

A mikrokörnyezet szerepe a hám eredetű daganatok progressziójában

Doktori értekezés

Fullár Alexandra

Semmelweis Egyetem
Patológiai Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Kovalszky Ilona, D.Sc., egyetemi tanár
Konzulens: Dr. Dudás József, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Hivatalos bírálók: Dr. Répássy Gábor, D.Sc., egyetemi tanár
Dr. Balázs Margit, D.Sc., egyetemi tanár

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Szalai Csaba, D.Sc., egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Réz Gábor, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Joó József Gábor, Ph.D., egyetemi adjunktus

Budapest
2015

1. TARTALOMJEGYZÉK

1. TARTALOMJEGYZÉK	1
2. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	5
3. BEVEZETÉS	8
3. 1. A daganat kialakulása	8
3. 2. A bazális membrán és a stróma	10
3. 3. Sejt és stróma kommunikációja	12
3. 4. A stróma átrendeződése	15
3. 5. Invázió és metasztázis	19
3. 6. A tumor stróma, mint lehetséges terápiás célpont	21
4. CÉLKITŰZÉSEK	23
5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	24
5. 1. Vegyszerek, oldatok és pufferek	24
5. 2. Sejttenyésztés, sejt kísérletek	27
5. 2. 1. Sejtkultúrák	27
5. 2. 2. Direkt és indirekt kokultúrák	28
5. 2. 3. Kezelések	30
5. 2. 4. Proliferációs vizsgálat	30
5. 2. 5. Tumorsejt migrációs és inváziós assay	31
5. 3. Génexpressziós vizsgálatok	33
5. 3. 1. RNS izolálás	33
5. 3. 2. Reverz transzkripció	33
5. 3. 3. Valós idejű (real-time) PCR	34
5. 4. Fehérje vizsgálatok	36
5. 4. 1. TMA, immunhisztokémia és immuncitokémia	36
5. 4. 2. Fehérje izolálás	38
5. 4. 3. Kazeináz és zselatináz zymogram, Coomassie festés	38
5. 4. 4. Western blot	39
5. 4. 5. Dot blot	40

5. 4. 6. ELISA	40
5. 5. Statisztikai analízis	41
6. EREDMÉNYEK	42
6. 1. Méhnyaki modellrendszer vizsgálata	42
6. 1. 1. Az extracelluláris mátrix komponensek változása méhnyakrákban	42
6. 1. 2. Morfológiai megfigyelések	44
6. 1. 3. Proliferáció	46
6. 1. 4. A kokultúra hatására bekövetkező expressziós változások	47
6. 1. 4. 1. mRNS expressziós változások a méhnyaki modellrendszerben	47
6. 1. 4. 2. Fehérje expressziós változások a méhnyaki modellrendszerben	49
6. 1. 4. 3. Az extracelluláris mátrix kötő membránfehérjék és receptorok a méhnyaki modellrendszerben	52
6. 1. 4. 4. Szabályozó mechanizmusok a méhnyaki modellrendszerben	56
6. 1. 5. Migrációs vizsgálatok a méhnyaki modellrendszerben	57
6. 2. Fejnyaki modellrendszer vizsgálata	60
6. 2. 1. A kokultúrában tenyésztés hatására bekövetkező expressziós változások	60
6. 2. 1. 1. mRNS expressziós változások a fejnyaki modellrendszerben	60
6. 2. 1. 2. Fehérje expressziós változások a fejnyaki modellrendszerben	61
6. 2. 2. Szabályozó mechanizmusok a fejnyaki modellrendszerben	66
6. 2. 3. Inváziós és migrációs vizsgálatok a fejnyaki modellrendszerben	70
7. MEGBESZÉLÉS	71
7. 1. A bazális membrán és komponenseinek változásai	76
7. 2. Az intersticiális stróma változásai	78
7. 3. Mátricelluláris fehérjék	79
7. 4. Az MMP-k szabályozása	82
7. 5. Sejtfelszíni molekulák és mátrix receptorok	84

7. 6. A TGF-β1 szerepe	85
8. KÖVETKEZTETÉSEK	87
9. ÖSSZEFOGLALÁS	89
10. SUMMARY	90
11. IRODALOMJEGYZÉK	91
12. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE	109
13. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	111
14. FÜGGELÉK	112

2. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

bFGF	basic fibroblast growth factor
BSA	bovine serum albumin
CAF	carcinoma-associated fibroblast
CD151	tetraspanin
cDNS	komplementer dezoxiribonukleinsav
CO ₂	szén-dioxid
COX-2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2 / cyclooxygenase-2
CSCC7	non keratinizing large cell cervical squamous cell carcinoma
CXCR-4	C-X-C chemokine receptor type 4
DAB	3,3'-diamunobenzidine
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole (4',6-diamidino-2-fenilindol)
DEX	dexamethasone
DMEM	dulbecco's modified eagle's medium
DNS	dezoxiribonukleinsav
dNTP	deoxyribonucleotide triphosphate
ECM	extracellular matrix
EDTA	etiléndiamin-tetraacetát
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EMT	epithelial-mesenchymal transition
FAP	fibroblast activation protein
FBS	fetal bovine serum
FSP-1	fibroblast-specific protein-1
HA	hyaluronan / hyaluronic acid / hyaluronate
HNSCC	head and neck squamous cell carcinoma
HPV	human papillomavirus
IRF-1	interferon regulatory factor 1
MAPK	mitogen activated protein kinase
M-MLV	moloney murine leukemia virus

