghatározott humán decorin mennyisége az ötödik hónapban vett állatok szérumban. Magas decorin koncentrációt mértünk a pLIVE-DCN transzfektált, TAA kezelt csoportokban, az x-tengely az állatok számát mutatja.

4.1.4.3. Decorin hatékonysága a primer hepatocarcinogenesis modellben

A SEAP intenzitás változatos eloszlását kiküszöbölve a decorinnal transzfektált, TAA kezelt állatok csoportjait három alcsoportra osztottuk a vektor intenzitása alapján. Megkülönböztettünk decorin negatív (19.A, B ábra), alacsony decorin expressziós (19.C, D ábra), és a vektort magas aktivitással expresszáló csoportokat (19.E, F ábra). A további molekuláris vizsgálatokhoz kontrollként (pLIVE-0) a decorin negatív állatok poolozott mintáit használtuk, pLIVE-DCN csoportot pedig a decorint alacsony és magas mértékben expresszáló egerek poolozott mintáiból gyűjtöttük.



19. ábra A primer hepatocarcinogenesisből származó egér májak decorin negatív (A, B), alacsony decorin expressziós (C, D) és magas aktivitással (E, F) rendelkező csoportjainak reprezentatív hematoxilin-eozin képei és azok statisztikai kiértékelése (G). A humán decorint expresszáló egerek májában (DCN alacsony, DCN magas) TAA kezelést követően kevesebb tumorszámot detektáltunk, valamint alacsonyabb máj-/testtömeg arány volt mérhető a decorin negatív csoportokkal szemben. A szaggatott vonal a tumor határt mutatja. Minden képpár (A-B, C-D, E-F) ugyanazon minta különböző nagyítású képei, a csillag pedig a minták azonos részletét ábrázolják. Tu= tumor. Lépték: A, C, E=200 μm; B, D, F=100 μm; n = 15

A korábbi vizsgálatainkhoz hasonlóan a TAA kezelés fibrosist, majd a májsejtek hiperregenerációja következtében HCC-t indukált az egerek májában. A humán decorint nem expresszáló májak kötőszövetes tokkal körülvett daganatos göbjeiben a citoplazma mennyiségének emelkedését figyelhettük meg, erős eosinophil festődéssel (19.A, B ábra). TAA kezelés hatására a legtöbb daganatot azoknál az állatoknál figyelhettünk meg, melyek májában nem fejeződött ki az humán decorin (19.G ábra). Ugyanakkor a humán decorint expresszáló csoportokban a tumorszám jelentősen csökkent (72%, 78%) (19.G ábra), függetlenül attól, hogy milyen mértékben fejeződött ki a proteoglikán, és kis mennyiségű decorinnak is megfigyelhettük a tumorgátló hatását.

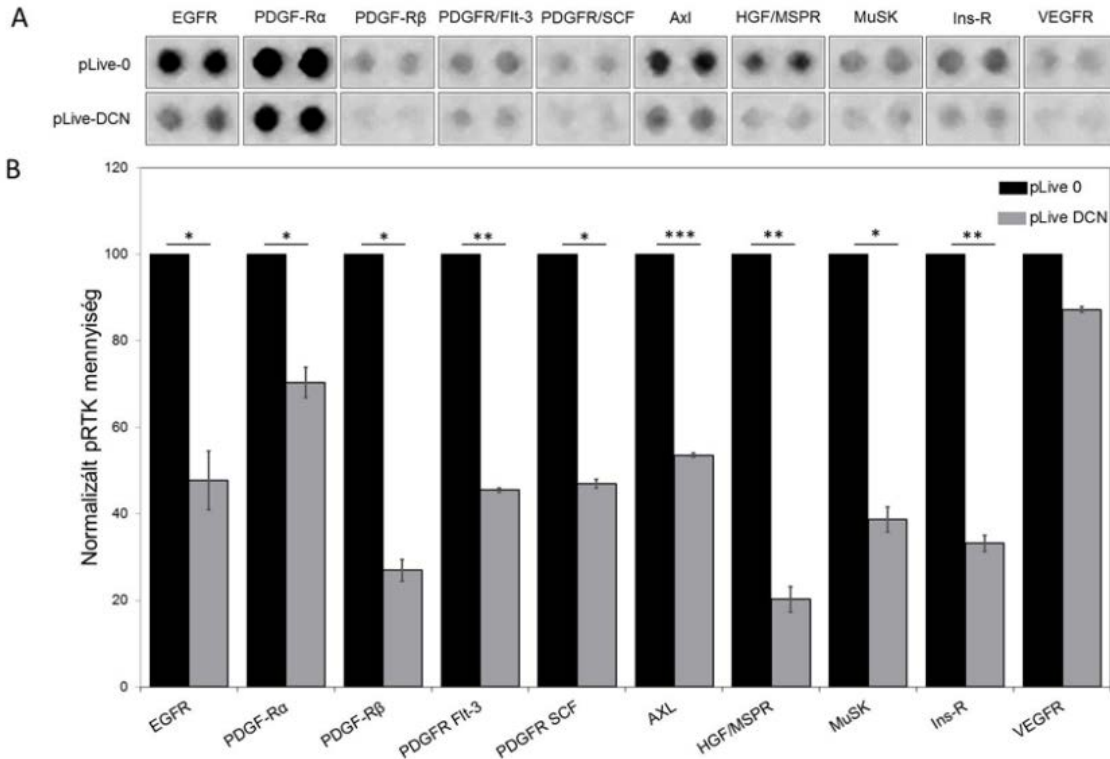
A decorint expresszáló csoportok alacsonyabb máj-/testtömeg-arányai is alátámasztják a decorin jótékony hatásást. Ezen eredmények alapján feltételezzük, hogy a decorin génbevitel gátolja a HCC kialakulását, mutatva, hogy a proteoglikán szolubilis formában tumorszuppresszorként működhet.

4.1.4.4. A decorin hatására bekövetkező jelátviteli változások hepatocarcinogenesis modellben

A decorin okozta növekedés gátlás a legtöbb tumor esetében a RTK-ok gátlásán keresztül valósul meg. Kísérleti rendszerünkben számos phospho-RTK aktivitást vizsgáltuk. Megfigyeltük, hogy a decorin (pLIVE-DCN) transzfekciót követően, a TAA kezelt egerekben szignifikánsan csökkent az EGFR, PDGFR α , PDGFR β , PDGFR/Flt-3, PDGFR/SCF, AXL, HGF/MSPR, MuSK és az inzulin receptor aktivitása a pLIVE-0 csoporthoz képest (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001) (20. ábra). Számszerűen, 52%, 30%, 73%, 54%, 53%, 46%, 79%, 61%, 66%, 12%-os gátlást tapasztaltunk az egyes receptorokban a decorin transzfekció hatására (20. ábra).

Ezt követően olyan daganat-specifikus jelátviteli utak azonosítása volt a célunk, melyek rávilágíthatnak a decorin tumorszuppresszor hatásának mechanizmusára. Ennek érdekében 43 targetre specifikus Phospho-Kinase Arrayt használtam, aminek eredményeit a 10. táblázatban és 23. ábrán összegeztem. Western blot analízissel megerősítettük, hogy a decorin transzfektált, TAA kezelt állatokban csökkent a pEGFR szintje a pLIVE-0 csoporthoz képest, a változás statisztikailag szignifikánsnak bizonyult (p <0,001) (21.A, B

ábra). A decorin transzfektált, TAA kezelt állatokban párhuzamosan a RTK-ok aktivációs állapotának csökkenésével, 12%-os ERK1/2 aktivitás csökkenést figyeltünk meg a kontroll csoportokhoz képest (pLIVE-0) (10. táblázat, 23. ábra).



20. ábra Reprezentatív kép a Phospho-RTK Array analiziséről (A) és annak denzitometrált kiértékelése (B), pLIVE-0, valamint decorinnal (pLIVE-DCN) transzfektált TAA kezelt egerekben. Szignifikánsan csökkent az EGFR, PDGFR α , PDGFR β , PDGFR/Fit-3, PDGFR/SCF, AXL, HGF/MSPR, MuSK és az Inzulin receptor aktivitása decorin transzfekció hatására a kontroll csoportokkal szemben. *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001

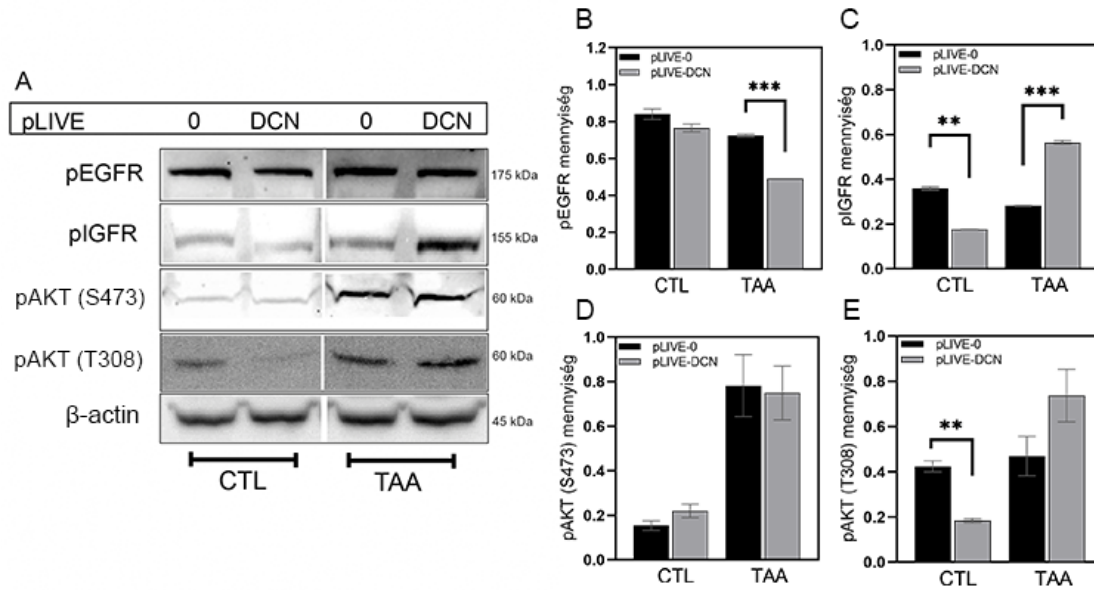
A foszforilált IGF-1R expressziója nem változott carcinogen hatására a pLIVE-0 állatokban (21.A, C ábra). Azonban, ugyanez a RTK aktivitása 2x emelkedést mutatott a TAA kezelt, decorin overexpresszált csoportokban (21.A, C ábra).

Kíváncsiak voltunk, hogy az Akt, mint az IGF-1R receptor ismert downstream effektorának aktivitása hogyan változik a mi kísérleti rendszerünkben. A CTL (kontroll) mintákban minimális mennyiségű foszfo-Akt (S473) volt detektálható (21.A, D ábra). TAA

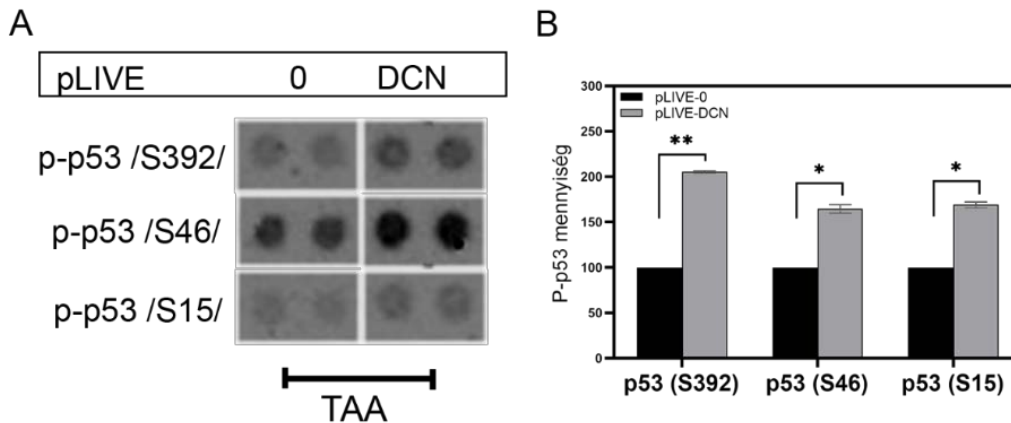
expozíció hatására emelkedett foszfo-Akt (S473) aktivitást figyelhattunk meg, de a pLIVE-0 és decorin transzfektált csoportok értékei nem különböztek szignifikánsan (21.A, D ábra). A pAkt (T308) változása követi az IGFR-ét, 35%-os emelkedést mértünk a pLIVE-DCN transzfektált, TAA kezelt egerek csoportjaiban, a pLIVE-0 mintákhoz képest (10. táblázat, 23. ábra). Az Akt megnövekedett aktivitása révén az mTOR útvonal is fokozódott, melyre a foszfo-p70S6K fehérjék emelkedett mennyisége utal, a decorin transzfektált, TAA kezelt csoportokban. Továbbá, a GSK3 és WNK1 foszfo-fehérjék magasabb szintje szintén az Akt aktivitás következménye. Ehhez kapcsolódóan, a PDK1 által foszforilált RSK1/2/3 fehérjék mennyisége 30%-kal emelkedett. Az RSK kináz aktivitásának köszönhetően a foszfo-p27^{KIP1} ciklin dependens kináz inhibitor mennyisége szignifikáns emelkedést mutatott decorin transzfekció hatására a TAA kezelt állatokban: 48%-os emelkedést tapasztaltunk, a pLIVE-0 csoporthoz képest ($p < 0,05$) (10. táblázat). A megnövekedett PLC γ és PYK2 szintén a fokozott RTK aktivitásra utal.

TAA kezelés esetén a foszfo-p53(S392), a foszfo-p53(S46) és a foszfo-p53(S15) fehérjék expressziója 2x, 1,6x-os és 1,7-es emelkedést mutattak a decorin kezelés hatására a pLIVE-0 májakkal szemben ($p < 0,05$; $p < 0,01$) (22.A, B ábra). A p53 magasabb szintje arra utal, hogy a decorin a sejtciklust a G1 fázisban megállítja.

A proteoglikán hatására emelkedett pAMPK, c-Jun, eNOS szintetek mértünk a pLIVE-0 csoporttal szemben, illetve a STAT fehérjék aktivitása is fokozódott a decorin transzfekció hatására. Ezzel szemben a JNK, a p38, a HSP27, az Fgr, valamint a β -catenin mennyisége csökkent a decorin transzfekció hatására.

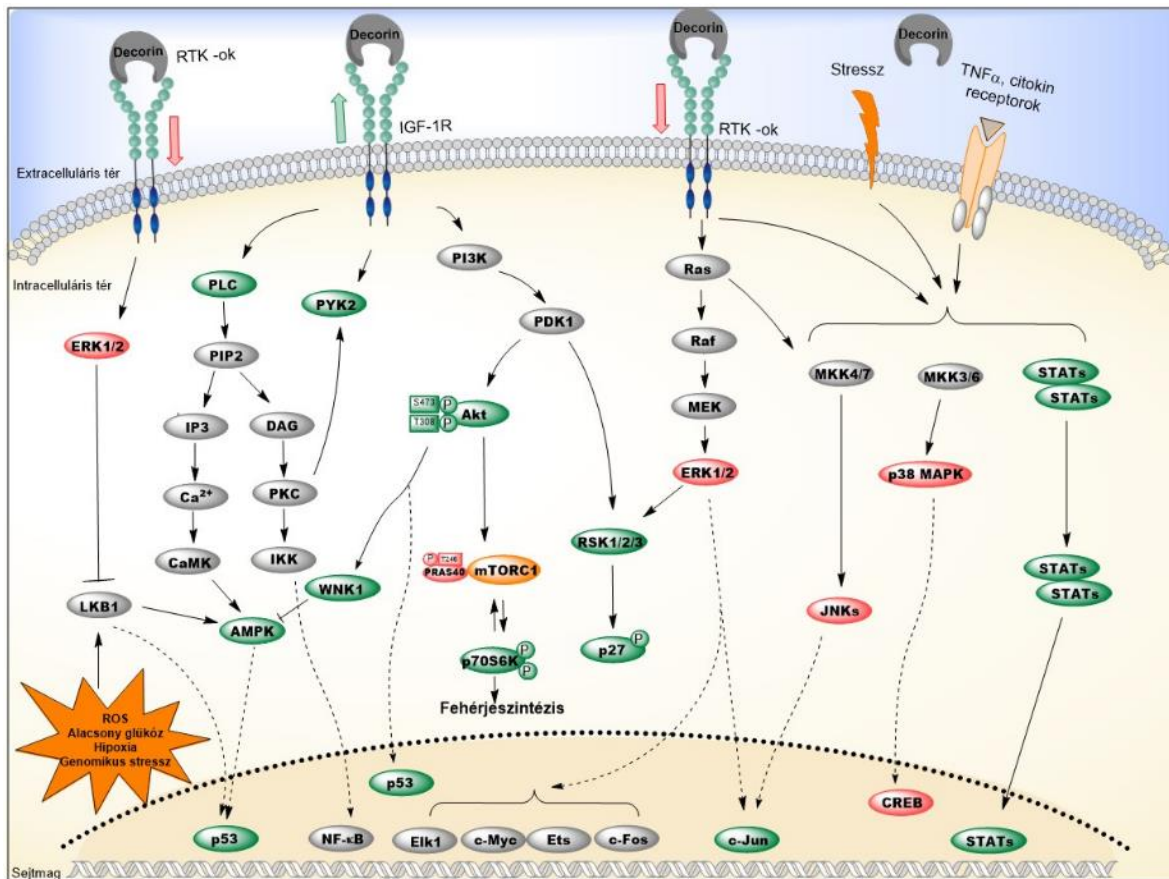


21. ábra Reprezentatív képek a pEGFR, pIGF-1R, pAKT (S473) és pAKT (T308) Western blot analíziséből (A) és azok denzitometrált kiértékelése (B, C, D, E), üres vektoral (pLIVE-0), valamint decorinnal (pLIVE-DCN) történő transzfekciót követően, TAA kezelt és vad (CTL) típusú egerekben. Belső kontrollként a β -actint használtuk. CTL=Kontroll, TAA= tioacetamid; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$



22. ábra Reprezentatív kép a p53 Phospho-Kinase Array-vel történt analíziséről (A), és annak denzitometrált kiértékelése (B). A foszfo-p53(S392), a foszfo-p53(S46) és a foszfo-p53(S15) fehérjék mennyisége szignifikánsan csökkentek a TAA kezelt, decorin transzfektált egerekben, a pLIVE-0 csoporttal szemben. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Összességében, a fentiekben kiemelt targetek a decorin daganatgátló hatását erősítik, tehát bátran mondhatjuk, hogy a decorin mint más daganatokban, a májban is tumorszuppresszorként viselkedik.



23. ábra Decorin transzfekeció hatására bekövetkező jelátviteli útvonalak változásai TAA kezelést követően *in vivo* primer hepatocarcinogenesis modellünkben. Kísérleti rendszerünkben a decorin számos RTK aktivitását gátolta, melyet csökkent MAPK/ERK működés jellemzett. Ezzel szemben az IGF-1R indukcióját figyeltük meg, melyhez fokozott Akt/mTOR aktivitás társult. A gátolt tumorigenesisért feltételezhetően az emelkedett foszfo-p53 szint tehető felelőssé. Színkódok: piros: csökkent; zöld: emelkedett; szürke: nem vizsgáltuk. A további részleteket a szöveg tartalmazza. (Saját készítésű ábra.)

10. táblázat A Phospho Kinase Array eredményei. A táblázat a TAA kezelt egerekben a pLIVE-DCN csoport pLIVE-0 mintákra normalizált relatív expresszióját mutatja a felsorolt targetekre nézve, valamint azok szignifikancia értékeit.

Fehérje target	Foszforilációs hely	A pLIVE-DCN csoport relatív mennyisége (%)	p-érték
Akt 1/2/3 (S473)	S473	106,191	0,094
Akt 1/2/3 (T308)	T308	135,548	0,014
AMPKα1 (T183)	T183	95,763	0,011
AMPKα2 (T172)	T172	106,994	0,197
Chk-2	T68	100,713	0,550
c-Jun	S63	113,436	0,008
CREB	S133	94,172	0,609
EGF R	Y1086	87,617	0,500
eNOS	S1177	138,356	0,096
ERK1/2	T202/Y204, T185/	88,815	0,168
FAK	Y397	98,433	0,542
Fgr	Y412	87,266	0,145
Fyn	Y420	96,272	0,512
GSK-3α/β	S21/S9	111,285	0,072
Hck	Y411	103,287	0,524
HSP27	S78/S82	77,119	0,189
HSP60		98,749	0,198
JNK 1/2/3	T183/Y185, T221/	94,979	0,043
Lck	Y394	97,272	0,027
Lyn	Y397	91,740	0,299
MSK1/2	S376/S360	98,017	0,535
p27	T198	148,297	0,025
p38α	T180/Y182	83,748	0,116
p53 (S46)	S46	138,985	0,024
p53 (S15)	S15	159,238	0,008
p53 (S392)	S392	141,930	0,006
p70 S6 Kinase	T421/S424	149,127	0,007
p70 S6 Kinase (T389)	T389	160,758	0,030
PDGF-Rβ	Y751	102,499	0,611
PLC-γ1	Y783	115,806	0,062
PRAS40	T246	92,030	0,325
PYK2	Y402	120,219	0,073
RSK1/2/3	S380/S386/S377	130,875	0,142
Src	Y419	100,440	0,253
STAT2	Y689	96,405	0,249

STAT3	Y705	105,928	0,060
STAT3	S727	95,275	0,377
STAT5a	Y694	109,534	0,526
STAT5a/b	Y694/Y699	116,899	0,159
STAT5b	Y699	105,366	0,520
STAT6	Y641	108,400	0,285
TOR	S2448	95,466	0,454
WNK1	T60	126,998	0,120
Yes	Y426	100,413	0,383
β-Catenin		85,988	0,092

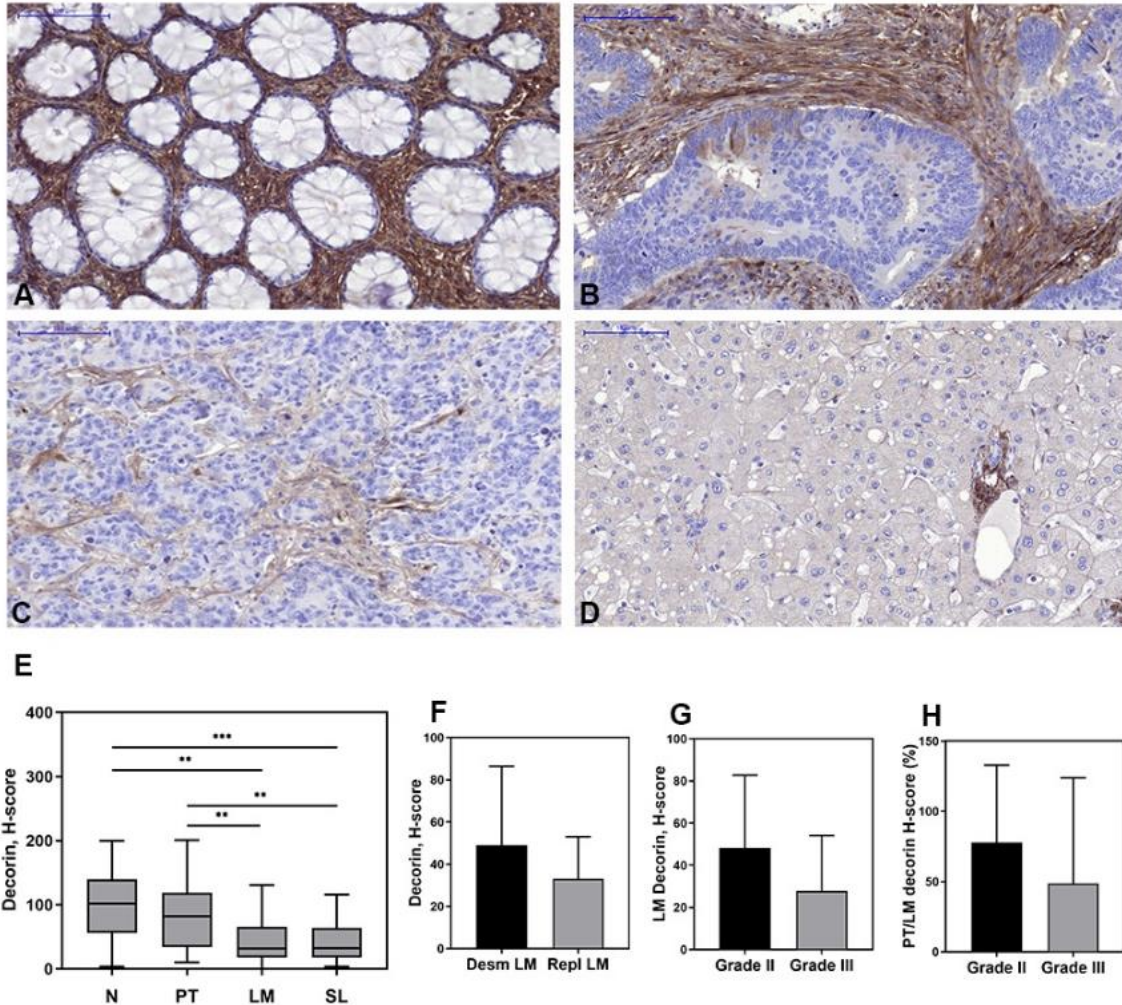
4.2. Colon adenocarcinoma májmetasztázis vizsgálatok

4.2.1. Humán colon adenocarcinoma májmetasztázis TMA eredmények

A humán TMA összeállításához, ugyanazon betegből származó ép vastagbél nyálkahártyát, primer colon adenocarcinoma mintát, májmetasztázist és az ezt környező májszövetet használtuk fel, majd a mintákon humán decorinra és SMA-ra specifikus immunfestést végeztünk. A legmagasabb decorin expresszió az ép vastagbél nyálkahártyában volt (24.A, E ábra). A primer tumorban jelentős mennyiségű proteoglikán felhalmazódást láthatunk (24.B ábra), de expressziója alacsonyabb az ép vastagbél nyálkahártyában mért értékekhez képest (24.A, E ábra). Az immunfestés azt mutatta, hogy ugyanazon beteg májmetasztázisában a decorin expresszió (24.C ábra) szignifikánsan alacsonyabb, mint a primer tumorban (24.B ábra) ($p < 0.01$). Nincs szignifikáns különbség a tumort környező májszövet és a májmetasztázis decorin expressziója között (24.C, E ábra).

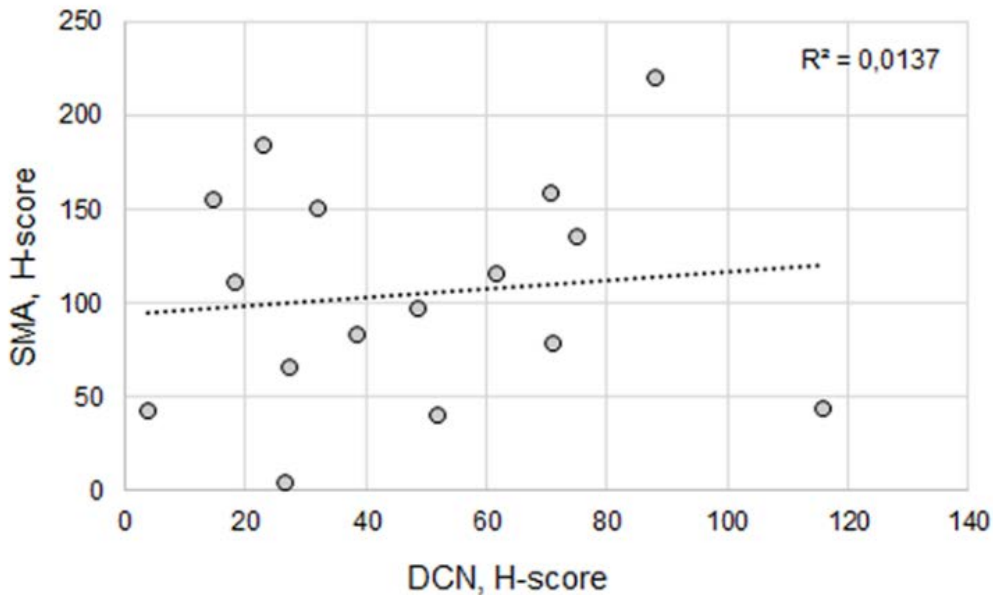
Vizsgáltuk a decorin változásait a „replacement” és „desmoplasticus” növekedési mintázat esetén is. A decorin intenzitása alacsonyabb az agresszívebb, „replacement” típusú metasztázisokban, mint a „desmoplasticus”-ban (24.F ábra). Vizsgálataink alapján a Grade III. daganatok májmetasztázisaiban alacsonyabb decorin expressziót mértünk, mint a Grade II.-ben (24.G ábra). A Grade III. májmetasztázisok primer tumor párjaiban mért decorin intenzitás alacsonyabb, mint a Grade II stádiumú primer tumor mintákban (24.H ábra). Korrelációs analízisünk alapján, mind a primer colorectalis adenocarcinoma esetében, mind pedig a májmetasztázis mintákban a decorin mennyisége nincs összefüggésben az SMA mennyiségével (25. ábra). Mindezek alapján azt feltételezzük, hogy a decorin mennyisége és

a daganat agresszivitása között összefüggés lehet. A TMA blokk összeállításához használt biopsziás minták adatait és összesített értékeit a 3. és 11. táblázat tartalmazza.



24. ábra A decorin immunhisztokémiai analízise normál vastagbél nyálkahártyában (A), primer colon adenocarcinomában (B), májmetasztázisban (C) és a tumor környező májszövetben (D). Legmagasabb decorin expresszió a normál vastagbél nyálkahártyában volt (A). Ugyanazon beteg májmetasztázisában szignifikánsan alacsonyabb decorin expressziót mértünk (C), mint a primer tumor párjában (B). Az oszlopdigrammok a decorin eloszlását mutatják (E). A decorin intenzitása alacsonyabb a „replacement” típusú metastázisokban, mint a „desmoplasticus”-ban (F). A Grade III. daganatok májmetasztázisaiban alacsonyabb decorin expressziót mértünk, mint a Grade II. -ben (G). A Grade III. májmetasztázisok primer tumor párjaiban mérhető decorin intenzitás alacsonyabb,

mint a Grade II típusú primer tumor mintáiban mérhető (H). Desm LM=”desmoplasticus” típusú májmetasztázis (n=20), Repl. LM= “replacement” típusú májmetasztázis (n=10). $n_{\text{Grade II}}=23$, $n_{\text{Grade III}}=6$, N=normál colon, PT=primer tumor, LM= májmetasztázis, SL= környező májszövet. Lépték=200 μm . *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$.



25. ábra A decorin és SMA intenzitás kollerációs analízise a májmetasztázis környező májszövetében mért értékek alapján. A decorin intenzitása független az SMA mennyiségétől.

11. táblázat A TMA blokk összeállításához felhasznált biopsziás minták összesített decorin H-score értékei. N=normál vastagbél nyálkahártya, PT=primer tumor, LM=májmetasztázis, SL=környező májszövet.

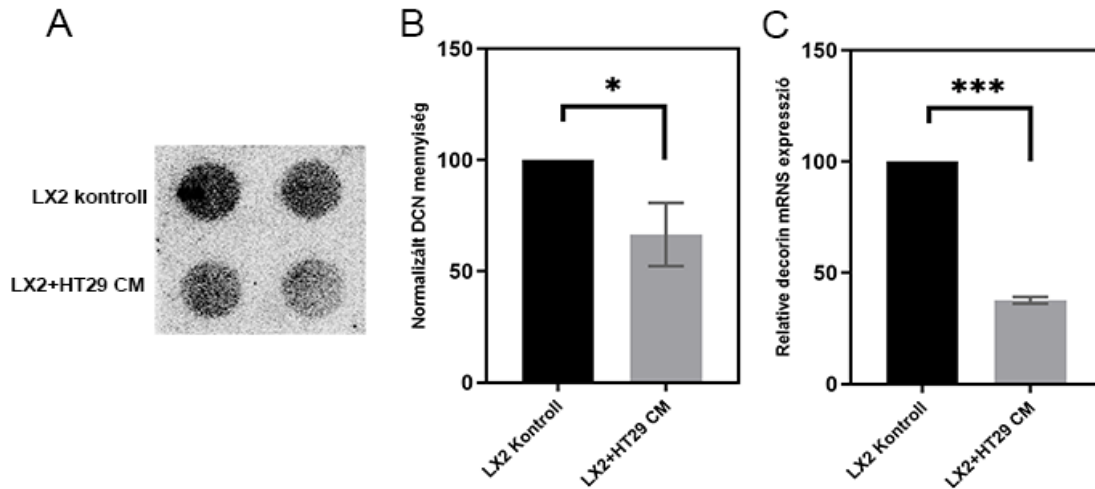
Beteg ID	N H-score átlag	PT H-score átlag	LM H-score átlag	SL H-score átlag
1	50,14	34,36	49,14	52,07
2	139,00	23,60	16,48	23,10
3	44,00	68,85	25,41	88,34
4	30,05	85,29	60,91	14,99
5	147,82	117,93	29,95	38,68
6	188,57	97,89	0,52	18,51
7	41,05	94,32	17,97	27,45
8	89,87	37,64	10,13	6,93

9	104,82	33,57	63,74	37,89
10	96,74	107,53	31,18	61,25
11	141,67	81,25	17,04	114,37
12	56,66	20,33	24,22	106,26
13	56,58	53,60	40,21	12,01
14	72,15	142,65	87,35	32,19
15	23,05	26,14	31,46	12,44
16	179,67	118,48	130,44	116,08
17	101,71	138,33	65,67	61,88
18	158,52	62,53	122,16	3,95
19	134,90	83,07	77,92	48,82
20	121,20	138,81	22,67	75,26
21	199,89	201,10	71,82	26,64
22	142,47	121,04	9,31	71,06
23	54,96	28,06	55,75	29,39
24	129,62	124,62	1,54	70,77
25	84,20	39,87	7,06	20,76
26	3,71	10,18	34,26	6,86
27	101,64	83,69	29,17	5,68
28	79,30	25,58	32,77	33,17
29	105,84	52,44	65,51	26,15
30	135,89	136,74	77,63	36,13

4.2.2. *In vitro* kísérleti rendszer

A májmetasztázis szöveti microarray vizsgálatai, illetve a humán HCC vizsgálati eredményeink alapján arra következtethetünk, hogy a daganat progressziója során a decorin expressziója folyamatosan csökken. Ennek alapján, kíváncsiak voltunk, hogy a vastagbél tumor sejtek képesek-e közvetlen hatást kifejteni a máj csillagsejtek decorin termelésére. Ennek bizonyítására LX2 humán csillagsejt vonalat, HT29 humán colon adenocarcinoma sejtek kondicionált tápfolyadékában növesztettük. Szignifikánsan kevesebb decorin mennyiséget mértünk az LX2 csillagsejtek médiumában, amikor azok HT29 sejtvonal kondicionált médiumának jelenlétében növekedtek ($p < 0,05$) (26.A, B ábra). Szignifikáns csökkenést tapasztaltunk mRNS szinten is a colon adenocarcinoma kondicionált médiumban növesztett LX2 esetében, a kontroll LX2 sejtekhez képest ($p < 0,001$) (26.C ábra), ami arra enged következtetni, hogy a gátlás már transzkripció szinten megtörténik.

Ezek az eredmények jól harmonizálnak a korábbi vizsgálatainkkal, melyek a decorin tumorszupresszor szerepét erősítik.



26. ábra Reprezentatív ábra az LX2 médiumában mért decorin változásának dot blot analízisről (A), valamint annak denzitometrált kiértékeléséről (B). Decorin expresszió változása mRNS szinten (C). Szignifikánsan csökkent az LX2 csillagsejtek decorin termelése HT29 colon adenocarcinoma sejtek kondicionált tápfolyadékának jelenlétében. CM= kondicionált médium. *** $p < 0.001$; * $p < 0.05$

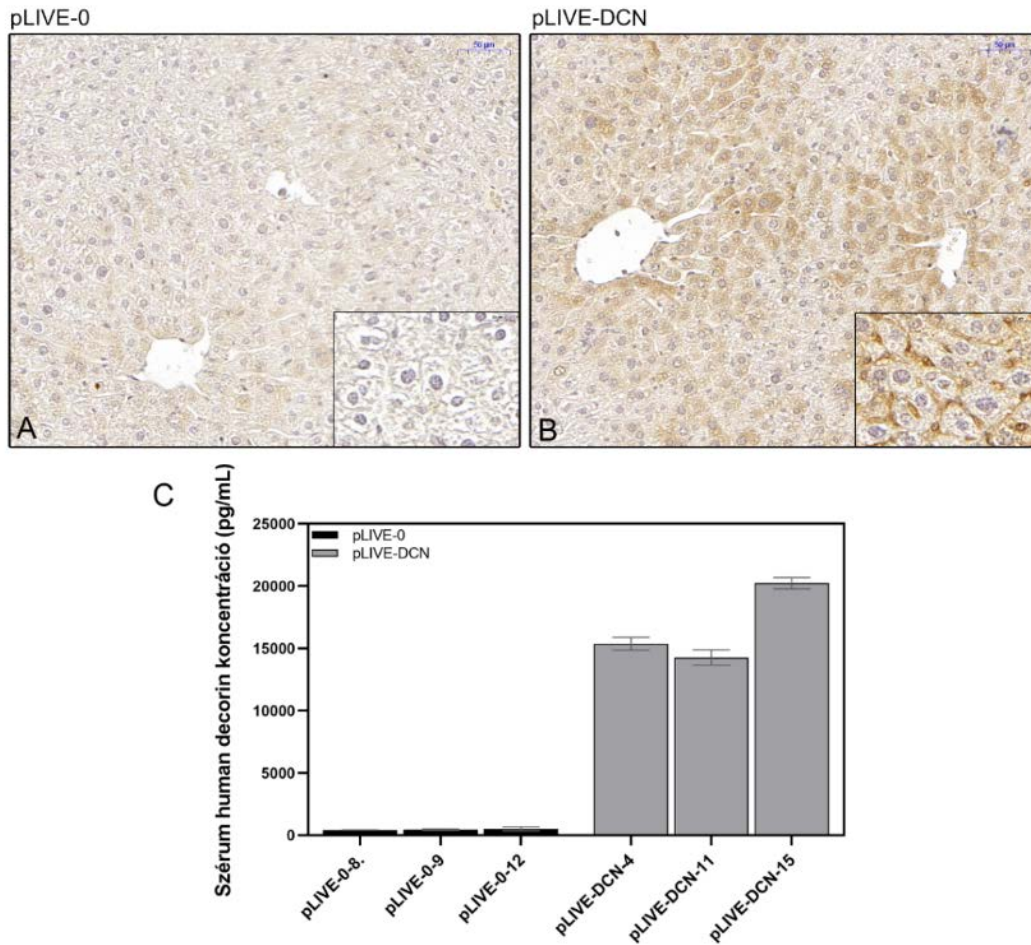
4.2.3. *In vivo* kolonizációs modell

4.2.3.1. Humán decorin génbevitel sikerességének ellenőrzése

Májmetasztázis vizsgálatokhoz, olyan kolonizációs modellt hoztunk létre, melyben a decorint túltermelő egerek májában, c38 egér colorectális carcinoma sejtek lépbe való oltását követően vizsgáltuk a tumor megjelenését és annak molekuláris hátterét.