MMP	matrix metalloproteinase
mRNS	hírvivő ribonukleinsav
MT-MMP	membrane-type matrix metalloproteinase
NF	normál fibroblaszt (méhnyak)
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PAI-1	plasminogen activator inhibitor-1
PBS	phosphate buffered saline
PBST	phosphate buffered saline and Tween 20
PCR	polymerase chain reaction
PDGF	platelet-derived growth factor
PDL	human peridontal ligament fibroblast
RECK	reversion-including-cysteine-rich protein with kazal motifs
RGD	arginylglycylaspartic acid
RNase	ribonukleáz
RNS	ribonukleinsav
SCC-25	human oral squamous carcinoma cell
SDF-1	stromal cell-derived factor 1 (CXCL-12)
SDS	sodium dodecyl sulfate
α -SMA	alpha smooth muscle actin
TAF	tumor-associated fibroblast
TBS	tris-buffered saline
TBST	tris-buffered saline and Tween 20
TCA	triklór-acetát
TF	tumor-asszociált fibroblaszt (méhnyak)
TGF- β 1	transforming growth factor β 1
TGFBR	transforming growth factor beta receptor
THBS1	thrombospondin-1 gene
TIMP	tissue inhibitor of metalloproteinase
TMA	tissues microarray
TNF α	tumor necrosis factor alpha

TSP-1 thrombospondin-1
VEGF vascular endothelial growth factor

3. BEVEZETÉS

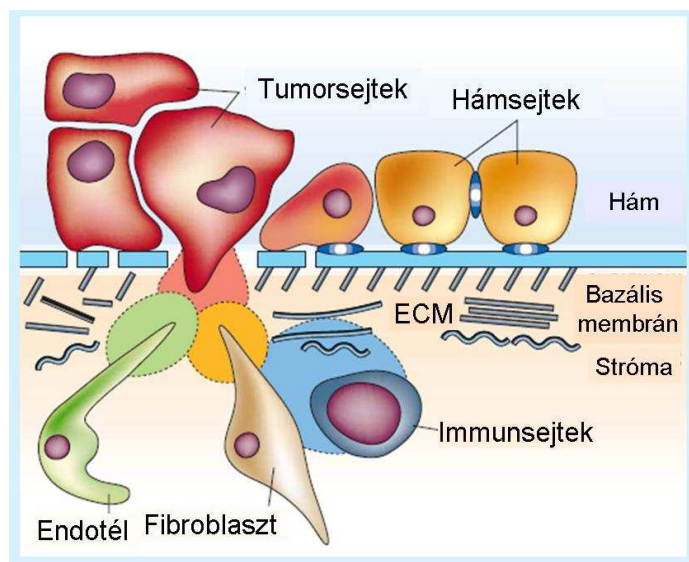
Az 1980-as évekig a rákkutatás csupán a daganatsejtekre fókuszált, figyelmen kívül hagyta a tumor kialakulásában és terjedésében szerepet játszó egyéb tényezőket [1, 2]. 1863-ban Rudolph Virchow a daganat szövet strómájában fehérvérsejtek jelenlétéről számolt be és a krónikus gyulladás fontosságát feltételezte a daganat kialakulásában, de egyéb szerepét nem vizsgálta [3]. A daganatos betegségek leküzdésének nagyfokú sikertelensége szemléletmód váltásra ösztönözte a kutatókat. Az áttörésre 1982-ig, Bissell és munkatársai közleményéig kellett várni, miszerint a tumor kialakulásában az evolúciós és genetikai mutációk halmozódása mellett a daganat mikrokozonyzetének is jelentős szerep jut [2, 4].

Napjainkra nyilvánvalóvá vált, hogy a daganat egy heterogén rendszer, melyben a daganatsejtek és közvetlen környezetük között dinamikus kapcsolat áll fenn. Daganatszövevé szerveződésük alapvető feltétele a daganatos stróma kialakítása, így a daganatok valódi természetét csak akkor érthetjük meg, ha a tumorsejteket szöveti környezetükkel együtt vizsgáljuk [1]. Emiatt manapság a tumor mikrokozonyzet és extracelluláris mátrix (ECM) kutatás a daganatkutatás egyik fő célpontjává vált.

3. 1. A daganat kialakulása

A daganatok olyan genetikai betegségek, melyek kialakulásában, növekedésében és terjedésében a genetikai állomány szerkezetét nem érintő epigenetiai változások is fontos szerepet játszanak. Fej-nyaki laphámrákok (HNSCC) kialakulásáért elsősorban az alkoholfogyasztás, a dohányzás és a bételrágás okolható. Míg a szimpla dohányzás 3-9x-re, addig az alkoholfogyasztás és dohányzás együttesen közel 100x-ra növeli a daganat kialakulásának valószínűségét [5-7]. A hám eredetű daganatok esetében a fizikai és kémiai karcinogének mellett a vírusok daganatkeltő hatása jelentős. Az általunk vizsgált két hámeredetű daganat - a fejnyaki és méhnyaki laphámrákok - többségére jellemző valamely magas kockázatú humán papillomavírus (HPV) fertőzöttség. A