A hidrodinamikus génbevitel sikerességét immunhisztokémiai festéssel, valamint humán decorin ELISA-val erősítettük meg a pLIVE-DCN és a pLIVE-0 transzfektált csoportokban, c38 colorectális carcinoma sejtek lépbe való oltását követően. A humán decorinra specifikus immunhisztokémiai reakció a decorin transzfektált egerek hepatocytáiban erős immunpozitivitást mutatott a centrális vénák és a portális traktus körül (27.B ábra), míg a kontroll mintákban alig volt decorin expresszió (27.A ábra). A humán proteoglikán szintet az egerek keringésében is meghatároztuk ELISA vizsgálattal (termináláskor gyűjtött szérumból), ahol a pLIVE-DCN csoportokban magas decorin fehérje

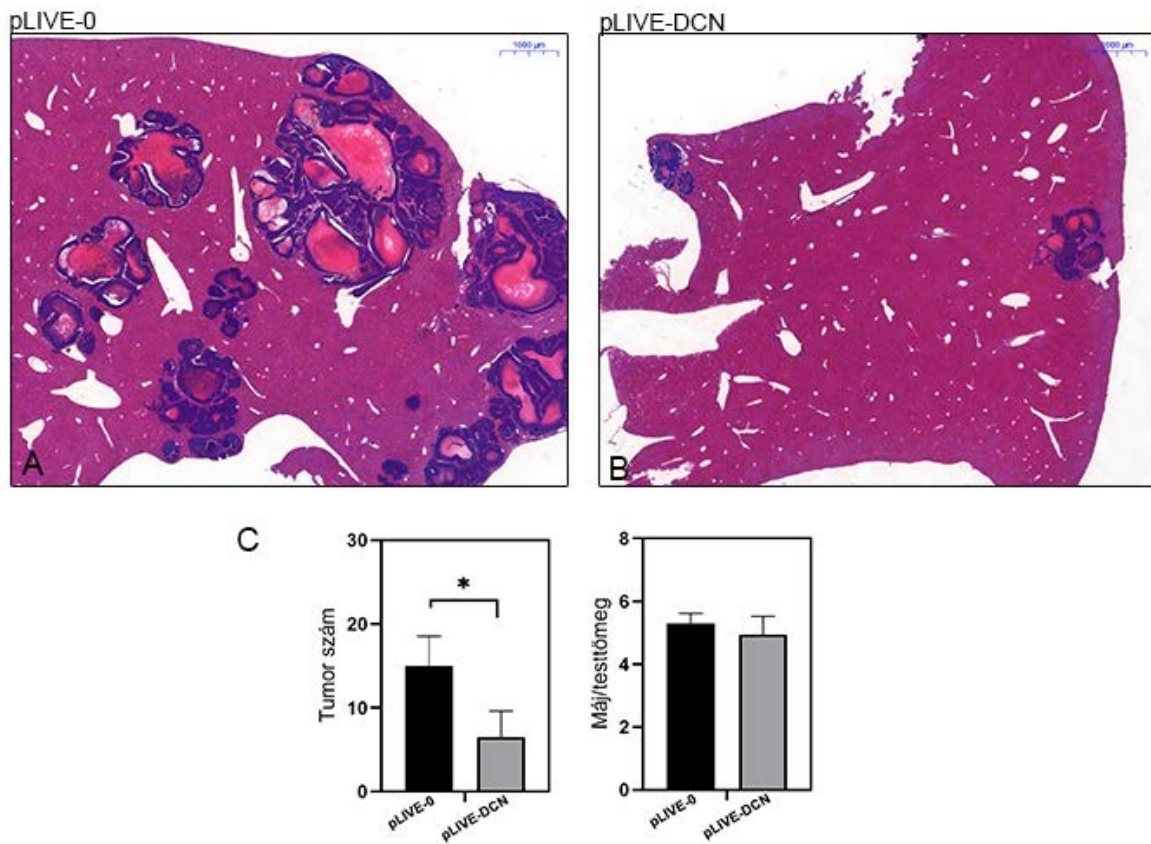
szinteket detektáltunk, szemben a kontroll csoporttal (27.C ábra). Ezek az eredmények alátámasztják a hidrodinamikus génbevétel sikerességét, valamint a humán decorin aktív jelenlétét.



27. ábra Humán decorinra specifikus immunhisztokémiai festés a pLIVE-0 (A) és decorin transzfektált (pLIVE-DCN) (B) egerek májában, c38 egér colorectális carcinoma sejtek oltását követően. Decorin transzfekciót követően a pLIVE-DCN egerek hepatocytáiban erős humán decorin immunpozitivitást tapasztaltunk, melyet a barna csapadék jelez (A). A Decorin a centrális vénák körül fejeződött ki. A pLIVE-0 csoportokban negatív humán decorin festődést tapasztaltunk (B). A pLIVE-DCN csoportok szérumában (termináláskor gyűjtött) ELISA segítségével magas decorin koncentrációt mértünk, a kontrollhoz képest (C). Lépték =50 µm; 20 µm.

4.2.3.2. Decorin hatékonysága a kolonizációs modellünkben

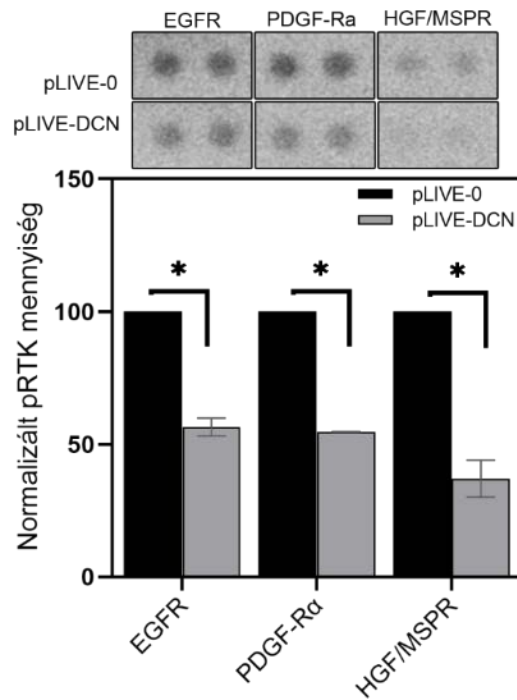
A hidrodinamikus génbevitel hatására a decorint nem expresszáló csoportokban (28.A ábra) szignifikánsan több tumorgócot detektáltunk, a proteoglikánnal transzfektált csoporttal szemben c38 egér colorectális carcinoma sejtek lépbe való oltását követően ($p < 0.05$) (28.B C ábra). A decorin kezelt egerek esetében 63%-kal csökkent a tumor prevalenciája a kontroll csoporthoz képest, melyet az alacsonyabb máj-/testtömegarány is alátámaszt (28. ábra). Ezek alapján bátran feltételezhetjük a decorin védő hatását a metasztatikus májdaganatokkal szemben is.



28. ábra Reprezentatív hematoxilin-eozin festett metszetek a decorin transzfektált (A) és kontroll egerek májáról (B) c38 colorectális carcinoma sejtek lépbe való oltását követően. Az oszlopdiaagrammok a pLIVE-0 és pLIVE-DCN egerekben a tumorszámot és a máj/testtömegarányt mutatja (C). A pLIVE-DCN csoportokban 63%-kal csökkent a tumor prevalenciája, valamint csökkent a máj/testtömegarány is a pLIVE-0 csoporthoz képest. Lépték: 1000 μm $n=24$, $p < 0.05$

4.2.3.3. A decorin molekuláris hatása a kolonizációs modellben

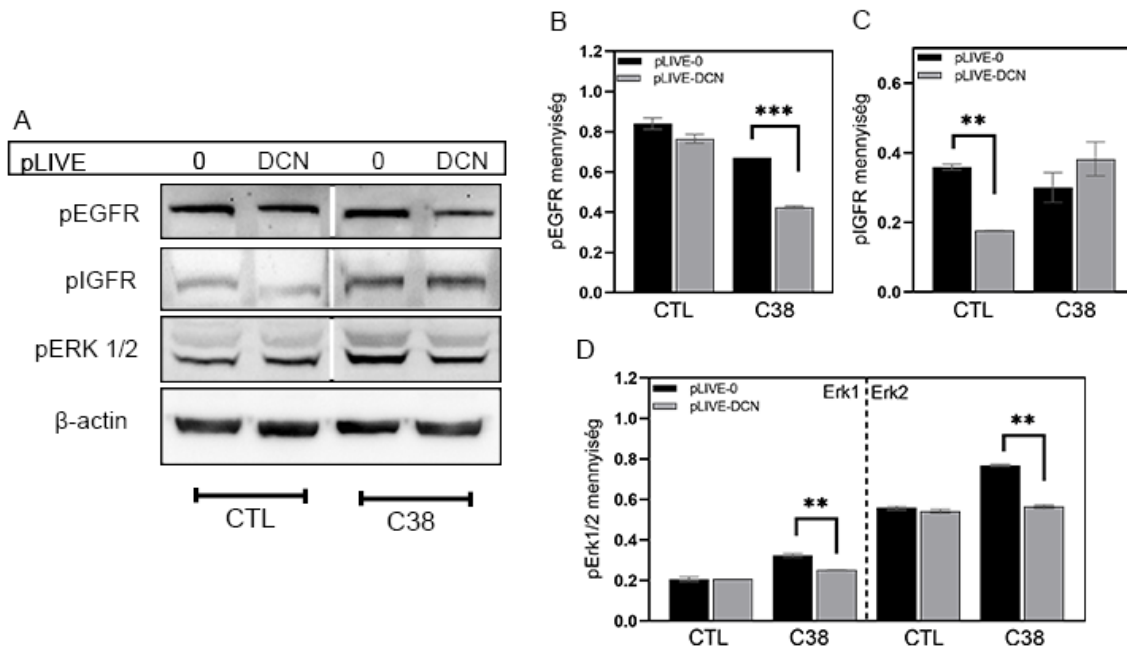
Számos kutatás szerint a decorin daganatgátló hatását különféle RTK gátlásán keresztül fejt ki. A kísérletes rendszerünkben decorin transzfektált, c38 colorectális carcinoma sejttel oltott egerek esetében szignifikánsan csökkent az EGFR, PDGFR α és a HGF/MSPR receptorok aktivitása, a kontroll csoporthoz képest ($p < 0.05$) (29. ábra). Proteome Profiler Mouse Phospho-RTK Array vizsgálataink eredményeként a proteoglikánt overexpresszáló, c38 colorectális carcinoma sejttel oltott csoportokban az EGFR, PDGFR α és a HGF/MSPR receptorok aktivitásában 43%, 45% és 63%-os csökkenést figyelhettünk meg a kontrollhoz képest (29. ábra).



29. ábra Reprezentatív kép a Phospho-RTK Array analiziséről, és annak denzitometrált kiértékelése. Decorin transzfektált, c38 colorectális carcinoma sejttel oltott csoportokban szignifikánsan csökkent az EGFR, PDGFR α és a HGF/MSPR receptorok expressziója kolonizációs modellünkben. * $p < 0.05$.

Decorin transzfekció hatására a vad típusú egerekben (CTL) szignifikánsan csökkent az pIGFR aktivációja, ugyanakkor a c38 egér colorectális carcinoma sejtekkel oltott állatok esetében nem volt különbség az üres vektorral (pLIVE-0) és a decorin vektorral (pLIVE-

DCN) transzfektált csoportok között ($p < 0.01$) (30. ábra). Az EGFR esetében a decorin transzfektált, c38 sejtekkel oltott csoportok szignifikánsan kisebb expressziót mutatott a receptorra nézve, összehasonlítva a pLIVE-0 csoportokkal ($p < 0.001$) (30. ábra). Ezzel összefüggésben decorin hatására a c38 colorectális carcinoma sejtekkel oltott egerekben az ERK1/2 aktivitása 22% és 27%-kal csökkent, szemben az üres vektorral transzfektált csoporttal ($p < 0.01$) (30. ábra).

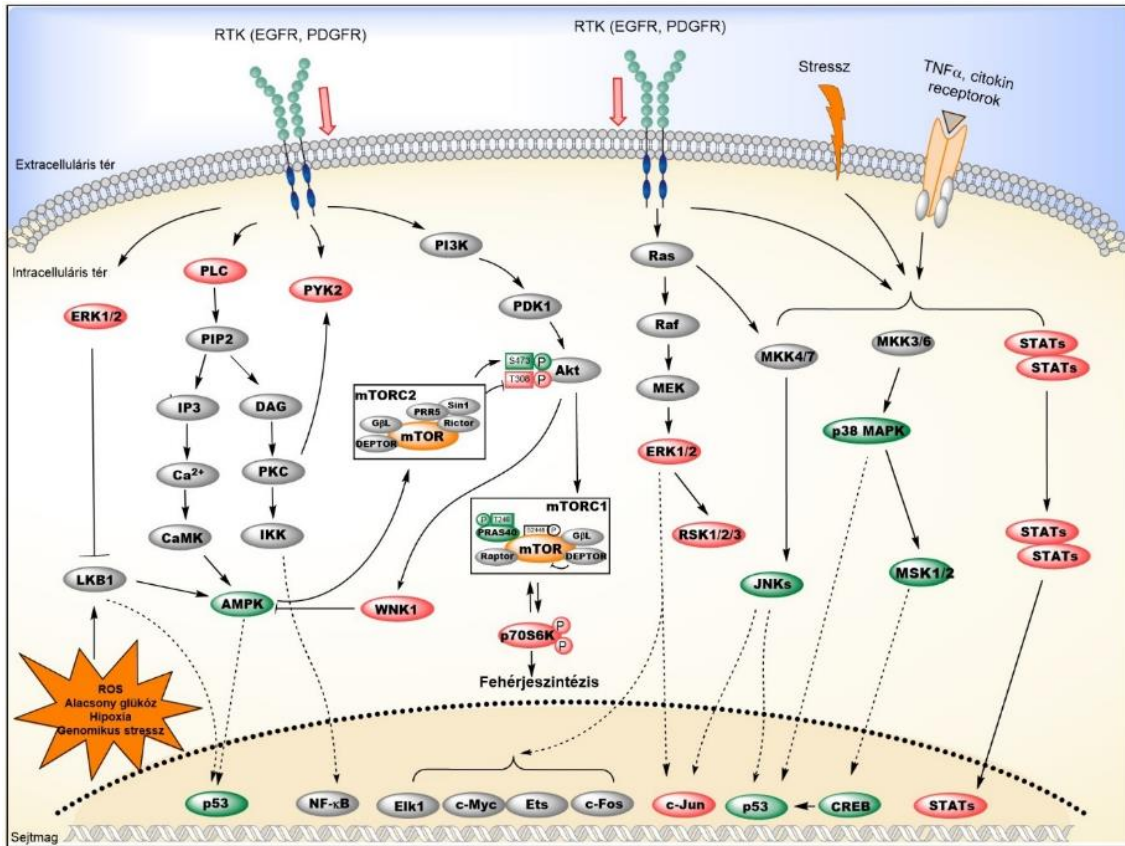


30. ábra Reprezentatív képek a pEGFR, pIGF-1R, pERK1/2 western blot analíziséből (A) és azok denzitometrált kiértékelése (B, C, D), üres vektorral (pLIVE-0), illetve decorinnal (pLIVE-DCN) történő transzfekciót követően, vad (CTL) típusú egerekben, valamint c38 egér colorectális carcinoma sejtekkel oltott egerekben (c38). Belső kontrollként a β -actint használtuk. CTL=Kontroll; DCN=decorin; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Ezután célul tűztük ki a decorin indukció hatására bekövetkező daganat-specifikus jelátviteli utak tanulmányozását. Ennek érdekében, a már korábban említett 43 targetre specifikus Phospho Kinase Arrayt használtam, melynek összesített, kiértékelt eredményeit a 12. táblázatban és a 31. ábrán foglaltuk össze. A decorin transzfektált, c38 colorectális carcinoma sejtekkel oltott csoportokban gátolt RTK-ok mellett, csökkent Ras/MAPK

(csökkent ERK1/2, RSK1/2-vel jelölve) és csökkent PLC γ -t detektáltunk, a kontroll (pLIVE-0) csoportokkal összehasonlítva. Ezen kívül, a fokozott proteoglikán termelés gátolta az Akt/mTOR útvonal működését, amelyet az alacsonyabb pAkt (T308) és a foszfo-p70S6K szint jelzett (12. táblázat, 31. ábra). A csökkent Akt aktivitás mellett a pLIVE-DCN csoportban a WNK1 fehérje alulszabályozását is kimutatták, továbbá a STAT fehérjék, illetve a c-Jun szintje szintén alacsonyabb volt a pLIVE-0 mintákkal szemben (12. táblázat, 31. ábra). Eredményeink szerint csökkent a β -catenin aktivitása is, ami a colon adenocarcinoma fontos jelátviteli fehérjéje, illetve a decorin ismert célpontja.

Decorin hatására a c38 colorectális carcinoma lépbe való oltását követően, az egerek májában p38-MAPK aktivitása fokozott, valamint annak downstream effektorai, mint a MSK1/2 és a CREB fehérjék szintén magasabb expressziót mutattak a kontrollhoz képest. A proteoglikán szintén megemelte a foszfo-AMPK és a foszfo-p53 szintjét, illetve a JNK fehérje mennyisége is fokozódott decorin hatására, ám a változás nem volt szignifikáns (12. táblázat, 31. ábra).



31. ábra A decorin transzfekció hatására bekövetkező jelátviteli útvonalbeli változások kolonizációs modellünkben. A decorin számos RTK gátlását eredményezte, ezzel párhuzamosan csökkent a MAPK/ERK és az Akt/mTOR/p70S6K utak aktivitása. A fokozott AMPK, valamint p38/MSK/CREB jelátviteli utak emelkedett foszfo-p53 szintet eredményeztek, aminek hatására a sejtciklus blokádnál került. Színkódok: piros: csökkent; zöld: emelkedett; narancs: nincs változás; szürke: nem vizsgáltuk. (Saját készítésű ábra)

12. táblázat A Phospho Kinase Array eredményei. A táblázat a pLIVE-DCN csoport pLIVE-0 mintákra normalizált relatív expresszióját mutatja, a c38 egér colorectális carcinoma sejtek lépbe való oltását követően a felsorolt targetekre nézve.