fejnyaki daganatok esetében a HPV-16-on kívül a szájgaratüregi rákok jelentős hányadában HPV-18 és -33, a szájüregi rákok esetében HPV-52 mutatható ki [8]. A méhnyakrákok túlnyomó többségében a HPV-16 és HPV-18 található, de más onkogén HPV-típusok is előfordulnak, mint a HPV-31, -33, -35 és -45 [9]. Pirog és munkatársai 760 méhnyaki adenocarcinomás beteg HPV státuszát vizsgálta. Az adatok alapján megállapították, hogy klasszikus adenocarcinomák 71,8%-a HPV pozitív, míg a többi adenocarcinomában ez az arány 30% alatti volt. A HPV pozitív tumorok 91,8%-ban csak egyféle HPV típus volt kimutatható, melyek 94,1%-a HPV-16 pozitivitást mutatott [10].



1. ábra. Az invazív karcinóma kialakulása, tumor-stróma interakció [11]. A hámban létrejött daganatsejtek áttörve a bazális membránt közvetlen kapcsolatba kerülnek a stróma sejtjeivel, így az endotélsejtekkel, fibroblasztokkal és immunsejtekkel. A közöttük kialakult dinamikus kapcsolat hatására a fibroblasztok aktiválódnak, tumor-asszociált fibroblasztokká válnak, a tumorsejtek pedig elköteleződnek az invazív állapot felé.

A hám jó vagy rosszindulatú átalakulása szövettanilag jól nyomonkövethető. A dysplasia enyhe formájától a súlyosabb állapot felé a hám rétegződése felbomlik. A sejtek mérete és alakja nagy változatosságot mutat, valamint bazális jellegű sejtalakok jelennek meg a hám felsőbb rétegeiben is. In situ carcinoma-ról akkor beszélünk, ha a malignus sejtek nem törnek át a bazális

membránt. Amint ez bekövetkezik már invazív a daganat, kialakulásában és terjedésében a stróma is szerepet játszik. (1. ábra) [11]. Nem ismert pontosan, hogy milyen molekuláris mechanizmusok indukálják az invazív állapot irányába való elköteleződést [12]. Az invazív karcinómák gyakori kísérője a kötőszövetes állomány felszaporodása, az extracelluláris mátrix komponensek túlzott termelődése (dezmoplasztikus reakció). Ezt részben az aktivált fibroblasztok, részben a daganatsejtek termelik.

3. 2. A bazális membrán és a stróma

A többrétegű el nem szarusodó laphámot a strómájától fizikai barrier, a három rétegből álló többfunkciós membrana basalis (lamina basalis = lamina lucida + lamina densa, lamina fibroreticularis) választja el. Ez egy olyan speciálisan struktúrált határvonal, melynek felépítése eltér a fibrilláris strómáétól. Biztosítja a hámsejtek alaphoz való rögzülését, fizikai gátat képez a kötőszöveti sejtek hámszövetek közé nyomulásával szemben. Olyan struktúra, amely irányíthatja a hámsejtek migrációját, valamint integrinek által közvetített jelátviteli utakon keresztül befolyásolja a hámsejtek növekedését, differenciálódását, migrációját [1]. A bazális membránt különféle fehérjék hálózata, főként IV-es és XVIII-as típusú kollagének, lamininok, entaktin, mátrilin és proteoglikánok (pl: perlekán, agrin) építik fel. A hámsejtek sejtfelszíni hemidesmoszómáikkal (integrin $\alpha 6\beta 4$) kötött laminin-5 segítségével rögzülnek a membrán felszínéhez [13].

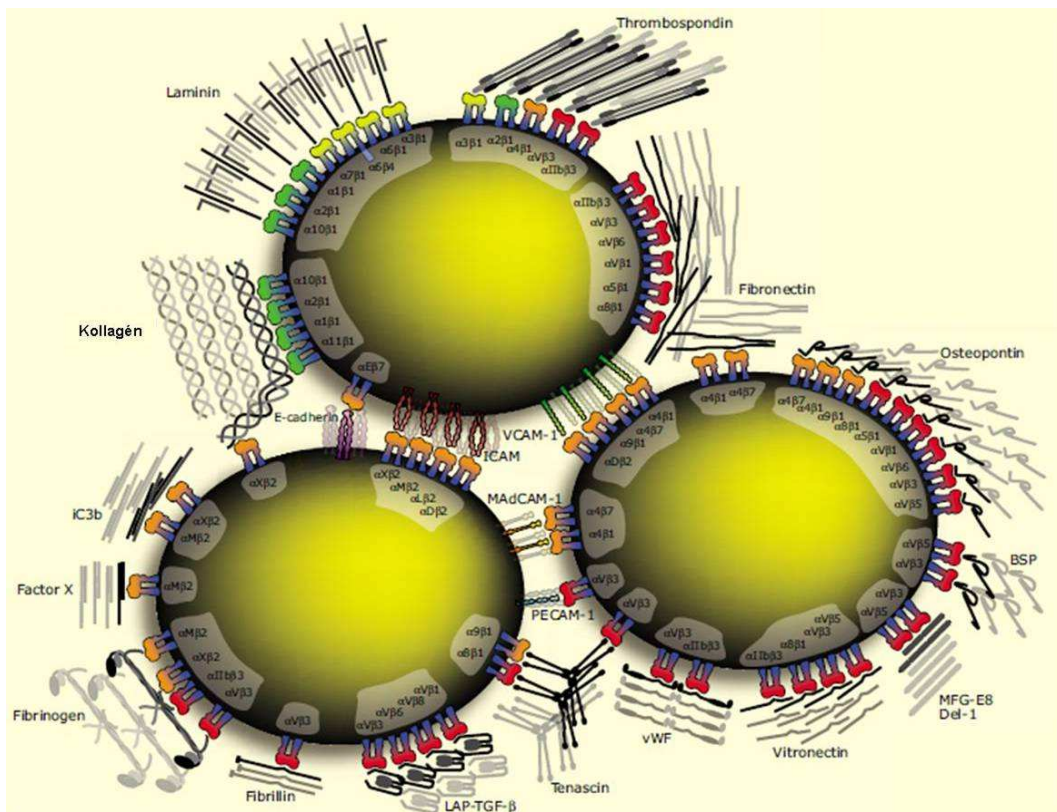
A bazális membrán alatt elhelyezkedő stróma különböző kötőszöveti sejtjes elemekből és a sejtközötti teret kitöltő extracelluláris mátrixból áll. A sejtjes elemek egy része vándorlásra képes immunsejt pl: makrofágok, hízósejtek, limfociták és granulociták. Ezek a mobilis sejtek átmenetileg tartózkodnak a kötőszövetben, számuk és összetételük időben változó. Szerepük leginkább a sejtjes és humorális immunválasz, de termelnek növekedési faktorokat, mátrixbontó enzimeket, mely funkciókkal jelentős mértékben hozzájárulnak a kötőszövet normális működéséhez.