Fehérje target	Foszforilációs hely	A pLIVE-DCN csoport relatív mennyisége (%)	p-érték
Akt 1/2/3 (S473)	S473	139,277	0,085
Akt 1/2/3 (T308)	T308	96,147	0,083
AMPK α 1 (T183)	T183	107,259	0,027

AMPKα2 (T172)	T172	109,825	0,124
Chk-2	T68	105,490	0,517
c-Jun	S63	80,634	0,016
CREB	S133	114,239	0,103
EGF R	Y1086	97,511	0,274
eNOS	S1177	96,573	0,528
ERK1/2	T202/Y204, T185/	79,370	0,045
FAK	Y397	87,540	0,343
Fgr	Y412	73,382	0,047
Fyn	Y420	99,185	0,220
GSK-3α/β	S21/S9	98,895	0,126
Hck	Y411	103,026	0,210
HSP27	S78/S82	85,398	0,014
HSP60		107,067	0,042
JNK 1/2/3	T183/Y185, T221/	114,402	0,438
Lck	Y394	100,697	0,567
Lyn	Y397	109,082	0,371
MSK1/2	S376/S360	117,438	0,038
p27	T198	106,962	0,336
p38α	T180/Y182	108,060	0,435
p53 (S46)	S46	104,783	0,276
p53 (S15)	S15	112,702	0,185
p53 (S392)	S392	117,981	0,064
p70 S6 Kinase	T421/S424	79,221	0,050
p70 S6 Kinase (T389)	T389	78,876	0,059
PDGF-Rβ	Y751	70,647	0,012
PLC-γ1	Y783	75,498	0,026
PRAS40	T246	116,635	0,067
PYK2	Y402	79,806	0,083
RSK1/2/3	S380/S386/S377	90,656	0,072
Src	Y419	110,985	0,089
STAT2	Y689	87,833	0,139
STAT3	Y705	84,852	0,117
STAT3	S727	96,977	0,462
STAT5a	Y694	85,820	0,157
STAT5a/b	Y694/Y699	82,277	0,287
STAT5b	Y699	75,547	0,016
STAT6	Y641	92,892	0,083
TOR	S2448	97,492	0,346
WNK1	T60	82,123	0,053
Yes	Y426	97,223	0,313
β-Catenin		84,948	0,025

Összességében eredményeink arra utalnak, hogy a decorin védő szerepet játszik a colon adenocarcinoma májmetasztázisával szemben, valamint kísérletes rendszerünkben is hatását RTK-ok gátlásán keresztül fejt ki.

5. MEGBESZÉLÉS

5.1. Decorin szerepe a HCC-ban

A HCC kialakulása egy többlépcsős, összetett folyamat, melynek során a celluláris protoonkogénekből és tumorszuppresszor génekből bekövetkező epigenetikai és genetikai változások a májsejtek fenotípusának megváltozását eredményezik, mely végső soron autonóm sejtproliferációt eredményez (160). Az elmúlt évtizedek tanulmányai azt bizonyítják, hogy a daganatos megbetegedések során a tumor kialakulásáért nem csupán a kórosan osztódó, mutációkat hordozó sejtek felelnek, hanem rendkívül fontos szerepe van az ezeket körülvevő daganatos mikrokörnyezetnek is. Daganatos mikrokörnyezet alatt a tumor kötőszöveti környezetét, az itt természetesen is megtalálható állandó sejteket (csillagsejtek, adipocyták, endothelsejtek, pericyták), illetve a gyulladásos folyamatok és kemoattraktív faktorok hatására a helyszínre vándorolt immunrendszeri sejteket értjük (161). A daganatos mikrokörnyezet fő, nem celluláris komponense az ECM, amely különféle biológiai funkciókkal és biokémiai tulajdonságokkal rendelkező makromolekulákból épül fel (fehérjék, glikoproteinek, proteoglikánok és glikozaminoglikánok) (162).

A decorin az ECM kis leucinban gazdag proteoglikánja, melyet elsődlegesen csillagsejtek, simaizomsejtek és aktivált vascularis endothelialis sejtek termelnek (34). Az irodalomban számos tanulmány számol be a decorin daganatgátló szerepéről, melyet elsődlegesen a RTK-ok gátlásával éri el (47, 163, 164). A decorin májdaganatokban betöltött szerepéről kevés irodalmi adat áll rendelkezésünkre (57, 85, 86, 106, 128, 165-167), így kutatásom során egyik fő célom a proteoglikán HCC-ban betöltött szerepének tisztázása volt, remélve, hogy eredményeim előrelépést jelenthetnek ezen a területen. Hipotézisünk szerint a decorin, mint fiziológiás RTK inhibitor számos daganat proliferációjának hatékony gátlószere lehet. Feltételezéseinket négy szinten történő vizsgálatokkal terveztük bizonyítani: (1) *In silico* adatbázis felhasználásával vizsgáltuk humán HCC mintákban a decorin mRNS expresszióját, (2) Humán HCC szöveti microarray vizsgálatokat terveztünk, melyben a decorin, az SMA és az EGFR fehérje-, illetve mRNS szintű változásait tanulmányoztuk, (3) *In vitro* kísérletes rendszerünkben, humán LX2 máj csillagsejt vonalat különféle (HLE, HepG2, Hep3B, HuH7) hepatoma sejtek kondicionált médiumában növesztettük és

vizsgáltuk a különböző tumor sejtvonalaknak a csillagsejtek (LX2) decorin termelésére adott változásait. (4) *In vivo* modell rendszerünkben decorint túltermelő májban (decorin expressziós vektor bejuttatásával) vizsgáltuk a primer hepatocarcinogenesis folyamatát és annak molekuláris eseményeit.

Korábban, különböző tumorszöveten végzett kutatások során csupán a decorin abszolút mennyiségéről számoltak be. Jelen vizsgálataink alapján a decorin expresszióját normalizáltuk az SMA mennyiségére, amely a decorin termelő aktivált csillagsejtek jól ismert markere (168). Ilyen módon sikeresen kiküszöböltük a csillagsejtek számából adódó decorin mennyiségi különbségeket. PhD munkám során az online elérhető ArrayExpress adatbázis E-MTAB-950 kísérleti adatait használtuk fel, mely 112 HCC betegeknél génexpressziós értékei tartalmazza, valamint 10 olyan minta is elérhető, amelyeknél ugyanazon HCC-s beteg tumoros és nem tumoros környező májszövetének adatai is rendelkezésünkre állnak. Kontrollként 36 májminta szolgált. Eredményeink szerint szignifikánsan kevesebb decorin volt kimutatható a HCC-s mintákban, a tumort környező szövetrel, valamint a kontroll mintákkal összehasonlítva (9. ábra). Ezen túlmenően a proteoglikán relatív expressziója szignifikánsan csökkent a májdaganat előrehaladottabb stádiumaiban. Az *in silico* adatok szerint a krónikus limfoid leukémia (CLL) korai stádiumában szintén magas decorin mRNS expresszió volt mérhető, viszont a daganat stádiumának előhaladtával párhuzamosan, a proteoglikán mRNS mennyisége csökken (80). Úgy tűnik tehát, hogy a rosszindulatú daganat progressziója összefüggésben van az endogén decorin mennyiségének csökkenésével. Eredményeink bizonyítják, hogy a csökkent decorin expresszió a decorin gén gátlásának a következménye, mely független a csillagsejtek számától.

Az események jobb megértése érdekében humán HCC esetekből TMA-t állítottunk össze, melyhez 37 db paraffinba ágyazott mintát használtunk fel, ebből 19 cirrhotikus májban kialakult HCC, 9 db pedig nem cirrhotikus májban kialakult HCC volt. Kontrollnak 9 db haemangioma melletti ép májszövetet használtunk. A microarray lemezekon decorin és SMA immunreakciókat végeztünk. A decorin mennyiségét, az *in silico* vizsgálatokhoz hasonlóan az SMA mennyiségére normalizáltuk. Szemben az ugyanazon beteg nem tumoros környező szövetmintájában mért értékekkel, a tumor strómában csökkent vagy teljesen gátolt decorin

expressziót mérhettünk. Ellentétben az *in silico* vizsgálatoknál tapasztaltakkal, a decorin relatív mennyisége sem mRNS szinten, sem fehérje szinten nem volt alacsonyabb a tumor strómában, a kontroll mintákéhoz képest. Ennek egyik lehetséges oka a különböző kontroll minták használata. TMA vizsgálatok során kontrollként haemangioma melletti májszövetet alkalmaztunk, míg az *in silico* adatbázisban a „normál” jelöléssel illetett mintákról nincs további információnk. Ez lehet egészséges máj vagy más nem tumoros elváltozásból származó ép szövet, ebből adódhat az eltérő decorin kifejeződés.

A decorin tumorszupresszor hatásának kifejtéséhez a fehérjének szolubilis formában kell jelen lennie. A kötőszövetben a decorin jelentős mennyisége a kollagénrostokhoz kötve található, mely ilyen formán immobilizált állapotban van, és nem képes sem a RTK-hoz (EGFR, Met, IGF-1R, VEGFR, és PDGFR), sem a citokinekhez kötődni. Így a kötött és a szolubilis decorin aránya különösen fontos lehet a proteoglikán daganatgátló hatásának kifejtéséhez. Érdekes módon nem találtunk szignifikáns különbséget a decorin expressziójában a cirrhotikus és nem cirrhotikus májban kialakult HCC-k között, mennyisége mindkét típusnál csökkent vagy teljesen gátolt volt, a tumort környező szövethez képest. Emellett azt is megfigyeltük, hogy a mintáink 52%-ban teljesen gátolt, 33%-ban alacsony expresszió, és 15%-ban magas decorin intenzitás volt mérhető (13. ábra). A cirrhotikus májban kialakult HCC-k esetében kifejezettebb volt a proteoglikán hiánya. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a proteoglikán hiánya túlélési előnyt biztosít a tumorszövet számára. A pontos mechanizmus felderítése azonban mindenképpen további kísérletes munkát igényel. Elképzelhető, hogy a tumor strómában mért csökkent decorin expresszió hátterében a DCN gén promóterének metilációja áll. Nem kissejtes tüdőrák esetén már leírták, hogy a DCN 5'-UTR régiójában történő +58CpG metiláció felel a proteoglikán tumor strómában mért csökkent mRNS expressziójáért (169). A Human Protein Atlas online adatbázis normál és tumoros mintáinak összehasonlítása is azt bizonyítja, hogy számos tumorban (vastagbél- és vese adenocarcinoma, hasnyálmirigy adenocarcinoma, prosztatata adenocarcinoma, gyomor adenocarcinoma) mért decorin expresszió szignifikánsan alacsonyabb, a tumort környező szövethez képest. Eredményeik szerint, magas decorin expresszió volt mérhető a peritumoralis strómában és a proteoglikán mennyisége csökken vagy teljesen gátolt a tumor strómában (65). További kutatások szerint a DCN gén legalább

50%-os csökkenését figyelték meg tüdő adenocarcinomákban és laphámsejtes carcinomákban a normál szövetekhez képest (66).

Kíváncsiak voltunk, hogy a tumorsejtek képesek-e közvetlenül befolyásolni a csillagsejtek decorin termelését, ezért olyan *in vitro* kísérletes rendszert hoztunk létre, melyben humán LX2 csillagsejteket különféle hepatoma sejtek kondicionált médiumában növesztettük. Szignifikánsan kevesebb decorin volt mérhető az LX2 sejtek tápfolyadékában, amikor HLE, HepG2 és HuH7 humán hepatoma sejtek kondicionált médiumában növesztettük a sejteket (15. ábra). Ezek az eredmények összhangban vannak a HCC szövetmintán kapott eredményekkel. Hasonló tanulmányt mutattak be Van Bockstal és munkatársai (170), melyben csökkent decorin expressziót detektáltak a csillagsejtek tápfolyadékában, amikor emlőrákos sejtvonalak kondicionált médiumát alkalmaztak a csillagsejtek tenyésztésre. Eredményeik szerint a csökkent decorin termelés hátterében a TGF- β 1-et azonosították, mint a fő gátló tényező. Valójában a TGF- β 1 a DCN gén ismert transzkripciós inhibitora (171) és a kísérletünk során alkalmazott hepatoma sejtvonalak jelentős mennyiségű citokint termelnek (128). Tehát elképzelhető, hogy a tumorsejtek által termelt TGF- β 1 felelős a csillagsejtek csökkent decorin termeléséért. Tehát összességében, ezek az eredmények arra utalnak, hogy a tumoroknak előnyt jelent a proteoglikán gátlása, melynek pontos molekuláris mechanizmusa még felderítésre vár.

Korábbi vizsgálataink szerint kísérletes hepatocarcinogenesis modellben a decorin hiánya elősegíti a májdaganat kialakulását (57). Ugyanakkor további kérdés volt, vajon a proteoglikán hozzáadása képes-e ellensúlyozni a TAA által kiváltott primer hepatocarcinogenesisist. Hipotézisünk bizonyítására olyan *in vivo* kísérletes rendszert hoztunk létre, melyben hidrodinamikus génbevétel módszerével, farokvénán keresztül juttattuk az egerek keringésébe a decorint. A transzfektált proteoglikán a hepatocytákban fejeződött ki a centrális vénák körül. A TAA kezelést követően a tumorok száma azokban a csoportokban volt magasabb, melyekben nem fejeződött ki a proteoglikán. Vizsgálataink összhangban vannak a korábbi tanulmányok biztató eredményeivel, ahol a decorin adenovírus vektoron keresztül történő bejuttatása gátolta a tüdő-, vastagbél- és laphámsejtes carcinomák proliferációját az EGFR foszforiláció gátlásán keresztül (147). További eredmények szerint, a bejuttatott decorin gátolta a Met és Wnt/ β -catenin jelátviteli útvonalakat, és így

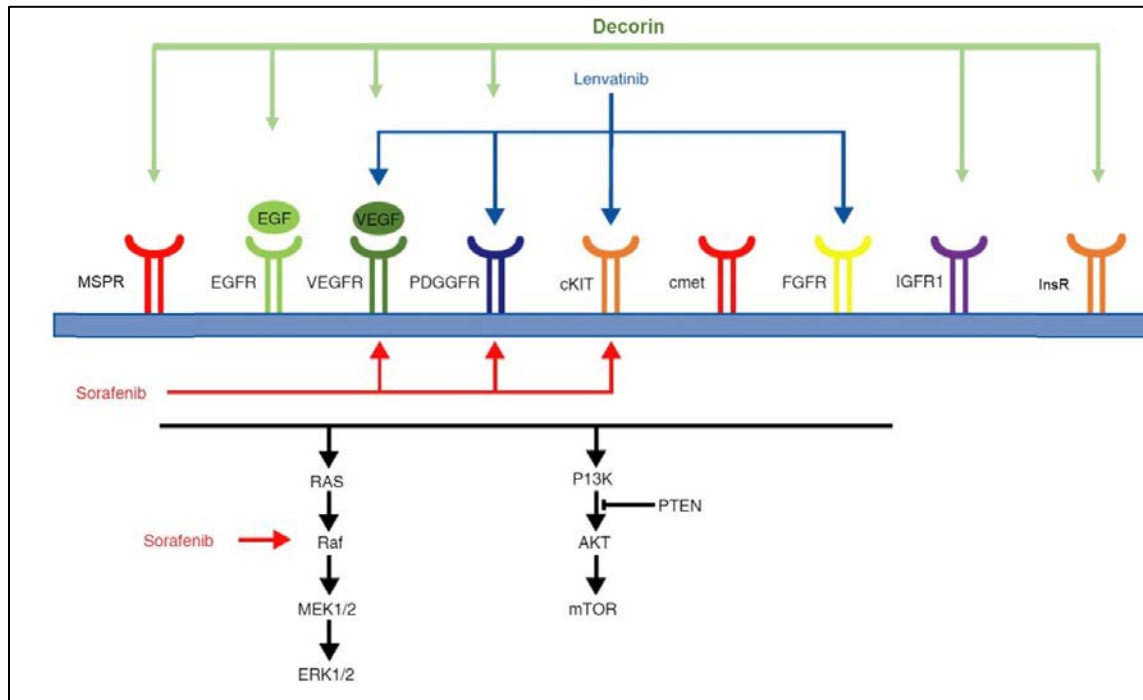
megakadályozta a prosztata tumorsejtek metasztázisképzését csontba (148). Vírus által transzfektált decorin hatására csökkent a tumorképződés az emlőrák modellben is. Ezen túlmenően azt is megfigyelték, hogy gátolta a különféle szervekben történő metasztázis képződését is (140, 141, 149). Egy másik munkacsoport eredményei szerint a decorin génterápia meghosszabbítja a túlélést és gátolja a tumor növekedését *in vivo* glióma modellben (150). A decorin mennyisége koncentrációfüggően változott a gátlás mértékével (150). Sikeres decorin génbevitelt írtak le hasnyálmirigyrák modellekben is (172, 173). Eredményeink ezekkel a vizsgálatokkal együtt megerősítik, hogy az emelkedett decorin expresszió *in vivo* képes védelmet nyújtani a tumorképződéssel szemben, illetve ezzel ellentétesen a proteoglikán tumor stromában történő gátlása serkenti a tumor invázióját. Vizsgálataink alapján feltételezzük, hogy a decorin, ahogy azt számos más szövettípusban láttuk, a májban is tumorszuppresszorként viselkedik.

Az egyik legérdekesebb megfigyelésünk, hogy a pLIVE-DCN transzfektált, TAA kezelt csoportokban, más RTK-kal ellentétben az IGF-1R aktivációja fokozott. Ezzel párhuzamosan nagy mértékű Akt foszforilációt detektáltuk a pLIVE-0 csoporthoz képest. Továbbá, a decorin transzfektált csoportokban megnövekedett a p53 foszforilációja a 46. pozíciójú szerin aminosavon, amely az apoptózis egyik fő markere (21, 22, 23. ábra) (174). Ez az eredmény összhangban van azzal az irodalomban található tanulmánnyal, miszerint a decorin képes aktiválni az IGF-1-receptort, fokozva az Akt foszforilációt vese csillagsejtekben és a normál endothel sejtekben (107). Munkacsoportunk korábbi tanulmányában a Hep3B humán hepatoma sejtvonalakban rekombináns decorin kezelés hatására fokozódott az IGF-1R, az inzulin receptorok, valamint az Akt aktivációja (128). Egy korábbi kutatás szerint pedig az IGF-1R fokozza a p53-mediált apoptózist (175). Az is bebizonyosodott, hogy az adenovírus által transzfektált decorin hatására fokozódik a p53 által kiváltott sejtpusztulás (175). Tehát elképzelhető, hogy a magas decorin szint meggátolja a tumor progresszióját az IGF-1R indukciója révén, amely viszont apoptózist indukál a p53-on keresztül (23. ábra). A p27^{KIP1} fehérje foszforilációjéért az RSK a felelős, és a tumorszuppresszor magi traszlokációját akadályozza meg (176, 177). Ugyan e jelenség a sejtciklus fokozódására utalna, véleményünk szerint a p53 markáns aktivitása, mely feltételezhetően további tumorszuppresszor célfehérjéket (pl. p21^{WAF1/CIP1}) is indukál,

felülírja a p27^{KIP1} funkciójának csökkenését. A megfigyelt jelátviteli változások utalhatnak a gerokonverzió jelenségére is, mely egy, a sejtciklus blokk alatt bekövetkezett sejtnövekedés, vagyis a növekedési szignálok jelenléte ellenére sem következik be sejtsztódás. A gerokonverziót olyan növekedés serkentő és tápanyagérzékeny mechanizmusok idézik elő, mint amilyen az mTOR is (178). A jelenséget megfigyelték már a klinikumban használt bizonyos gyógyszereknél is. Ilyen például a palbociclib, amit metasztatikus emlődaganatban alkalmaznak és jellemzője, hogy bizonyos feltételek mellett képes a gerokonverziót előidézni (179). Ezt, az MDM2 csökkenésével hozzák összefüggésbe, mely a p53 tumorszuppresszor egyik fő inhibitora. A gerokonverzióra jellemző sejtciklus blokk általában a p16^{INK4} és p21^{WAF1/CIP1} fehérjék működéséhez köthető. A p21^{WAF1/CIP1} a p53 célfehérjéje és a decorin jellemzően megemeli a szintjét (180, 181). A p16^{INK4} tekintetében c-jun-nak lehet egyfajta védős szerepe, mivel képes megvédeni a p16^{INK4} promóterét a metiláció általi inaktiválódástól (182). Mivel a c-jun szintjének emelkedését tapasztaltuk, ezért elképzelhető, hogy ilyen módon a p16^{INK4} mennyisége fokozódik. A p53 foszforilációjáért felelős lehet mind az AMPK, mely esetében decorin hatására mennyisége emelkedett, valamint az LKB1 is, mely aktivitását a csökkent ERK1/2 fokozhatja (183-185).