A stróma sejtes elemeinek többségét a fibroblasztok alkotják. A 19. század második felében írták le először, mint a kötőszövet elsődleges sejttypusát az elhelyezkedésük és mikroszkópos képük alapján. Mesodermális eredetűek, de nem tartoznak sem az érrendszerhez, sem az immunrendszerhez, a szervezet kötőszövetében általánosan előforduló sejttypus [14]. A strómális fibroblasztok olyan heterogén sejtek összessége, melyek extracelluláris mátrixfehérjéket (kollagén I és III, fibronektin, proteoglikánok), proteolitikus enzimeket, növekedési faktorokat, citokineket termelnek és fontos szerepet játszanak a sebgyógyulás folyamatában [15, 16]. Szintetizálják, fenntartják, valamint glikoproteinekből és proteoglikánokból háromdimenziós hálózattá szervezik az extracelluláris mátrixot [17]. Különböző betegekből és szövetekből származó *in vitro* nevelt primer fibroblasztokat Chang és munkatársai egymáshoz hasonló morfológiájú, orsó alakú, megnyúlt sejtekként írták le, melyek pozitívak vimentinre és mesenchimális markerekre, de egyéb sejttypusokra jellemző markereket nem hordoznak [15]. *In vivo* jól alkalmazható specifikus markert a fibroblaszt-specifikus-protein-1 (FSP-1) kivételével nehéz találni, mivel többségük nem csak fibroblasztokra specifikus, vagy nem jelölik a fibroblasztok összes típusát [14].

A normál fibroblasztok stressz hatására - növekedési faktorok, mechanikai hatások, egyéb sejttypusok jelenléte vagy környezet megváltozása miatt - aktiválódnak és fokozott extracelluláris mátrix szintézisre képes myofibroblasztokká alakulnak. Tomasek és munkatársai a szervezetben fellelhető myofibroblasztokat három típusba sorolták. A kötőszövetben előforduló normál fibroblasztokat stresszkábel és α -simaizom-aktint (SMA) nem tartalmazó sejtekként definiálták. A proto-myofibroblaszt csoportot stresszkábelek jellemzik, de SMA-t nem termelnek. Ilyen sejtek a tüdő alveoláris szeptumaiban és a sebgyógyulásakor észleltek. Az SMA-t expresszáló és stresszkábeleket tartalmazó sejtek a differenciált myofibroblasztok, melyek normális esetben csak a csontvelői strómában és a máj kötőszövetes tokjában találhatóak, de a fibrózis és a tumoros stróma jellemző sejtjei is egyben [18].

3. 3. Sejt és stróma kommunikációja

A tumorsejtek áttétképzése során különféle szöveti struktúrákon haladnak át, útközben a sejt-mátrix adhéziójuk és motilitásuk változik, miközben utat vájnak maguknak a mátrixban és az erek falán keresztül. Ezen események során a sejt-kapcsolatok is folyamatosan változnak, így az adhéziós fehérjék szerepe kulcsfontosságú. A homofiliás sejt-sejt kapcsolatért a kadherineket, a heterofiliásért az immunglobulin szuperfamilia és/vagy a szelektinek felelősek. A transzmembrán glikoproteinek családjába tartozó integrineken keresztül tartják a kapcsolatot a sejtek az extracelluláris mátrixal [1, 19].



2. ábra. Integrinek és ligandaik [21]. A különböző α és β alegységek összekapcsolódása során létrejött integrinek sejt felszíni egységeikkel számos fehérje kötésére képesek. A fehérje-fehérje kölcsönhatás vizsgálatával négy fő csoportba sorolhatjuk őket: RGD-kötő integrinek, LDV-kötő integrinek, αA -domént tartalmazó $\beta 1$ integrinek, αA -domént nem tartalmazó laminin kötő integrinek.