Az irodalmból ismert, hogy a decorin daganatgátló hatását az RTK-ok gátlásán keresztül fejt ki (67, 106, 109, 110, 119, 120). Kísérletes rendszerünkben a decorinnal transzfektált, TAA kezelt állatokban számos RTK csökkent aktivációját detektáltuk a kontroll csoporthoz képest (nevezetesen: EGFR, PDGFR α , PDGFR β , PDGFR/Flt-3, PDGFR/SCF, AXL, HGF/MSPR, MuSK). Ezzel összhangban, decorin hatására csökkent ERK1/2 aktivitást mértünk.

Az irodalmi adatok alapján a decorin hatékony RTK gátló, így joggal merül fel a kérdés, vajon használható-e a decorin mint fiziológiás RTK gátló a máj daganatos megbetegedéseiben. *In silico*, *in vitro* és *in vivo* kísérleteink, valamint humán biopsziás mintákon történő vizsgálataink válasszal szolgálnak arra, hogy a decorin védő szereppel bír primer HCC-val szemben. Emellett a decorin a szervezetben fiziológiásan is előforduló molekula, mely mennyisége megfigyeléseink alapján a májdaganatok körül felszaporodik, így feltehetően a test természetes védekező mechanizmusának része.



32. ábra A HCC jelenleg forgalomban lévő célzott terápiás készítményei (Sorafenib, Lenvatinib) és azok molekuláris targetjei, valamint a decorin, mint lehetséges gátlószer ismert célpontjai.

A jelenleg érvényben lévő protokollok alapján a HCC korai stádiumban diagnosztizálva műtéti rezekcióval vagy májátültetéssel kezelhetőek (2, 17, 18), de mivel a döntő hányada cirrhotikus májban alakul ki, a rezekciót csupán a betegek kb. 15%-nál lehet elvégezni és általában rossz a prognózisa. Számos egyéb kezelési lehetőség is létezik, ami az életminőség javulását és hosszabb túlélést biztosíthat. A nemrégiben megjelent daganatellenes terápia új módszere a célzott támadáspontú gyógyszerek alkalmazása, melyek közül a HCC esetén alkalmazott legrégebben forgalomban lévő készítmény a Sorafenib (Nexavar) egy VEGFR és PDGFR, valamint Raf kináz gátló molekula (32. ábra) (20, 21). A Sorafenib mellett első vonalban alkalmazható RTK gátló a Lenvatinib (Lenvima), azon betegek számára, akik műtéti úton nem kezelhetőek. A Lenvatinib a VEGFR, PDGFR, FGFR, cKIT és cMET receptorok hatékony gátlószere (32. ábra) (22, 23). Továbbá az FDA 2017-ben jóváhagyott egy második vonalbeli célzott terápiás készítményt is, a Regorafenib (Stivarga) alkalmazását a korábban Sorafenibvel kezelt betegek kezelésére (22). A fent

említett gyógyszerek targetjeinek mindegyike a decorinnak is célpontja, sőt a decorin a májdaganatok kialakulásában kiemelt jelentőségű Met és EGFR receptorokat is gátolja, melyre a Sorafenib és Lenvatinib nem alkalmas (32. ábra).

Mindezek alapján gyakorlati alkalmazása májdaganatokban szenvedő betegeknél akár egyedül, akár neoadjuvánsként, esetleg prevenció céllal nem megalapozatlan.

5.2. Decorin szerepe colon adenocarcinoma májmetasztázisában

Munkám során, a HCC vizsgálatok mellett, célul tűztem ki a decorin szerepének vizsgálatát colon adenocarcinoma májmetasztázis esetében is.

Nyman és mtsai. szerint (186) *in vivo* és *in vitro* vastagbél-daganat modellben a decorin expresszió teljesen blokkolt. Továbbá, adenovírus által indukált decorin csökkenti a vastagbélrák kolonizáló képességét (186). Más tanulmányok kimutatták, hogy a decorin hiánya az egerekben vastagbél-daganat kialakulásához vezet. A magas decorin szint *in vitro* gátolta a vastagbél adenocarcinoma sejtek proliferációját és migrációját, valamint apoptózist indukált a sejtekben, amely összefüggésben lehet az E-cadherin csökkent expressziójával (54, 55). Ezzel összhangban az adenovírus-mediált decorin és GM-CSF (granulocita-monocita kolónia stimuláló faktor) génbevitel gátolja a tumor növekedését a colorectális carcinoma modellben (187). Kimutatták, hogy ebben a tumortípusban a decorin tumorszupresszor hatását a sejtciklus G1 fázisának gátlásán keresztül feje ki (188).

Más tanulmányok szerint, az osteosarcoma sejtek decorin expressziója gátolja a tüdőbe történő metasztatizálásukat (142). Hasonló eredmények születtek a decorin vírus által történő overexpressziója során, gátolta az emlőrák növekedését, valamint annak különböző szervekben történő metasztázis képződését (117, 140, 141, 149).

Ugyanakkor az irodalomban semmilyen információt nem találunk a decorin szerepéről colon adenocarcinoma májmetasztázisában. Ezért munkám során TMA blokk készítéséhez humán biopsziás mintákat gyűjtöttünk colon adenocarcinoma májmetasztázis esetekből. Egy-egy betegből a normál vastagbél nyálkahártyát, primer daganatot, májmetasztázist és a nem tumoros környező májszövetet is felhasználtuk. Eredményeink szerint, a legmagasabb decorin expresszió az ép vastagbél nyálkahártyában volt, emellett a primer tumor strómájában is bőséges mennyiségű proteoglikán volt detektálható (25. ábra). Ugyanezen

minta májmetasztázisában szignifikánsan alacsonyabb decorin látható, a primer tumorhoz képest. Emellett vizsgáltuk a decorin megoszlását a májmetasztázisok növekedési mintázatának tükrében és azt tapasztaltuk, hogy az agresszívebb, „replacement” típusú májmetasztázisban kevesebb decorin volt mérhető, mint a „desmoplasticus”-ban. A decorin mennyisége alacsonyabb volt a Grade III. típusú CRC-k májmetasztázisaiban, a Grade II.-höz képest. Ezzel párhuzamosan kevesebb decorint mértünk a Grade III. májmetasztázisokban a primer tumor párjaikhoz viszonyítva, mint a Grade II stádiumú tumorok esetében. Mindezek arra engednek következtetni, hogy összefüggés lehet a decorin mennyisége és a tumor agresszivitása között (25. ábra).

Mivel a csillagsejtek a decorin fő termelői, megvizsgáltuk, hogy a colon adenocarcinoma sejtek képesek-e közvetlenül befolyásolni a máj csillagsejtjeinek decorin termelését. Szignifikánsan csökkent decorin mennyiséget mértünk az LX2 sejtek tápfolyadékában, amennyiben HT29 humán colon adenocarcinoma sejtek kondicionált médiumában növesztettük őket (26. ábra). Ezek az eredményeink jó egyezést mutatnak a korábban bemutatott vizsgálatokkal, miszerint különféle humán hepatoma sejtek gátolják az LX2 sejtek decorin termelését, mind fehérje, mind pedig mRNS szinten (189). Ezek az adatok, valamint a humán CRC szövetmintákban megfigyelt eredményeink bizonyítják a decorin tumorelles szerepét colon adenocarcinomában és májáltéteiben.

Megállapításaink összhangban vannak korábbi irodalmi adatokkal, amelyekben adenovírus-mediált decorin géntranszfer gátolja a vastagbél és laphám carcinoma (147), urothelialis daganatok (71), prosztataraák (148), emlőrák csontmetasztázis (140), illetve a hasnyálmirigy daganatok proliferációját (173).

In vivo állatkísérletes modellünkben, a hidrodinamikusan géntranszferrel bejuttatott decorin, a c38 colorectális carcinoma sejtek lépbe való oltását követően szignifikánsan csökkentette az EGFR, PDGFR és HGF/MSPR receptorok aktivitását (29. ábra), melyek mindegyike ismert targetjei a decorinnak (57, 106, 110). Ennek következtében a RAS/MEK/ERK, az Akt/mTOR/S6K és a PLC γ jelátviteli útvonalak gátlása következett be (31. ábra, 12. táblázat). A decorin hatására a c38-oltott egerekben emelkedett az AMPK fehérje szintje, mely számos celluláris folyamatban kimagasló szerepet tölt be, így például a sejtnövekedésben, az autofágiában, illetve a metabolizmusban is (190). Korábbi kutatások

szerint a decorin fokozza a AMPK-mediált autofágiát, és ezzel egyidejűleg gátolja a PI3K/Akt/mTOR/p70S6K anti-autofágiás jelátviteli mechanizmust (191, 192). Ezekkel összhangban azt feltételezzük, hogy az AMPK felel az mTORC2 komplex fokozott expressziójáért, melyet az Akt 473 pozíciójú szerin aminosavon történő fokozott foszforiláció okoz (193). Az AMPK által kiváltott autofágiát tovább fokozza a fehérje inhibitorának, a WNK1-nek csökkent szintje (194). A WNK1-et foszforilálja az Akt is, így kiváltva egy negatív visszacsatolási hurkot (195). Az LKB1 az AMPK egyik fő stimulátora (190). Ugyan kísérleteink során nem mértük az LKB1 szintet, de ismert, hogy az ERK1/2 gátolja az LKB1 tumorszupresszor aktivitását (183), így feltételezzük, hogy a decorin által gátolt ERK1/2 szabadon engedi az LKB1 fehérjét, így fokozni képes az AMPK aktivitását (31. ábra). Ezen megfigyelések alapján azt gondoljuk, hogy a decorin elősegítheti az autofágia kialakulását kolonizációs modell-rendszerünkben, azonban további megerősítő vizsgálatokra van szükség. Az LKB1/AMPK/mTOR jelátviteli útvonal a sejtciklus szabályozás egyik fő szabályozója, és a MAP kinázokkal együttesen a metabolikus átprogramozás szabályozásáért felelnek (183, 196). Ez arra utalhat, hogy a decorin döntő szerepet játszik a daganat sejtek metabolizmusában, iránya ellentétes lehet a Warburg-effektussal, ám ezek tisztázására jövőbeli vizsgálatok elengedhetetlenek.

In vivo kolonizációs modellünkben, a bejutatott decorin fokozott p38 MAPK/MSK/CREB aktivitáshoz vezetett pLIVE-0 csoporttal szemben (31. ábra, 12. táblázat). Ismert, hogy ez az útvonal a sejtciklus blokkolását indukálhatja mind G1/S, mind pedig G2/M fázisban (197). Az aktív útvonal eredményeképpen, a p38 és a CREB közvetlenül foszforilálja és ezáltal fokozza a p53 tumorszupresszor aktivitását (198, 199). A p53 hatását tovább erősíti az AMPK/LKB1 foszforiláció (184, 185). Bár a p38 fehérje aktiválásához vezető extracelluláris jeleket és receptorokat modellünkben nem tudtuk azonosítani, a downstream események a p53-függő blokkolást támasztják alá. Emellett a STAT és a c-Jun fehérjék gátlása szintén támogatja a decorin tumorelles hatását (31. ábra, 12. táblázat). A citokin receptorok mellett a STAT-ok RTK-ok által is szabályozottak, melyek a decorin ismert targetjei, így a gátolt STAT expresszió a decorin RTK aktivitás csökkent hatásának is betudható (200). A decorin transzfekció hatására kialakult jelentős p-c-Jun csökkenés, a csökkent ERK1/2 aktivitás következménye lehet, amely a c-Jun ismert

aktivátora (201, 202). Eredményeink során fokozott JNK szintet detektáltunk, amelyek a c-Jun protoonkogén fehérje fő aktivátora, ugyanakkor apoptózis indukcióra is képes (203). Nem zárható ki tehát, hogy a jelen körülmények között ez a funkciója érvényesül. A c-Jun mellett, a JNK is stabilizálja és aktiválja a p53-at, mely szintén az apoptózis irányába változtatja az eseményeket (204), alátámasztva a fenti megfigyeléseinket.

Vastagbél-daganatban szenvedő betegek részére számos hatékony kezelési lehetőség létezik, ilyen a műtét, a sugárterápia, a kemoterápia, az immunterápia és a célzott terápia (205). A vastagbél-daganat esetében már elfogadottá vált bizonyos molekuláris események, elsősorban az EGFR tirozin kináz receptor által indukált jelátviteli út célzott gátlása. A legismertebb jelenleg forgalomban lévő EGFR-gátlók a Cetuximab (Erbix) és a Panitumumab (Vectibix) (205, 206). A decorinról ismert, hogy hatékonyan gátolja nemcsak az EGFR, hanem a VEGFR, PDGFR, Met és Raf kinázok aktivitását is, így a decorin terápiás célú felhasználásának lehetősége akár önmagában vagy adjuvánsként is elképzelhető.

6. KÖVETKEZTETÉSEK

Munkám célja a decorin szerepének, valamint molekuláris hátterének tanulmányozása volt HCC-ban és colon adenocarcinoma májmetasztázisában. Eredményeinkből az alábbi következtetések vonhatók le:

1. A proteoglikán hiánya túlélési előnyt biztosít a tumorszövet számára.

- a. In silico vizsgálataink során a HCC minták tumor strómájában szignifikánsan kevesebb relatív decorin expresszió volt mérhető, szemben az ugyanazon minta tumort környező szövetével, valamint a kontroll mintával.
- b. A HCC stádium előrehaladottságával a proteoglikán relatív expressziója szignifikánsan csökkent.
- c. Csökkent relatív DCN/SMA expressziót mértünk a humán HCC mintákban, összehasonlítva ugyanazon beteg nem tumoros környező májszövetével.
- d. Humán HCC esetekből készített szöveti szöveti microarrayk vizsgálatával megállapítottuk, hogy a mintáink 52%-ban negatív, 33%-ban pedig alacsony a decorin expresszió, és csupán a minták 15%-ában mértünk magas decorin immunpozitivitást.
- e. Humán colon adenocarcinoma májajátéteiben szignifikánsan csökkent a decorin expresszió, azok primer tumoraikhoz képest, emellett csökkent decorint mértünk az agresszívebb „replacement” növekedési mintázatú májmetasztázisokban, a „desmoplasticus”-sal szemben. Kevesebb decorin volt a Grade III. típusú májmetasztázisokban és azok primer tumoraiban, a Grade II.-höz képest, mindezek felvetik a lehetőségét a decorin mennyisége és a tumor agresszivitása közötti összefüggésnek.
- f. Szignifikánsan kevesebb decorin volt mérhető az LX2 sejtek médiumában, amikor HLE, HepG2, HuH7 hepatoma sejtek, valamint HT29 colon adenocarcinoma sejtek kondicionált médiumában növesztettük őket.

- 2. A decorin *in vivo* védelmet nyújt a tumorképződéssel szemben, ezt támasztják alá mind a hepatocarcinogenesis vizsgálataink, mind pedig a kolonizációs modellünk is.**
- a. *In vivo* hepatocarcinogenezis modellünkben, a magas decorin szint gátolta a daganatképződést. Emellett decorin számos RTK aktivitását csökkentette, melyet alacsony MAPK/ERK működés jellemzett. Ezzel szemben az IGF-1R indukcióját figyeltük meg, melyhez fokozott Akt/mTOR aktivitás társult. A gátolt tumorigenezisért feltételezhetően az emelkedett foszfo-p53 szint tehető felelőssé.
 - b. *In vivo* kolonizációs modellünkben a decorin tumorgátló hatását a RTK-ok gátlásán keresztül fejtette ki, ezzel párhuzamosan csökkent a MAPK/ERK és az Akt/mTOR/p70S6K utak aktivitása. A fokozott AMPK (valószínűleg LKB1 útján), valamint p38/MSK/CREB jelátviteli utak megnövekedett foszfo-p53 szintet eredményeztek, aminek hatására a sejtciklus blokádnak alá került.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A hepatocelluláris carcinoma (HCC) világszerte a negyedik, a colorectális carcinoma pedig a második leggyakoribb rosszindulatú daganat. A decorin az ECM kis leucinban-gazdag proteoglikánja, mely a daganatok körül, a daganatos mikrokozonyezetben is kimutatható. Munkacsoportunk korábbi tanulmányai szerint a decorin génhiányos egerekben fokozott fibrogenesis mellett, fokozott hepatocarcinogenesis volt megfigyelhető. További megfigyelések szerint különböző daganattípusokban csökkent vagy teljesen blokkolt decorin expressziót mérhetünk, ami azt sugallja, hogy a proteoglikán hiánya túlélési előnyt biztosít a tumorsejtek számára. A decorin terápia szerként történő alkalmazásnak lehetőségét számos irodalmi adat támasztja alá, ugyanis különböző kísérleti modellben hatékonyan gátolja a tumor kialakulását, progresszióját, az angiogenezist és a daganatok áttétképződését is. Munkám során célul tűztem ki a proteoglikán szerepének vizsgálatát HCC-ban és colon adenocarcinoma májmetasztázisában. Humán TMA vizsgálataink során megállapítottuk, hogy a decorin mennyisége a legtöbb HCC esetében szignifikánsan csökkent a tumort környező szövetéhez és az ép májhoz képest. A csökkenés mértéke összhangban volt a HCC előrehaladottságával. A humán colon adenocarcinoma májmetasztázis vizsgálataink hasonló eredményeket mutattak, csökkent decorin mennyiség volt mérhető a májmetasztázis mintákon, szemben a primer daganatokkal. Mindemelett, csökkent decorin volt mérhető a „replacement” típusú metasztázisokban, mint a “desmoplasticus”-ban, valamint Grade III. daganatok májmetasztázisokban, összehasonlítva a Grade II.-vel. Mindezek arra engednek következtetni, hogy összefüggés lehet a decorin mennyisége és a daganat aggresszivitása között. *In vitro* kísérleteink során a hepatoma- illetve a colon adenocarcinoma CM gátolták az LX2 csillagsejtek decorin termelését. *In vivo* modellünkben a hidrodinamikusan bevitellel bejutott decorin gátolta a hepatocarcinogenesis és a colon adenocarcinoma májmetasztázis kialakulását. A decorin tumorszupresszor szerepét különböző RTK gátlásán keresztül érte el. Az EGFR fehérje gátlásával párhuzamosan csökkent a MAPK/ERK aktivitása. A fokozott AMPK (valószínűleg LKB1 útján), valamint p38/MSK/CREB jelátviteli utak megnövekedett foszfo-p53 szintet eredményeztek, aminek hatására a sejtciklus gátlódott. Összefoglalva, a decorin, mint „az ECM aktív harcosa” felbecsülhetetlen értékű „fegyver” lehet a primer és metasztatikus májdaganatok elleni küzdelemben.

8. SUMMARY

Hepatocellular carcinoma (HCC) and colorectal (CRC) cancer represent the fourth and the second most common cause of cancer death worldwide. Regarding liver tumors, there was hardly any data on the role of decorin. To fill up this gap, we hypothesized that decorin may act as a tumor suppressor in HCC and liver metastasis. The tumor microenvironment plays a determining role in cancer development by regulating multiple processes between the extracellular matrix and tumor cells. Decorin, a prototype member of the SLRP family has gained recognition for its essential roles in several disorders including cancer. Studies on mice with ablated decorin gene revealed that the lack of decorin is permissive for tumor development. On the same note, reduced expression or abrogation of decorin was observed in several types of cancer, suggesting that decorin tends to act as a tumor suppressor in these contexts. Moreover, when applied as a therapeutic agent, decorin effectively inhibited tumor formation, progression, angiogenesis, and metastasis in a multitude of experimental models. In my dissertation, we report that decorin expression was significantly downregulated in most HCCs compared to non-adjacent tissue and normal liver. In addition, decorin content seems to follow the staging of HCC. Similarly, the liver metastasis of colorectal cancer often displayed reduced amounts of decorin compared to the primary tumor, and to a greater extent in the more aggressive Grade III tumors, and in metastases with replacement growing pattern. These observations suggest that the decreased decorin expression in liver metastasis of CRC may correlate with the aggressiveness of the tumor. Conditioned media from colon adenocarcinoma cells and hepatoma cells *in vitro* were able to attenuate decorin production of the LX2 stellate cell line of liver origin. Moreover, liver-targeted decorin delivery effectively inhibited hepatic tumor formation and metastatic spreading of colon cancer. As a mechanism of action, excessive decorin was able to reduce the activity of multiple RTKs including EGFR, an important player in HCC and CRC pathogenesis. Downstream of that, hindered signaling network was seen including ERK1/2, PLC γ , Akt/mTOR, STAT, and c-Jun pathways, while p38 MAPK/MSK/CREB and AMPK displayed intensified action culminating in enhanced p53 function. Therefore, decorin as “a guardian from the matrix” may be an invaluable tool in combatting colorectal and hepatic cancer.

9. IRODALOMJEGYZÉK

1. Bosetti C, Turati F, La Vecchia C. (2014) Hepatocellular carcinoma epidemiology. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 28: 753-770.
2. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. (2018) Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 68: 394-424.
3. Balogh J, Victor D, 3rd, Asham EH, Burroughs SG, Boktour M, Saharia A, Li X, Ghobrial RM, Monsour HP, Jr. (2016) Hepatocellular carcinoma: a review. *J Hepatocell Carcinoma*, 3: 41-53.
4. Chimed T, Sandagdorj T, Znaor A, Laversanne M, Tseveen B, Genden P, Bray F. (2017) Cancer incidence and cancer control in Mongolia: Results from the National Cancer Registry 2008-12. *Int J Cancer*, 140: 302-309.
5. Wong CM, Ng IO. (2008) Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *Liver Int*, 28: 160-174.
6. Schutte K, Schulz C, Poranzke J, Antweiler K, Bornschein J, Bretschneider T, Arend J, Rieke J, Malfertheiner P. (2014) Characterization and prognosis of patients with hepatocellular carcinoma (HCC) in the non-cirrhotic liver. *BMC Gastroenterol*, 14: 117.
7. Moudgil V, Redhu D, Dhanda S, Singh J. (2013) A review of molecular mechanisms in the development of hepatocellular carcinoma by aflatoxin and hepatitis B and C viruses. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, 32: 165-175.
8. Monga SP. (2015) beta-Catenin Signaling and Roles in Liver Homeostasis, Injury, and Tumorigenesis. *Gastroenterology*, 148: 1294-1310.
9. Kondo Y, Kanai Y, Sakamoto M, Genda T, Mizokami M, Ueda R, Hirohashi S. (1999) Beta-catenin accumulation and mutation of exon 3 of the beta-catenin gene in hepatocellular carcinoma. *Jpn J Cancer Res*, 90: 1301-1309.

10. Hsu HC, Jeng YM, Mao TL, Chu JS, Lai PL, Peng SY. (2000) Beta-catenin mutations are associated with a subset of low-stage hepatocellular carcinoma negative for hepatitis B virus and with favorable prognosis. *Am J Pathol*, 157: 763-770.
11. Cui J, Zhou X, Liu Y, Tang Z, Romeih M. (2003) Wnt signaling in hepatocellular carcinoma: analysis of mutation and expression of beta-catenin, T-cell factor-4 and glycogen synthase kinase 3-beta genes. *J Gastroenterol Hepatol*, 18: 280-287.
12. Villanueva A, Newell P, Chiang DY, Friedman SL, Llovet JM. (2007) Genomics and signaling pathways in hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis*, 27: 55-76.
13. Roberts AB, Wakefield LM. (2003) The two faces of transforming growth factor beta in carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 8621-8623.
14. Thorgeirsson SS, Grisham JW. (2002) Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nat Genet*, 31: 339-346.
15. Kanai Y, Ushijima S, Hui AM, Ochiai A, Tsuda H, Sakamoto M, Hirohashi S. (1997) The E-cadherin gene is silenced by CpG methylation in human hepatocellular carcinomas. *Int J Cancer*, 71: 355-359.
16. Khatri VP, Petrelli NJ, Belghiti J. (2005) Extending the frontiers of surgical therapy for hepatic colorectal metastases: is there a limit? *J Clin Oncol*, 23: 8490-8499.
17. Roxburgh P, Evans TR. (2008) Systemic therapy of hepatocellular carcinoma: are we making progress? *Adv Ther*, 25: 1089-1104.
18. Ramakrishna G, Rastogi A, Trehanpati N, Sen B, Khosla R, Sarin SK. (2013) From cirrhosis to hepatocellular carcinoma: new molecular insights on inflammation and cellular senescence. *Liver Cancer*, 2: 367-383.
19. Essadi I, Sbitti Y, Fetohi M, Slimani KA, Essadi M, Tazi E, Ichou M, Errihani H. (2011) Treatment of Liver Metastases From Colorectal Cancer: Medico-Surgical Strategies. *Gastroenterology Res*, 4: 122-124.
20. Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF, de Oliveira AC, Santoro A, Raoul JL, Forner A, Schwartz M, Porta C, Zeuzem S, Bolondi L, Greten TF, Galle PR, Seitz JF, Borbath I, Haussinger D, Giannaris T, Shan M, Moscovici M, Voliotis D, Bruix J, Group SIS. (2008) Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med*, 359: 378-390.

21. Cheng AL, Kang YK, Chen Z, Tsao CJ, Qin S, Kim JS, Luo R, Feng J, Ye S, Yang TS, Xu J, Sun Y, Liang H, Liu J, Wang J, Tak WY, Pan H, Burock K, Zou J, Voliotis D, Guan Z. (2009) Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: a phase III randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Oncol*, 10: 25-34.
22. Raoul JL, Kudo M, Finn RS, Edeline J, Reig M, Galle PR. (2018) Systemic therapy for intermediate and advanced hepatocellular carcinoma: Sorafenib and beyond. *Cancer Treat Rev*, 68: 16-24.
23. Bangaru S, Marrero JA, Singal AG. (2020) Review article: new therapeutic interventions for advanced hepatocellular carcinoma. *Aliment Pharmacol Ther*, 51: 78-89.
24. Frantz C, Stewart KM, Weaver VM. (2010) The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci*, 123: 4195-4200.
25. Theocharis AD, Manou D, Karamanos NK. (2019) The extracellular matrix as a multitasking player in disease. *FEBS J*, 286: 2830-2869.
26. Sorushanova A, Delgado LM, Wu Z, Shologu N, Kshirsagar A, Raghunath R, Mullen AM, Bayon Y, Pandit A, Raghunath M, Zeugolis DI. (2019) The Collagen Suprafamily: From Biosynthesis to Advanced Biomaterial Development. *Adv Mater*, 31: e1801651.
27. Theocharis AD, Skandalis SS, Gialeli C, Karamanos NK. (2016) Extracellular matrix structure. *Adv Drug Deliv Rev*, 97: 4-27.
28. Tanzer ML. (2006) Current concepts of extracellular matrix. *J Orthop Sci*, 11: 326-331.
29. Sevic I, Spinelli FM, Cantero MJ, Reszegi A, Kovalszky I, Garcia MG, Alaniz L. The Role of the Tumor Microenvironment in the Development and Progression of Hepatocellular Carcinoma. In: JEE Tirnitz-Parker (szerk.), *Hepatocellular Carcinoma*. Brisbane (AU), 2019.
30. Pickup MW, Mouw JK, Weaver VM. (2014) The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer. *EMBO Rep*, 15: 1243-1253.

31. Barash H, E RG, Edrei Y, Ella E, Israel A, Cohen I, Corchia N, Ben-Moshe T, Pappo O, Pikarsky E, Goldenberg D, Shiloh Y, Galun E, Abramovitch R. (2010) Accelerated carcinogenesis following liver regeneration is associated with chronic inflammation-induced double-strand DNA breaks. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107: 2207-2212.
32. Greenbaum LE. (2004) Cell cycle regulation and hepatocarcinogenesis. *Cancer Biol Ther*, 3: 1200-1207.
33. Arriazu E, Ruiz de Galarreta M, Cubero FJ, Varela-Rey M, Perez de Obanos MP, Leung TM, Lopategi A, Benedicto A, Abraham-Enachescu I, Nieto N. (2014) Extracellular matrix and liver disease. *Antioxid Redox Signal*, 21: 1078-1097.
34. Baghy K, Tatrai P, Regos E, Kovalszky I. (2016) Proteoglycans in liver cancer. *World J Gastroenterol*, 22: 379-393.
35. Kjellen L, Lindahl U. (1991) Proteoglycans: structures and interactions. *Annu Rev Biochem*, 60: 443-475.
36. Schaefer L, Schaefer RM. (2010) Proteoglycans: from structural compounds to signaling molecules. *Cell Tissue Res*, 339: 237-246.
37. Beauvais DM, Rapraeger AC. (2004) Syndecans in tumor cell adhesion and signaling. *Reprod Biol Endocrinol*, 2: 3.
38. Perrimon N, Bernfield M. (2001) Cellular functions of proteoglycans--an overview. *Semin Cell Dev Biol*, 12: 65-67.
39. Pietraszek-Gremplewicz K, Karamanou K, Niang A, Dauchez M, Belloy N, Maquart FX, Baud S, Brezillon S. (2019) Small leucine-rich proteoglycans and matrix metalloproteinase-14: Key partners? *Matrix Biol*, 75-76: 271-285.
40. Kobe B, Deisenhofer J. (1993) Crystallization and preliminary X-ray analysis of porcine ribonuclease inhibitor, a protein with leucine-rich repeats. *J Mol Biol*, 231: 137-140.
41. Weber IT, Harrison RW, Iozzo RV. (1996) Model structure of decorin and implications for collagen fibrillogenesis. *J Biol Chem*, 271: 31767-31770.
42. McEwan PA, Scott PG, Bishop PN, Bella J. (2006) Structural correlations in the family of small leucine-rich repeat proteins and proteoglycans. *J Struct Biol*, 155: 294-305.

43. Schaefer L, Iozzo RV. (2008) Biological functions of the small leucine-rich proteoglycans: from genetics to signal transduction. *J Biol Chem*, 283: 21305-21309.
44. Chen S, Birk DE. (2011) Focus on molecules: decorin. *Exp Eye Res*, 92: 444-445.
45. Iozzo RV, Sanderson RD. (2011) Proteoglycans in cancer biology, tumour microenvironment and angiogenesis. *J Cell Mol Med*, 15: 1013-1031.
46. Iozzo RV. (1997) The family of the small leucine-rich proteoglycans: key regulators of matrix assembly and cellular growth. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 32: 141-174.
47. Iozzo RV, Schaefer L. (2010) Proteoglycans in health and disease: novel regulatory signaling mechanisms evoked by the small leucine-rich proteoglycans. *FEBS J*, 277: 3864-3875.
48. Sofeu Feugaing DD, Gotte M, Viola M. (2013) More than matrix: the multifaceted role of decorin in cancer. *Eur J Cell Biol*, 92: 1-11.
49. Danielson KG, Baribault H, Holmes DF, Graham H, Kadler KE, Iozzo RV. (1997) Targeted disruption of decorin leads to abnormal collagen fibril morphology and skin fragility. *J Cell Biol*, 136: 729-743.
50. Schaefer L, Macakova K, Raslik I, Micegova M, Grone HJ, Schonherr E, Robenek H, Echtermeyer FG, Grassel S, Bruckner P, Schaefer RM, Iozzo RV, Kresse H. (2002) Absence of decorin adversely influences tubulointerstitial fibrosis of the obstructed kidney by enhanced apoptosis and increased inflammatory reaction. *Am J Pathol*, 160: 1181-1191.
51. Pulkkinen L, Kainulainen K, Krusius T, Makinen P, Schollin J, Gustavsson KH, Peltonen L. (1990) Deficient expression of the gene coding for decorin in a lethal form of Marfan syndrome. *J Biol Chem*, 265: 17780-17785.
52. Seidler DG, Faiyaz-Ul-Haque M, Hansen U, Yip GW, Zaidi SH, Teebi AS, Kiesel L, Gotte M. (2006) Defective glycosylation of decorin and biglycan, altered collagen structure, and abnormal phenotype of the skin fibroblasts of an Ehlers-Danlos syndrome patient carrying the novel Arg270Cys substitution in galactosyltransferase I (beta4GalT-7). *J Mol Med (Berl)*, 84: 583-594.

53. Jarvelainen H, Puolakkainen P, Pakkanen S, Brown EL, Hook M, Iozzo RV, Sage EH, Wight TN. (2006) A role for decorin in cutaneous wound healing and angiogenesis. *Wound Repair Regen*, 14: 443-452.
54. Bi X, Tong C, Dockendorff A, Bancroft L, Gallagher L, Guzman G, Iozzo RV, Augenlicht LH, Yang W. (2008) Genetic deficiency of decorin causes intestinal tumor formation through disruption of intestinal cell maturation. *Carcinogenesis*, 29: 1435-1440.
55. Bi X, Pohl NM, Qian Z, Yang GR, Gou Y, Guzman G, Kajdacsy-Balla A, Iozzo RV, Yang W. (2012) Decorin-mediated inhibition of colorectal cancer growth and migration is associated with E-cadherin in vitro and in mice. *Carcinogenesis*, 33: 326-330.
56. Iozzo RV, Chakrani F, Perrotti D, McQuillan DJ, Skorski T, Calabretta B, Eichstetter I. (1999) Cooperative action of germ-line mutations in decorin and p53 accelerates lymphoma tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96: 3092-3097.
57. Horvath Z, Kovalszky I, Fullar A, Kiss K, Schaff Z, Iozzo RV, Baghy K. (2014) Decorin deficiency promotes hepatic carcinogenesis. *Matrix Biol*, 35: 194-205.
58. Leygue E, Snell L, Dotzlaw H, Troup S, Hiller-Hitchcock T, Murphy LC, Roughley PJ, Watson PH. (2000) Lumican and decorin are differentially expressed in human breast carcinoma. *J Pathol*, 192: 313-320.
59. Campioni M, Ambrogi V, Pompeo E, Citro G, Castelli M, Spugnini EP, Gatti A, Cardelli P, Lorenzon L, Baldi A, Mineo TC. (2008) Identification of genes down-regulated during lung cancer progression: a cDNA array study. *J Exp Clin Cancer Res*, 27: 38.
60. Nash MA, Deavers MT, Freedman RS. (2002) The expression of decorin in human ovarian tumors. *Clin Cancer Res*, 8: 1754-1760.
61. Smid-Koopman E, Blok LJ, Chadha-Ajwani S, Helmerhorst TJ, Brinkmann AO, Huikeshoven FJ. (2000) Gene expression profiles of human endometrial cancer samples using a cDNA-expression array technique: assessment of an analysis method. *Br J Cancer*, 83: 246-251.

62. Troup S, Njue C, Kliewer EV, Parisien M, Roskelley C, Chakravarti S, Roughley PJ, Murphy LC, Watson PH. (2003) Reduced expression of the small leucine-rich proteoglycans, lumican, and decorin is associated with poor outcome in node-negative invasive breast cancer. *Clin Cancer Res*, 9: 207-214.
63. Matsumine A, Shintani K, Kusuzaki K, Matsubara T, Satonaka H, Wakabayashi T, Iino T, Uchida A. (2007) Expression of decorin, a small leucine-rich proteoglycan, as a prognostic factor in soft tissue tumors. *J Surg Oncol*, 96: 411-418.
64. Neill T, Schaefer L, Iozzo RV. (2015) Oncosuppressive functions of decorin. *Mol Cell Oncol*, 2: e975645.
65. Bozoky B, Savchenko A, Guven H, Ponten F, Klein G, Szekely L. (2014) Decreased decorin expression in the tumor microenvironment. *Cancer Med*, 3: 485-491.
66. McDoniels-Silvers AL, Nimri CF, Stoner GD, Lubet RA, You M. (2002) Differential gene expression in human lung adenocarcinomas and squamous cell carcinomas. *Clin Cancer Res*, 8: 1127-1138.
67. Iozzo RV, Buraschi S, Genua M, Xu SQ, Solomides CC, Peiper SC, Gomella LG, Owens RC, Morrione A. (2011) Decorin antagonizes IGF receptor I (IGF-IR) function by interfering with IGF-IR activity and attenuating downstream signaling. *J Biol Chem*, 286: 34712-34721.
68. Kristensen IB, Pedersen L, Ro TB, Christensen JH, Lyng MB, Rasmussen LM, Ditzel HJ, Borset M, Abildgaard N. (2013) Decorin is down-regulated in multiple myeloma and MGUS bone marrow plasma and inhibits HGF-induced myeloma plasma cell viability and migration. *Eur J Haematol*, 91: 196-200.
69. Wu IC, Wu DC, Huang CC, Lin HS, Chen YK, Tsai HJ, Lu CY, Chou SH, Chou YP, Li LH, Tai SY, Wu MT. (2010) Plasma decorin predicts the presence of esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*, 127: 2138-2146.
70. Li X, Pennisi A, Yaccoby S. (2008) Role of decorin in the antimyeloma effects of osteoblasts. *Blood*, 112: 159-168.
71. Sainio A, Nyman M, Lund R, Vuorikoski S, Bostrom P, Laato M, Bostrom PJ, Jarvelainen H. (2013) Lack of decorin expression by human bladder cancer cells offers new tools in the therapy of urothelial malignancies. *PLoS One*, 8: e76190.