Az integrinek által közvetített sejtadhézió kulcsa számos normál és patológiás folyamatnak, beleértve a sejtek túlélését, növekedését, differenciációját, migrációját, a szervezet a gyulladásra adott választ, a vérlemezke aggregációt, a sebgyógyulást és a tumor inváziót [20]. Minden integrin nem kovalensen kötött heterodimer molekulákból álló α (18 féle) és β (8 féle) alegységből épül fel, melyekből 24 különböző α - β kombinációt azonosítottak eddig fehérje szinten. Az alegységek hosszú, a ligandok (pl: kollagének, laminin, fibronectin, fibrinogén, thrombospondin, von Willebrand faktor) RGD (arginin-glicerin-aszparaginsav) szekvenciáját felismerő extracelluláris és többnyire rövid citoplazmatikus alegységgel rendelkeznek. Az α lánc citoplazmatikus része jelet küld a sejtől a ligandkötő hely felé, a β láncé pedig a ligand jelét továbbítja a sejteknek (2. ábra) [21].

Az integrinek a sejtek mechanikai rögzítése mellett a sejtíváz szerveződésének szabályozásában és különböző jelátviteli utak beindításában is szerepet játszanak. Letapadt állapotban megváltozik a sejtek proliferációs és differenciációs képessége, valamint új integrinek jelennek meg a sejtfelszínen. A ligandkötés hatására a sejtfelszíni receptor citoplazmatikus alegysége foszforilálódik, és ez számos intracelluláris jelutat aktivál [22]. Sok esetben mutatkozik eltérés a normál és daganatos szövet integrin állapota között, mely megnyilvánulhat az integrinpárok jelenlétének csökkenésében (pl: hám eredetű daganatokban az integrin $\alpha 5\beta 1$ fibronectin receptor eltűnése) vagy növekedésében (pl: melanómában és emlődaganat áttétekben nő az integrin $\alpha \nu\beta 3$) [23]. A tetraspanin (CD151) a bazális keratinsejtekben képes hozzákapcsolódni a laminin-kötő integrinekhez is (integrin $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 6\beta 4$), ezzel segítve elő az HPV-16 keratinsejtekbe jutását [24].

Számos integrin köti a sejtadhézióban fontos szerepet betöltő thrombospondin-1-et (TSP-1). Legjobban az integrin $\alpha \nu\beta 3$ általi TSP-1 kötés ismert, mely különböző sejtípusok, mint a vérlemezkék, melanoma sejtek, endothel sejtek és simaizomsejtek adhézióját eredményezi [25]. Ezen kívül az integrin $\alpha II\beta 3$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 9\beta 1$ és $\alpha 6\beta 1$ integrinpárok töltnek be TSP-1

receptor funkciót [26]. John és munkatársai bizonyították, hogy az endogén TSP-1 emlőrákokban képes stimulálni az integrin $\alpha 6$ expresszióját mRNS és fehérje szinten egyaránt. Ez a fokozott jelenlét pedig elősegíti a tumorsejtek lamininhálózathoz kötődést, és az inváziót [27]. A TSP-1 gátolja az angiogenezist azáltal, hogy közvetlenül befolyásolja az endothel sejtek migrációját és túlélését, valamint indirekt hat a növekedési faktorok mobilizációjára. A tumoros mikrokörnyezetben is jelen van, ahol a TGF- β aktiválásán keresztül gátolja azon tumorsejtek növekedését, melyek érzékenyek a TGF- β -ra [28].

A kötőszöveti fibronectin az egyik legismertebb mátrixkötő molekula, ismétlődő szakaszokat tartalmazó, 250 kDa molekulatömegű polipeptidből áll. A két polipeptidet a C-terminális végeken két diszulfid-híd kapcsolja össze. A molekulán kollagén, fibrin, heparánszulfát, heparin és integrin kötőhelyek is találhatóak, melyek segítségével egységes rendszerré szervezi össze az extracelluláris mátrix elemeit. A fibronectin szálak hálózatba rendeződve alkalmas felületet biztosítanak a sebgyógyulás során migráló sejtek vándolásához. Hiánya embrionális korban letális, tehát fontos szerepe van az embrionális fejlődésben is [29]. A fibronectin génjéről alternatív splicing révén a hálózattá szerveződő sejtfelszíni fibronectinen kívül szolubilis plazma fibronectin is átíródik, mely a sebzés alkalmával a kötőszöveti kollagéntől aktiválódva a vérlemezkék integrinjéhez kapcsolódik a véralvadás során. Az alternatív splicing a molekula három kitüntetett régióját érinti (ED-A, ED-B, V), melyek megléte vagy hiánya határozza meg a fibronectin típusát [29]. Az alternatív splicing beindításában szerepe van a TGF- β -nak, mely kísérletesen növeli a fibronectin és az integrinek szintézisét [30].

A lamininok olyan heterotrimer glikoproteinek, melyek felépítésüknek köszönhetően a bazális membránban legalább négy kötést képesek egyszerre létrehozni. Három rövid karjukkal (α , β , γ láncok) további lamininokhoz kötnek, így az epitél sejtek bazális felszínén képződő lamininhálózat adhéziós molekulákkal képes kapcsolódni a lamina basalis vázát alkotó kollagén IV rosthálózatához [13, 31]. Az α -lánc C-terminális végén található nagy globuláris

alegységükkel heparánszulfát proteoglikánokhoz, IV típusú kollagénhez és sejt felszíni receptorokhoz, például integrinekhez képesek kötődni. Az egyes alegységek többféle izoformában léteznek, melyek kombinációjaként eddig 15 féle laminint írtak le. A lamininok az adhezív, migrációt elősegítő, és jelátviteli funkcióikat integrin kapcsolataik révén érvényesítik. A sejt felszíni laminin receptorok közé tartoznak a $\beta 1$ és $\beta 4$ integrinek. A normál prosztata epitél sejtek felszínén az integrin $\alpha 6$ specifikusan köti mindkét formát, így képezve az integrin $\alpha 6\beta 1$ és $\alpha 6\beta 4$ laminin kötő integrin párokat, melyek lehetővé teszik a sejtek tapadását a bazális membránhoz [32, 33]. Prostatatárak progressziója során míg számos integrin, mint a $\beta 4$ szintje csökken, addig az $\alpha 6$ és $\beta 1$ túlexpresszálódik a primer daganatban és a nyirokcsomói áttétekben [34, 35]. Tehát az integrin $\alpha 6$ és/vagy $\beta 1$ magas expresszió kedvez a prostatatárak sejtek terjedésének [36].

Az integrineken kívül fontos receptor funkciót tölt be a CD44. A keratinociták felszínén a CD44 több variáns formája mutatható ki, melyek alternatív splicing és poszt-transzlációs módosítás révén alakulnak ki. A standard izoforma (CD44s) a legkisebb méretű közülük, mely nem tartalmazza az exon variánsok által kódolt epitópot, és fontos szerepet játszik a nyiroksejtek irányításában, a szöveti regenerációban, és a tumorsejtek terjedésében [37]. A molekula hyaluronsavat (HA) köt, ami számos daganattípusban elősegíti a rosszindulatú sejtek növekedését, migrációját és metasztázisát [38, 39]. A hámsejtek MMP-7 és MMP-9 termelése korrelál a CD44 mennyiségével [40]. Az alacsony-grádusú laphámrákok CD44 immunfestése hasonlít a normál epidermiszéhez, míg az agresszív tumorokban mennyisége csökken, mely a sheddig következménye lehet [41]. A szérumból kimutatható szabad forma szintje fontos támpontul szolgál a terápia hatékonyságának ellenőrzésében [42].

3. 4. A stróma átrendeződése

Hám eredetű tumorokban a reaktív stróma, vagy másnéven desmoplasia a kötőszövetes állomány felszaporodásával reagál a hámsejtek malignus transzformációjára. A reaktív strómát megnövekedett számú aktivált fibroblaszt és kapilláris jellemzi, magas az I típusú kollagén és fibrin tartalma [43, 44]. A

daganatszövet vérellátás nélkül életképtelen, ezért olyan növekedési faktoroknak, mint a vaszkuláris endotheliális növekedési faktornak (VEGF), és a bázikus növekedési faktornak (bFGF, FGF-2) fontos szerep jut a daganatos érújráképzés stimulálásában, valamint a myofibroblasztok szaporodásának serkentésében. Ezt mi sem bizonyítja jobban, mint hogy gátlásuk akadályozza a daganat növekedését [45]. A reaktív stróma kialakulásában fontos szerepet játszó VEGF-et termelhetik maguk a daganatsejtek, de főként a myofibroblasztok és immunsejtek feladata [14]. A daganatos stróma kedvezhet a tumor terjedésének és növekedésének, de tükrözheti a környező ép szövet védekezési, elhatárolási törekvéseit is, tehát lehet permisszív vagy szupresszív a daganat számára.