72. Bostrom P, Sainio A, Kakko T, Savontaus M, Soderstrom M, Jarvelainen H. (2013) Localization of decorin gene expression in normal human breast tissue and in benign and malignant tumors of the human breast. *Histochem Cell Biol*, 139: 161-171.
73. Henke A, Grace OC, Ashley GR, Stewart GD, Riddick AC, Yeun H, O'Donnell M, Anderson RA, Thomson AA. (2012) Stromal expression of decorin, Semaphorin6D, SPARC, Sprouty1 and Tsukushi in developing prostate and decreased levels of decorin in prostate cancer. *PLoS One*, 7: e42516.
74. Duncan MB. (2013) Extracellular matrix transcriptome dynamics in hepatocellular carcinoma. *Matrix Biol*, 32: 393-398.
75. Iozzo RV, Sampson PM, Schmitt GK. (1989) Neoplastic modulation of extracellular matrix: stimulation of chondroitin sulfate proteoglycan and hyaluronic acid synthesis in co-cultures of human colon carcinoma and smooth muscle cells. *J Cell Biochem*, 39: 355-378.
76. Iozzo RV, Bolender RP, Wight TN. (1982) Proteoglycan changes in the intercellular matrix of human colon carcinoma: an integrated biochemical and stereologic analysis. *Lab Invest*, 47: 124-138.
77. Iozzo RV, Wight TN. (1982) Isolation and characterization of proteoglycans synthesized by human colon and colon carcinoma. *J Biol Chem*, 257: 11135-11144.
78. Santra M, Skorski T, Calabretta B, Lattime EC, Iozzo RV. (1995) De novo decorin gene expression suppresses the malignant phenotype in human colon cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92: 7016-7020.
79. Brown LF, Guidi AJ, Schnitt SJ, Van De Water L, Iruela-Arispe ML, Yeo TK, Tognazzi K, Dvorak HF. (1999) Vascular stroma formation in carcinoma in situ, invasive carcinoma, and metastatic carcinoma of the breast. *Clin Cancer Res*, 5: 1041-1056.
80. Campo S, Campo GM, Avenoso A, D'Ascola A, Musolino C, Calabro L, Bellomo G, Quartarone E, Calatroni A. (2006) Lymphocytes from patients with early stage of B-cell chronic lymphocytic leukaemia and long survival synthesize decorin. *Biochimie*, 88: 1933-1939.

81. Salomaki HH, Sainio AO, Soderstrom M, Pakkanen S, Laine J, Jarvelainen HT. (2008) Differential expression of decorin by human malignant and benign vascular tumors. *J Histochem Cytochem*, 56: 639-646.
82. Yamaguchi Y, Mann DM, Ruoslahti E. (1990) Negative regulation of transforming growth factor-beta by the proteoglycan decorin. *Nature*, 346: 281-284.
83. Jarvinen TA, Prince S. (2015) Decorin: A Growth Factor Antagonist for Tumor Growth Inhibition. *Biomed Res Int*, 2015: 654765.
84. Jarvinen TA, Ruoslahti E. (2013) Targeted Antiscarring Therapy for Tissue Injuries. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 2: 50-54.
85. Baghy K, Dezso K, Laszlo V, Fullar A, Peterfia B, Paku S, Nagy P, Schaff Z, Iozzo RV, Kovalszky I. (2011) Ablation of the decorin gene enhances experimental hepatic fibrosis and impairs hepatic healing in mice. *Lab Invest*, 91: 439-451.
86. Baghy K, Iozzo RV, Kovalszky I. (2012) Decorin-TGFbeta axis in hepatic fibrosis and cirrhosis. *J Histochem Cytochem*, 60: 262-268.
87. Kolb M, Margetts PJ, Sime PJ, Gauldie J. (2001) Proteoglycans decorin and biglycan differentially modulate TGF-beta-mediated fibrotic responses in the lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 280: L1327-1334.
88. Gubbiotti MA, Vallet SD, Ricard-Blum S, Iozzo RV. (2016) Decorin interacting network: A comprehensive analysis of decorin-binding partners and their versatile functions. *Matrix Biol*, 55: 7-21.
89. Abdel-Wahab N, Wicks SJ, Mason RM, Chantry A. (2002) Decorin suppresses transforming growth factor-beta-induced expression of plasminogen activator inhibitor-1 in human mesangial cells through a mechanism that involves Ca²⁺-dependent phosphorylation of Smad2 at serine-240. *Biochem J*, 362: 643-649.
90. Border WA, Noble NA, Yamamoto T, Harper JR, Yamaguchi Y, Pierschbacher MD, Ruoslahti E. (1992) Natural inhibitor of transforming growth factor-beta protects against scarring in experimental kidney disease. *Nature*, 360: 361-364.
91. Miura T, Kishioka Y, Wakamatsu J, Hattori A, Hennebry A, Berry CJ, Sharma M, Kambadur R, Nishimura T. (2006) Decorin binds myostatin and modulates its activity to muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 340: 675-680.

92. Zhu J, Li Y, Shen W, Qiao C, Ambrosio F, Lavasani M, Nozaki M, Branca MF, Huard J. (2007) Relationships between transforming growth factor-beta1, myostatin, and decorin: implications for skeletal muscle fibrosis. *J Biol Chem*, 282: 25852-25863.
93. Kanzleiter T, Rath M, Gorgens SW, Jensen J, Tangen DS, Kolnes AJ, Kolnes KJ, Lee S, Eckel J, Schurmann A, Eckardt K. (2014) The myokine decorin is regulated by contraction and involved in muscle hypertrophy. *Biochem Biophys Res Commun*, 450: 1089-1094.
94. Argiles JM, Lopez-Soriano FJ, Stemmler B, Busquets S. (2017) Novel targeted therapies for cancer cachexia. *Biochem J*, 474: 2663-2678.
95. Miyamoto Y, Hanna DL, Zhang W, Baba H, Lenz HJ. (2016) Molecular Pathways: Cachexia Signaling-A Targeted Approach to Cancer Treatment. *Clin Cancer Res*, 22: 3999-4004.
96. Sharma M, McFarlane C, Kambadur R, Kukreti H, Bonala S, Srinivasan S. (2015) Myostatin: expanding horizons. *IUBMB Life*, 67: 589-600.
97. Vial C, Gutierrez J, Santander C, Cabrera D, Brandan E. (2011) Decorin interacts with connective tissue growth factor (CTGF)/CCN2 by LRR12 inhibiting its biological activity. *J Biol Chem*, 286: 24242-24252.
98. Lipson KE, Wong C, Teng Y, Spong S. (2012) CTGF is a central mediator of tissue remodeling and fibrosis and its inhibition can reverse the process of fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair*, 5: S24.
99. Luft FC. (2008) CCN2, the connective tissue growth factor. *J Mol Med (Berl)*, 86: 1-3.
100. Kular L, Pakradouni J, Kitabgi P, Laurent M, Martinerie C. (2011) The CCN family: a new class of inflammation modulators? *Biochimie*, 93: 377-388.
101. Nivison MP, Meier KE. (2018) The role of CCN4/WISP-1 in the cancerous phenotype. *Cancer Manag Res*, 10: 2893-2903.
102. Desnoyers L, Arnott D, Pennica D. (2001) WISP-1 binds to decorin and biglycan. *J Biol Chem*, 276: 47599-47607.
103. Bi XL, Yang W. (2013) Biological functions of decorin in cancer. *Chin J Cancer*, 32: 266-269.

104. Bi X, Xia X, Fan D, Mu T, Zhang Q, Iozzo RV, Yang W. (2016) Oncogenic activin C interacts with decorin in colorectal cancer in vivo and in vitro. *Mol Carcinog*, 55: 1786-1795.
105. Nili N, Cheema AN, Giordano FJ, Barolet AW, Babaei S, Hickey R, Eskandarian MR, Smeets M, Butany J, Pasterkamp G, Strauss BH. (2003) Decorin inhibition of PDGF-stimulated vascular smooth muscle cell function: potential mechanism for inhibition of intimal hyperplasia after balloon angioplasty. *Am J Pathol*, 163: 869-878.
106. Baghy K, Horvath Z, Regos E, Kiss K, Schaff Z, Iozzo RV, Kovalszky I. (2013) Decorin interferes with platelet-derived growth factor receptor signaling in experimental hepatocarcinogenesis. *FEBS J*, 280: 2150-2164.
107. Morrione A, Neill T, Iozzo RV. (2013) Dichotomy of decorin activity on the insulin-like growth factor-I system. *FEBS J*, 280: 2138-2149.
108. Neill T, Schaefer L, Iozzo RV. (2012) Decorin: a guardian from the matrix. *Am J Pathol*, 181: 380-387.
109. Santra M, Reed CC, Iozzo RV. (2002) Decorin binds to a narrow region of the epidermal growth factor (EGF) receptor, partially overlapping but distinct from the EGF-binding epitope. *J Biol Chem*, 277: 35671-35681.
110. Iozzo RV, Moscatello DK, McQuillan DJ, Eichstetter I. (1999) Decorin is a biological ligand for the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem*, 274: 4489-4492.
111. Moscatello DK, Santra M, Mann DM, McQuillan DJ, Wong AJ, Iozzo RV. (1998) Decorin suppresses tumor cell growth by activating the epidermal growth factor receptor. *J Clin Invest*, 101: 406-412.
112. Santra M, Eichstetter I, Iozzo RV. (2000) An anti-oncogenic role for decorin. Down-regulation of ErbB2 leads to growth suppression and cytodifferentiation of mammary carcinoma cells. *J Biol Chem*, 275: 35153-35161.
113. Seidler DG, Goldoni S, Agnew C, Cardi C, Thakur ML, Owens RT, McQuillan DJ, Iozzo RV. (2006) Decorin protein core inhibits in vivo cancer growth and metabolism by hindering epidermal growth factor receptor function and triggering apoptosis via caspase-3 activation. *J Biol Chem*, 281: 26408-26418.

114. Csordas G, Santra M, Reed CC, Eichstetter I, McQuillan DJ, Gross D, Nugent MA, Hajnoczky G, Iozzo RV. (2000) Sustained down-regulation of the epidermal growth factor receptor by decorin. A mechanism for controlling tumor growth in vivo. *J Biol Chem*, 275: 32879-32887.
115. Zhu JX, Goldoni S, Bix G, Owens RT, McQuillan DJ, Reed CC, Iozzo RV. (2005) Decorin evokes protracted internalization and degradation of the epidermal growth factor receptor via caveolar endocytosis. *J Biol Chem*, 280: 32468-32479.
116. Liang S, Xu JF, Cao WJ, Li HP, Hu CP. (2013) Human decorin regulates proliferation and migration of human lung cancer A549 cells. *Chin Med J (Engl)*, 126: 4736-4741.
117. Goldoni S, Seidler DG, Heath J, Fassan M, Baffa R, Thakur ML, Owens RT, McQuillan DJ, Iozzo RV. (2008) An antimetastatic role for decorin in breast cancer. *Am J Pathol*, 173: 844-855.
118. Goldoni S, Iozzo RV. (2008) Tumor microenvironment: Modulation by decorin and related molecules harboring leucine-rich tandem motifs. *Int J Cancer*, 123: 2473-2479.
119. Goldoni S, Humphries A, Nystrom A, Sattar S, Owens RT, McQuillan DJ, Ireton K, Iozzo RV. (2009) Decorin is a novel antagonistic ligand of the Met receptor. *J Cell Biol*, 185: 743-754.
120. Buraschi S, Pal N, Tyler-Rubinstein N, Owens RT, Neill T, Iozzo RV. (2010) Decorin antagonizes Met receptor activity and down-regulates {beta}-catenin and Myc levels. *J Biol Chem*, 285: 42075-42085.
121. Neill T, Painter H, Buraschi S, Owens RT, Lisanti MP, Schaefer L, Iozzo RV. (2012) Decorin antagonizes the angiogenic network: concurrent inhibition of Met, hypoxia inducible factor 1alpha, vascular endothelial growth factor A, and induction of thrombospondin-1 and TIMP3. *J Biol Chem*, 287: 5492-5506.
122. Morcavallo A, Buraschi S, Xu SQ, Belfiore A, Schaefer L, Iozzo RV, Morrione A. (2014) Decorin differentially modulates the activity of insulin receptor isoform A ligands. *Matrix Biol*, 35: 82-90.
123. Schonherr E, Sunderkotter C, Iozzo RV, Schaefer L. (2005) Decorin, a novel player in the insulin-like growth factor system. *J Biol Chem*, 280: 15767-15772.

124. Lala N, Girish GV, Cloutier-Bosworth A, Lala PK. (2012) Mechanisms in decorin regulation of vascular endothelial growth factor-induced human trophoblast migration and acquisition of endothelial phenotype. *Biol Reprod*, 87: 59.
125. Khan GA, Girish GV, Lala N, Di Guglielmo GM, Lala PK. (2011) Decorin is a novel VEGFR-2-binding antagonist for the human extravillous trophoblast. *Mol Endocrinol*, 25: 1431-1443.
126. Koninger J, Giese NA, Bartel M, di Mola FF, Berberat PO, di Sebastiano P, Giese T, Buchler MW, Friess H. (2006) The ECM proteoglycan decorin links desmoplasia and inflammation in chronic pancreatitis. *J Clin Pathol*, 59: 21-27.
127. Schaefer L, Tsalastra W, Babelova A, Baliova M, Minnerup J, Sorokin L, Grone HJ, Reinhardt DP, Pfeilschifter J, Iozzo RV, Schaefer RM. (2007) Decorin-mediated regulation of fibrillin-1 in the kidney involves the insulin-like growth factor-I receptor and Mammalian target of rapamycin. *Am J Pathol*, 170: 301-315.
128. Horvath Z, Reszegi A, Szilak L, Danko T, Kovalszky I, Baghy K. (2019) Tumor-specific inhibitory action of decorin on different hepatoma cell lines. *Cell Signal*, 62: 109354.
129. Whittaker S, Marais R, Zhu AX. (2010) The role of signaling pathways in the development and treatment of hepatocellular carcinoma. *Oncogene*, 29: 4989-5005.
130. Hanahan D, Weinberg RA. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144: 646-674.
131. Jung P, Menssen A, Mayr D, Hermeking H. (2008) AP4 encodes a c-MYC-inducible repressor of p21. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105: 15046-15051.
132. Neill T, Schaefer L, Iozzo RV. (2016) Decorin as a multivalent therapeutic agent against cancer. *Adv Drug Deliv Rev*, 97: 174-185.
133. Xaus J, Comalada M, Cardo M, Valledor AF, Celada A. (2001) Decorin inhibits macrophage colony-stimulating factor proliferation of macrophages and enhances cell survival through induction of p27(Kip1) and p21(Waf1). *Blood*, 98: 2124-2133.
134. Liu Y, Wang X, Wang Z, Ju W, Wang D. (2016) Decorin inhibits the proliferation of HepG2 cells by elevating the expression of transforming growth factor-beta receptor II. *Exp Ther Med*, 12: 2191-2195.

135. Hamid AS, Li J, Wang Y, Wu X, Ali HA, Du Z, Bo L, Zhang Y, Zhang G. (2013) Recombinant human decorin upregulates p57KIP(2) expression in HepG2 hepatoma cell lines. *Mol Med Rep*, 8: 511-516.
136. Mitry RR, Sarraf CE, Wu CG, Pignatelli M, Habib NA. (1997) Wild-type p53 induces apoptosis in Hep3B through up-regulation of bax expression. *Lab Invest*, 77: 369-378.
137. Benada J, Macurek L. (2015) Targeting the Checkpoint to Kill Cancer Cells. *Biomolecules*, 5: 1912-1937.
138. Jarvelainen H, Sainio A, Wight TN. (2015) Pivotal role for decorin in angiogenesis. *Matrix Biol*, 43: 15-26.
139. Grant DS, Yenisey C, Rose RW, Tootell M, Santra M, Iozzo RV. (2002) Decorin suppresses tumor cell-mediated angiogenesis. *Oncogene*, 21: 4765-4777.
140. Yang Y, Xu W, Neill T, Hu Z, Wang CH, Xiao X, Stock SR, Guise T, Yun CO, Brendler CB, Iozzo RV, Seth P. (2015) Systemic Delivery of an Oncolytic Adenovirus Expressing Decorin for the Treatment of Breast Cancer Bone Metastases. *Hum Gene Ther*, 26: 813-825.
141. Araki K, Wakabayashi H, Shintani K, Morikawa J, Matsumine A, Kusuzaki K, Sudo A, Uchida A. (2009) Decorin suppresses bone metastasis in a breast cancer cell line. *Oncology*, 77: 92-99.
142. Shintani K, Matsumine A, Kusuzaki K, Morikawa J, Matsubara T, Wakabayashi T, Araki K, Satonaka H, Wakabayashi H, Iino T, Uchida A. (2008) Decorin suppresses lung metastases of murine osteosarcoma. *Oncol Rep*, 19: 1533-1539.
143. Xu W, Neill T, Yang Y, Hu Z, Cleveland E, Wu Y, Hutten R, Xiao X, Stock SR, Shevrin D, Kaul K, Brendler C, Iozzo RV, Seth P. (2014) The systemic delivery of an oncolytic adenovirus expressing decorin inhibits bone metastasis in a mouse model of human prostate cancer. *Gene Ther*.
144. Zhang W, Ge Y, Cheng Q, Zhang Q, Fang L, Zheng J. (2018) Decorin is a pivotal effector in the extracellular matrix and tumour microenvironment. *Oncotarget*, 9: 5480-5491.

145. Alemany R, Gomez-Manzano C, Balague C, Yung WK, Curiel DT, Kyritsis AP, Fueyo J. (1999) Gene therapy for gliomas: molecular targets, adenoviral vectors, and oncolytic adenoviruses. *Exp Cell Res*, 252: 1-12.
146. Cerullo V, Vaha-Koskela M, Hemminki A. (2012) Oncolytic adenoviruses: A potent form of tumor immunovirotherapy. *Oncoimmunology*, 1: 979-981.
147. Reed CC, Gauldie J, Iozzo RV. (2002) Suppression of tumorigenicity by adenovirus-mediated gene transfer of decorin. *Oncogene*, 21: 3688-3695.
148. Xu W, Neill T, Yang Y, Hu Z, Cleveland E, Wu Y, Hutten R, Xiao X, Stock SR, Shevrin D, Kaul K, Brendler C, Iozzo RV, Seth P. (2015) The systemic delivery of an oncolytic adenovirus expressing decorin inhibits bone metastasis in a mouse model of human prostate cancer. *Gene Ther*, 22: 247-256.
149. Tralhao JG, Schaefer L, Micegova M, Evaristo C, Schonherr E, Kayal S, Veiga-Fernandes H, Danel C, Iozzo RV, Kresse H, Lemarchand P. (2003) In vivo selective and distant killing of cancer cells using adenovirus-mediated decorin gene transfer. *FASEB J*, 17: 464-466.
150. Ma HI, Hueng DY, Shui HA, Han JM, Wang CH, Lai YH, Cheng SY, Xiao X, Chen MT, Yang YP. (2014) Intratumoral decorin gene delivery by AAV vector inhibits brain glioblastomas and prolongs survival of animals by inducing cell differentiation. *Int J Mol Sci*, 15: 4393-4414.
151. Parato KA, Senger D, Forsyth PA, Bell JC. (2005) Recent progress in the battle between oncolytic viruses and tumours. *Nat Rev Cancer*, 5: 965-976.
152. Choi IK, Lee YS, Yoo JY, Yoon AR, Kim H, Kim DS, Seidler DG, Kim JH, Yun CO. (2010) Effect of decorin on overcoming the extracellular matrix barrier for oncolytic virotherapy. *Gene Ther*, 17: 190-201.
153. Oh E, Choi IK, Hong J, Yun CO. (2017) Oncolytic adenovirus coexpressing interleukin-12 and decorin overcomes Treg-mediated immunosuppression inducing potent antitumor effects in a weakly immunogenic tumor model. *Oncotarget*, 8: 4730-4746.