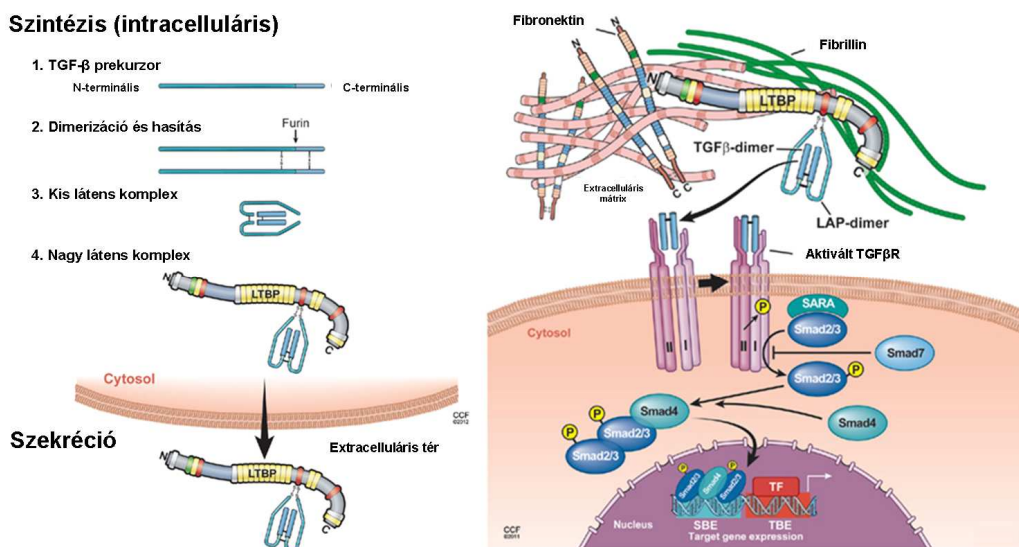
Az utóbbi időben a tumort támogató strómális fibroblasztokat, és az SMA-pozitív myofibroblasztokat együttesen tumor- vagy carcinoma-asszociált fibroblasztoknak (TAF vagy CAF) nevezik. Csontvelő-eredetű sejtekből, vagy ép fibroblasztok aktiválódásával genetikai, epigenetikai hatások következtében, vagy az epitheliális-mesenchimális átalakulás (EMT) révén alakulnak ki. Fontos szerepet játszanak a tumorsejtek növekedésében és inváziójában, az angiogenesis stimulálásában [2]. Extracelluláris mátrixproteázokat és angiogén faktorokat termelnek, valamint képesek módosítani a tumor gyógyszerérzékenységét [46]. Egyes elméletek szerint az invázió során a TAF-ok által termelt proteázok lebontják a bazális membránt, és az általuk újonnan szintetizált mátrix fehérjék szubsztrátként szolgálnak a vándorló tumorsejtek számára, ezenkívül elősegítik az angiogenezist [44]. *In vivo* egér xenograft modellben is serkentették a beoltott daganatsejtek proliferációját [47]. Tlysty és Cunha kísérletükben egészséges prosztatából és prosztatarákból nyert fibroblasztok, valamint egészséges prosztata-epithelsejtek keverékét oltották immundeficiens egérbe. A normál fibroblasztokkal ellentétben a TAF-ok daganatos átalakulásra készítették az egészséges hámsejteket [48]. A TAF-okat fokozott strómasejt eredetű faktor-1 (SDF-1 vagy CXCL-12) termelés jellemzi, melynek központi szerepe van a tumor növekedésében és az érújráképződésben. Utóbbi CXCR-4 receptoron keresztül fejti ki hatását, az érzékelést a keringő endothelsejt-előalakok tumorhoz

vonzásával idézi elő. Emlőtumor xenograft modellben a TAF-á alakuló fibroblasztok önfenntartó SDF-1 és TGF- β autokin jelutakat generálva segítik a daganat progresszióját [49, 50].

Kimutatták, hogy a fibroblasztokat aktiváló faktorok nagy hányadát, mint a vérlemezke eredetű növekedési faktort (PDGF), az FGF-2-t, és a transzformáló növekedési faktor β -t (TGF- β) maguk a tumorsejtek termelik [51]. A daganatsejtek által termelt növekedési faktorok és citokinek parakrin úton serkentik, vagy gátolják a strómasejteket. A fibroblasztok osztódását serkentő PDGF receptora a tumorsejteken nem mutatható ki, tehát a daganatsejtek a kötőszöveti sejtek és periciták proliferációjának serkentéséhez termelik a PDGF fehérjét [52]. A TGF- β kettős szereppel bír a humán daganatokban, mivel tumor szupresszorként és promóterként is funkcionálhat. Szupresszorként gátolja a hámsejtek proliferációját és apoptózist indukál. Promóter szerepét növekedési faktorként érvényesíti: fokozza a fibroblasztok proliferációját, transzformációjukat myofibroblasztokká, majd azok mátrixtermelését. A TGF- β az EMT legfontosabb stimulátora [53-57]. Ahogy a daganat fejlődik nagy mennyiségben juttat autokrin TGF- β -át a mikrokönyezetébe [58]. Ezáltal nem csak önmagára hat, hanem a környező strómára is a sejtadhézió gátlása, immunszupreszió, angiogenezis fokozása, és az extracelluláris mátrix lebontó folyamatainak serkentése révén, melyek mindegyike az áttétképzést serkenti.

A TGF- β egy 3 tagból álló látens komplex formájában szekretálódik. Két prekursor molekula diszulfid-hidakkal kapcsolódik össze, melyek furin hasítás következtében látencia-asszociált fehérjéből (LAP) és a hozzá nem kovalensen kapcsolódó inaktív TGF- β -ából áll. Ez a kisméretű látens komplex kovalensen kötődik a látens TGF- β kötő fehérjéhez (LTBP), létrehozva a nagy látens komplexet, mely kijut az extracelluláris térbe. A komplex LTBP tagja kovalensen kötődik az extracelluláris mátrix fibronektinjéhez és fibrillin szálaihoz. Szöveti károsodás következtében a látens TGF- β komplex konformációs változásokon megy keresztül, melynek hatására létrejön az TGF- β receptornak (TGF β RII) ligandként szolgáló aktív forma. A TGF β RII ezáltal foszforilálódik és

összekapcsolódik a TGF β R1-el, mely beindítja a SMAD jelítvitelt (3. ábra) [59]. A TGF β R2, Smad2 és Smad4 expresszió csökkenése gyakori a humán daganatokban, mely agresszívabb viselkedésű és rosszabb klinikai lefolyású tumort feltételez [7].