154. Nash MA, Loercher AE, Freedman RS. (1999) In vitro growth inhibition of ovarian cancer cells by decorin: synergism of action between decorin and carboplatin. *Cancer Res*, 59: 6192-6196.
155. Koninger J, Giese NA, di Mola FF, Berberat P, Giese T, Esposito I, Bachem MG, Buchler MW, Friess H. (2004) Overexpressed decorin in pancreatic cancer: potential tumor growth inhibition and attenuation of chemotherapeutic action. *Clin Cancer Res*, 10: 4776-4783.
156. Mann DM, Yamaguchi Y, Bourdon MA, Ruoslahti E. (1990) Analysis of glycosaminoglycan substitution in decorin by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem*, 265: 5317-5323.
157. Brazma A, Parkinson H, Sarkans U, Shojatalab M, Vilo J, Abeygunawardena N, Holloway E, Kapushesky M, Kemmeren P, Lara GG, Oezcimen A, Rocca-Serra P, Sansone SA. (2003) ArrayExpress--a public repository for microarray gene expression data at the EBI. *Nucleic Acids Res*, 31: 68-71.
158. Hoppener DJ, Nierop PMH, Herpel E, Rahbari NN, Doukas M, Vermeulen PB, Grunhagen DJ, Verhoef C. (2019) Histopathological growth patterns of colorectal liver metastasis exhibit little heterogeneity and can be determined with a high diagnostic accuracy. *Clin Exp Metastasis*, 36: 311-319.
159. Bradford MM. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72: 248-254.
160. Narsinh KH, Cui J, Papadatos D, Sirlin CB, Santillan CS. (2018) Hepatocarcinogenesis and LI-RADS. *Abdom Radiol (NY)*, 43: 158-168.
161. Baranyi M, Lippai M, Szatmari Z. (2015) [Role of the stroma in the initiation and progression of tumors]. *Orv Hetil*, 156: 1816-1823.
162. Lu P, Weaver VM, Werb Z. (2012) The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. *J Cell Biol*, 196: 395-406.
163. Seidler DG, Dreier R. (2008) Decorin and its galactosaminoglycan chain: extracellular regulator of cellular function? *IUBMB Life*, 60: 729-733.

164. Ferdous Z, Peterson SB, Tseng H, Anderson DK, Iozzo RV, Grande-Allen KJ. (2010) A role for decorin in controlling proliferation, adhesion, and migration of murine embryonic fibroblasts. *J Biomed Mater Res A*, 93: 419-428.
165. Shangguan JY, Dou KF, Li X, Hu XJ, Zhang FQ, Yong ZS, Ti ZY. (2009) [Effects and mechanism of decorin on the proliferation of HuH7 hepatoma carcinoma cells in vitro]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*, 25: 780-782.
166. Chung EJ, Sung YK, Farooq M, Kim Y, Im S, Tak WY, Hwang YJ, Kim YI, Han HS, Kim JC, Kim MK. (2002) Gene expression profile analysis in human hepatocellular carcinoma by cDNA microarray. *Mol Cells*, 14: 382-387.
167. Miyasaka Y, Enomoto N, Nagayama K, Izumi N, Marumo F, Watanabe M, Sato C. (2001) Analysis of differentially expressed genes in human hepatocellular carcinoma using suppression subtractive hybridization. *Br J Cancer*, 85: 228-234.
168. McAnulty RJ. (2007) Fibroblasts and myofibroblasts: their source, function and role in disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 39: 666-671.
169. Qian Q, Shi X, Lei Z, Zhan L, Liu RY, Zhao J, Yang B, Liu Z, Zhang HT. (2014) Methylated +58CpG site decreases DCN mRNA expression and enhances TGF-beta/Smad signaling in NSCLC cells with high metastatic potential. *Int J Oncol*, 44: 874-882.
170. Van Bockstal M, Lambein K, Van Gele M, De Vlieghere E, Limame R, Braems G, Van den Broecke R, Cocquyt V, Denys H, Bracke M, Libbrecht L, De Wever O. (2014) Differential regulation of extracellular matrix protein expression in carcinoma-associated fibroblasts by TGF-beta1 regulates cancer cell spreading but not adhesion. *Oncoscience*, 1: 634-648.
171. Mauviel A, Santra M, Chen YQ, Uitto J, Iozzo RV. (1995) Transcriptional regulation of decorin gene expression. Induction by quiescence and repression by tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem*, 270: 11692-11700.
172. Hu Y, Sun H, Owens RT, Wu J, Chen YQ, Berquin IM, Perry D, O'Flaherty JT, Edwards IJ. (2009) Decorin suppresses prostate tumor growth through inhibition of epidermal growth factor and androgen receptor pathways. *Neoplasia*, 11: 1042-1053.

173. Na Y, Choi JW, Kasala D, Hong J, Oh E, Li Y, Jung SJ, Kim SW, Yun CO. (2015) Potent antitumor effect of neurotensin receptor-targeted oncolytic adenovirus co-expressing decorin and Wnt antagonist in an orthotopic pancreatic tumor model. *J Control Release*, 220: 766-782.
174. Liebl MC, Hofmann TG. (2019) Cell Fate Regulation upon DNA Damage: p53 Serine 46 Kinases Pave the Cell Death Road. *Bioessays*, 41: e1900127.
175. Xiong L, Kou F, Yang Y, Wu J. (2007) A novel role for IGF-1R in p53-mediated apoptosis through translational modulation of the p53-Mdm2 feedback loop. *J Cell Biol*, 178: 995-1007.
176. Wander SA, Zhao D, Slingerland JM. (2011) p27: a barometer of signaling deregulation and potential predictor of response to targeted therapies. *Clin Cancer Res*, 17: 12-18.
177. Larrea MD, Hong F, Wander SA, da Silva TG, Helfman D, Lannigan D, Smith JA, Slingerland JM. (2009) RSK1 drives p27Kip1 phosphorylation at T198 to promote RhoA inhibition and increase cell motility. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106: 9268-9273.
178. Blagosklonny MV. (2014) Geroconversion: irreversible step to cellular senescence. *Cell Cycle*, 13: 3628-3635.
179. Yoshida A, Diehl JA. (2015) CDK4/6 inhibitor: from quiescence to senescence. *Oncoscience*, 2: 896-897.
180. De Luca A, Santra M, Baldi A, Giordano A, Iozzo RV. (1996) Decorin-induced growth suppression is associated with up-regulation of p21, an inhibitor of cyclin-dependent kinases. *J Biol Chem*, 271: 18961-18965.
181. Schonherr E, Levkau B, Schaefer L, Kresse H, Walsh K. (2001) Decorin-mediated signal transduction in endothelial cells. Involvement of Akt/protein kinase B in up-regulation of p21(WAF1/CIP1) but not p27(KIP1). *J Biol Chem*, 276: 40687-40692.
182. Kollmann K, Heller G, Sexl V. (2011) c-JUN prevents methylation of p16(INK4a) (and Cdk6): the villain turned bodyguard. *Oncotarget*, 2: 422-427.
183. Papa S, Choy PM, Bubici C. (2019) The ERK and JNK pathways in the regulation of metabolic reprogramming. *Oncogene*, 38: 2223-2240.

184. Gomes AS, Ramos H, Soares J, Saraiva L. (2018) p53 and glucose metabolism: an orchestra to be directed in cancer therapy. *Pharmacol Res*, 131: 75-86.
185. Wang Z, Wang N, Liu P, Xie X. (2016) AMPK and Cancer. *Exp Suppl*, 107: 203-226.
186. Nyman MC, Sainio AO, Pennanen MM, Lund RJ, Vuorikoski S, Sundstrom JT, Jarvelainen HT. (2015) Decorin in Human Colon Cancer: Localization In Vivo and Effect on Cancer Cell Behavior In Vitro. *J Histochem Cytochem*, 63: 710-720.
187. Liu Z, Yang Y, Zhang X, Wang H, Xu W, Wang H, Xiao F, Bai Z, Yao H, Ma X, Jin L, Wu C, Seth P, Zhang Z, Wang L. (2017) An Oncolytic Adenovirus Encoding Decorin and Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor Inhibits Tumor Growth in a Colorectal Tumor Model by Targeting Pro-Tumorigenic Signals and via Immune Activation. *Hum Gene Ther*, 28: 667-680.
188. Santra M, Mann DM, Mercer EW, Skorski T, Calabretta B, Iozzo RV. (1997) Ectopic expression of decorin protein core causes a generalized growth suppression in neoplastic cells of various histogenetic origin and requires endogenous p21, an inhibitor of cyclin-dependent kinases. *J Clin Invest*, 100: 149-157.
189. Reszegi A, Horvath Z, Feher H, Wichmann B, Tatrai P, Kovalszky I, Baghy K. (2020) Protective Role of Decorin in Primary Hepatocellular Carcinoma. *Front Oncol*, 10: 645.
190. Mihaylova MM, Shaw RJ. (2011) The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nat Cell Biol*, 13: 1016-1023.
191. Alers S, Loffler AS, Wesselborg S, Stork B. (2012) Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the regulation of autophagy: cross talk, shortcuts, and feedbacks. *Mol Cell Biol*, 32: 2-11.
192. Goyal A, Neill T, Owens RT, Schaefer L, Iozzo RV. (2014) Decorin activates AMPK, an energy sensor kinase, to induce autophagy in endothelial cells. *Matrix Biol*, 34: 46-54.
193. Kleinert M, Parker BL, Chaudhuri R, Fazakerley DJ, Serup A, Thomas KC, Krycer JR, Sylow L, Fritzen AM, Hoffman NJ, Jeppesen J, Schjerling P, Ruegg MA, Kiens B, James DE, Richter EA. (2016) mTORC2 and AMPK differentially regulate muscle triglyceride content via Perilipin 3. *Mol Metab*, 5: 646-655.

194. Gallolu Kankanamalage S, Lee AY, Wichaidit C, Lorente-Rodriguez A, Shah AM, Stippec S, Whitehurst AW, Cobb MH. (2017) WNK1 is an unexpected autophagy inhibitor. *Autophagy*, 13: 969-970.
195. Gallolu Kankanamalage S, Karra AS, Cobb MH. (2018) WNK pathways in cancer signaling networks. *Cell Commun Signal*, 16: 72.
196. Hardie DG, Schaffer BE, Brunet A. (2016) AMPK: An Energy-Sensing Pathway with Multiple Inputs and Outputs. *Trends Cell Biol*, 26: 190-201.
197. Thornton TM, Rincon M. (2009) Non-classical p38 map kinase functions: cell cycle checkpoints and survival. *Int J Biol Sci*, 5: 44-51.
198. Wu GS. (2004) The functional interactions between the p53 and MAPK signaling pathways. *Cancer Biol Ther*, 3: 156-161.
199. Giebler HA, Lemasson I, Nyborg JK. (2000) p53 recruitment of CREB binding protein mediated through phosphorylated CREB: a novel pathway of tumor suppressor regulation. *Mol Cell Biol*, 20: 4849-4858.
200. Bousoik E, Montazeri Aliabadi H. (2018) "Do We Know Jack" About JAK? A Closer Look at JAK/STAT Signaling Pathway. *Front Oncol*, 8: 287.
201. Guo YJ, Pan WW, Liu SB, Shen ZF, Xu Y, Hu LL. (2020) ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis. *Exp Ther Med*, 19: 1997-2007.
202. Adisheshaiah P, Li J, Vaz M, Kalvakolanu DV, Reddy SP. (2008) ERK signaling regulates tumor promoter induced c-Jun recruitment at the Fra-1 promoter. *Biochem Biophys Res Commun*, 371: 304-308.
203. Nakagawa H, Maeda S. (2012) Molecular mechanisms of liver injury and hepatocarcinogenesis: focusing on the role of stress-activated MAPK. *Patholog Res Int*, 2012: 172894.
204. Fuchs SY, Adler V, Pincus MR, Ronai Z. (1998) MEKK1/JNK signaling stabilizes and activates p53. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95: 10541-10546.
205. Florescu-Tenea RM, Kamal AM, Mitrut P, Mitrut R, Ilie DS, Nicolaescu AC, Mogoanta L. (2019) Colorectal Cancer: An Update on Treatment Options and Future Perspectives. *Curr Health Sci J*, 45: 134-141.

206. Garcia-Foncillas J, Sunakawa Y, Aderka D, Wainberg Z, Ronga P, Witzler P, Stintzing S. (2019) Distinguishing Features of Cetuximab and Panitumumab in Colorectal Cancer and Other Solid Tumors. *Front Oncol*, 9: 849.

10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

A disszertációhoz kapcsolódó saját közlemények:

1. **Reszegi, A.**, Horváth, Z., Fehér, H., Wichmann, B., Tátrai, P., Kovalszky, I., & Baghy, K. (2020). Protective Role of Decorin in Primary Hepatocellular Carcinoma. *Frontiers in oncology*, 10, 645. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00645>
IF: 4,848 (2019)
2. **Reszegi, A.**, Horváth, Z., Karászi, K., Regős, E., Postniková, V., Tátrai, P., Kiss, A., Schaff, Z., Kovalszky, I., & Baghy, K. (2020). The Protective Role of Decorin in Hepatic Metastasis of Colorectal Carcinoma. *Biomolecules*, 10(8), E1199.
<https://doi.org/10.3390/biom10081199>
IF: 4,082
3. Horváth, Z., **Reszegi, A.**, Szilák, L., Dankó, T., Kovalszky, I., & Baghy, K. (2019). Tumor-specific inhibitory action of decorin on different hepatoma cell lines. *Cellular signalling*, 62, 109354. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2019.109354>
IF: 3,968 (2019)

Össz IF=12,898

Könyvfejezet:

4. Baghy, K., **Reszegi, A.**, Tátrai, P., & Kovalszky, I. (2020). Decorin in the Tumor Microenvironment. *Advances in experimental medicine and biology*, 1272, 17–38.
https://doi.org/10.1007/978-3-030-48457-6_2
5. Sevic, I., Spinelli, F. M., Cantero, M. J., **Reszegi, A.**, Kovalszky, I., García, M. G., & Alaniz, L. (2019). The Role of the Tumor Microenvironment in the Development and Progression of Hepatocellular Carcinoma. In J. Tirnitz-Parker (Ed.), *Hepatocellular Carcinoma*. Codon Publications.

A disszertációtól független saját közlemények

6. Fullár, A., Karászi, K., Hollósi, P., Lendvai, G., Oláh, L., **Reszegi, A.**, Papp, Z., Sobel, G., Dudás, J., & Kovalszky, I. (2020). Two ways of epigenetic silencing of TFPI2 in cervical cancer. *PloS one*, *15*(6), e0234873.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234873>
IF: 2,740 (2019)
7. Regős, E., Karászi, K., **Reszegi, A.**, Kiss, A., Schaff, Z., Baghy, K., & Kovalszky, I. (2020). Syndecan-1 in Liver Diseases. *Pathology oncology research: POR*, *26*(2), 813–819. <https://doi.org/10.1007/s12253-019-00617-0>
IF: 2,826 (2019)
8. Mervai, Z., **Reszegi, A.**, Miklya, I., Knoll, J., Schaff, Z., Kovalszky, I., & Baghy, K. (2020). Inhibitory Effect of (2R)-1-(1-Benzofuran-2-yl)-N-propylpentan-2-amine on Lung Adenocarcinoma. *Pathology oncology research: POR*, *26*(2), 727–734. <https://doi.org/10.1007/s12253-019-00603-6>
IF: 2,826 (2019)
9. Mihály, D., Papp, G., Mervai, Z., **Reszegi, A.**, Tátrai, P., Szalóki, G., Sápi, J., & Sápi, Z. (2018). The oncomir face of microRNA-206: A permanent miR-206 transfection study. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)*, *243*(12), 1014–1023. <https://doi.org/10.1177/1535370218795406>
IF: 3,005 (2018)
10. Regős, E., Abdelfattah, H. H., **Reszegi, A.**, Szilák, L., Werling, K., Szabó, G., Kiss, A., Schaff, Z., Kovalszky, I., & Baghy, K. (2018). Syndecan-1 inhibits early stages of liver fibrogenesis by interfering with TGFβ1 action and upregulating MMP14. *Matrix biology: journal of the International Society for Matrix Biology*, *68-69*, 474–489. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.02.008>
IF: 6.986 (2018)

Össz. IF= 31,281

11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném megragadni lehetőséget, hogy köszönetemet, tiszteletemet fejezzem ki mindazoknak, akik hozzájárultak a doktori munkám elkészüléséhez.

Szeretnék külön köszönetet mondani témavezetőmnek, **Dr. Baghy Kornéliának**, aki szakértelmével, nélkülözhetetlen tanácsaival hatalmas segítséget nyújtott munkám elkészüléséhez, ötleteiből, tudományos tapasztalataiból, gyors és logikus lényegrelátásából rengeteget tanulhattam.

Külön hálámat szeretném kifejezni, a felbecsülhetetlen értékű szakmai és emberi segítségéért, **Prof. Dr. Kovalszky Ilonának**, aki PhD képzésem során mindvégig támogattott, tanított és biztosította szakmai fejlődésemet. Neki hála számos nemzetközi és helyi konferencián kamatoztathattam tudásomat, valamint lehetőségem volt egy Európai Konzorcium révén 3 hónapos szakmai, tanulmányi utazáson részt vennem Argentínában.

Köszönetet szeretnék mondani az intézet vezetőjének, **Dr. Matolcsy András professzor úrnak**, hogy lehetőséget biztosított az I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetben tudományos munkáim végzéséhez.

Köszönet jár **Dr. Horváth Zsoltnak**, **Dr. Mervai Zsoltnak** és **Dr. Regős Eszternek**, a módszerek elsajátításában, kivitelezésében és az eredmények értékelésében nyújtott segítségükért és baráti támogatásukért.

Köszönöm, minden jelenlegi és egykori Molekuláris Patológia dolgozójának a motiváló, segítőkész szakmai környezetet és baráti légkört: **Dr. Papp Gergőnek**, **Egedi Krisztinának**, **Császár Krisztinának**, **Dr. Oláhné Nagy Júliának**, **Karászi Katalinnak** és **Dr. Váncza Lórándnak**.

Köszönet illeti **Karászi Katalint**, aki rengeteget segített az immunhisztokémiai folyamatok elsajátításában.

Külön hálámat szeretném kifejezni **Dr. Dezső Katalinnak**, hogy a dolgozatom házi bírálatát elvállalta.

Köszönet jár az Állatház dolgozójának, **Sztodola Andrásnak**, az odaadó és lelkiismeretes munkájáért.

Köszönöm **Dankó Titanillának**, a lelkiismeretes, önzetlen segítségét, amelyet a sejtvonalak tenyésztése során nyújtott.

Köszönöm minden kollégámnak az I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetben a sok segítséget és támogatást.

Szeretnék külön köszönetet mondani, **Petóvári Gábornak, Dr. Szücs Armandának, Dr. Nagy Noéminek és Dr. Mihály Dóranak**, hogy bármilyen baráti segítségre, támogatásra volt szükségem, mindig ott voltak és ösztönöztek.

Hálával tartozom továbbá szüleimnek, **Reszegi Sándornénak és Reszegi Sándornak**, valamint testvéreimnek, **Reszegi Tímeának és Reszegi Sándornak**, köszönöm nekik, hogy tanulmányaim során türelemmel és megértéssel támogattak, és minden helyzetben mellettem álltak, nélkülük most nem tartanék itt.