3. ábra. Az LTBP komplex összeszerelődése, szekréciónja, és az aktív TGF- β receptorhoz kötődésének folyamata [59]. Az intracelluláris térbe szekretálódott, és párosával összekapcsolódott TGF- β prekursor molékulák furin hasítása következtében létrejön a kis látens komplex. Az LTBP molekulával kovalensen kapcsolódva kijut az extracelluláris térbe, ahol mátrixfehérjékhez, és TGF- β receptorhoz kötődve beindítja a SMAD jelítvitelt.

A myofibroblasztok daganatba jutását az előbb említett érzékszű hatású FGF-2, és VEGF, valamint a növekedést elősegítű TGF- β mellett a proinflammatorikus hatású tumor nekrozis faktor- α (TNF α) és interleukin család tagjai (IL-1, -6, -8) segítik elő [60]. A daganatsejtek immunogenitásának fokozása citokinek helyi hatásnövelésével, elsősorban IL-ok és TNF-ek bevitelével valósulhat meg.

Az interleukin-1 β (IL-1 β) fontos autokrin és/vagy parakrin hatású citokinként képes a gyulladáscsökkentű citokinek aktivitását fokozni, és a különböző ciktokinek expresszióját koordinálni a fejnyaki laphámrákokban. Az IL-1 β okozta E-cadherin expresszió csökkenés, és a proszttaglandin-endoperoxidáz

szintáz-2 (COX-2) expresszió növekedés bizonyíték a fejnnyaki daganatsejtek, és gyulladású citokinek közötti direkt kapcsolatra az EMT során [61]. Az IL-1 β a felsoroltakon kívül még számos gént szabályozni képes, mint az interferon szabályozó faktor 1 (*IRF1*), az interleukin-6 (*IL-6*), és a plazminogénaktivátor inhibitor-1 (*PAI1*). Hatása dexamethason (DEX) kezeléssel gátolható [62].

3. 5. Invázió és metasztázis

A daganat mikrokörnyezete nemcsak a daganat kialakulását, hanem progresszióját is befolyásolja azáltal, hogy lehetőséget ad dedifferenciációra és transzformációra [63]. A laphám eredetű daganatok inváziójának első lépése a bazális membrán áttörése. A daganat közvetlen környezetébe terjedését nevezzük invázióknak. Fő lépései az adhézió, degradáció és migráció. Ezt követően a közvetlen környezetbe terjedés mellett a daganatsejtek betörnek a vér- és nyirokerekbe, melyek útján távoli áttéteket adnak. Ez a metasztázis kaszkádon – invázió, intravazáció, extravazáció, metasztázis - keresztül valósul meg. A primer tumorban és az áttétekben a stróma, főleg annak mikroszkópos jellege szinte teljesen azonos, jelezve, hogy a tumor lényegében az anatómiai helytől függetlenül indukálja a rá jellemző strómát.

A daganatos invázió egyik jellemző eseménye az EMT, melynek során a sejtek elveszítik kapcsolatukat a normál sejtekkel és jelentős morfológiai változásokon esnek át [60]. A daganatsejtek epitheliális-mesenchimalis átalakulását, mint központi folyamatot a tumor inváziójában, progressziójában és metasztázisában a strómális mikrokörnyezet generálja [64]. A folyamat során az invazív tumorsejtek elveszítik hámsejtre jellemző antigénjeiket, polaritásukat, morfológiájukat, majd új mesenchimalis és összejtszerű tulajdonságokkal vétezik fel magukat [65-68]. Az EMT szerepet játszik a primer tumorok metasztatikus átalakulásában [69]. Kopantzev és munkatársai arról számoltak be, hogy az általuk vizsgált normál és tumoros strómasejt kultúrákban vannak olyan EMT-n áteső fibroblasztszerű sejtek, melyek epitheliális és mesenchimalis markerekt - citokeratint és a vimentint - egyaránt expresszálnak [70]. Egy másik

munkacsoport nyelv eredetű laphámrákokon bizonyította, hogy a TAF-ok megtalálhatók a primer és az áttétes daganatokban is. Feltételezik, hogy TAF-ok nem csak a daganat inváziót, hanem az áttétek, akár többszörös nyirokcsomói áttétek létrejöttét is elősegítik az EMT révén [71].

A mátrix metalloproteinázok (MMP) fontos szerepet játszanak mind a bazális membrán, mind a stróma extracelluláris mátrixának proteolitikus bontásában, mely folyamat a malignus tumorok metasztatizálásához vezethet [72, 73]. A 28 szekretált vagy transzmembrán enzimből álló MMP család 22 tagja humán szövetekben is kifejeződik. Régen az MMP-eket aszerint csoportosították, hogy milyen extracelluláris mátrix összetevőt bontottak (kollagenázok, zselatinázok, stromeolizinek, mátrilizinek). Ma már szerkezetük alapján 8 osztályba sorolják őket: 5 szekretált és 3 transzmembrán típus (MT-MMP). Inaktív zymogénként (pro-MMP) szintetizálódnak, és proteínázok hasítása révén jön létre az aktív forma. Aktivitásukat endogén inhibitorok szabályozzák, mint az α 2-macroglobulin, szöveti proteázgátlók (TIMP), kis molekulák TIMP szerű egységekkel, valamint a membrán kötött reverzió indukáló ciszteinben gazdag fehérje Kazal motívumokkal (RECK) [74]. A 72 kDa molekulatömegű MMP-2 és az MT-MMP-k expressziója szoros összefüggésben áll a tumorsejtek invazív és metasztatikus fenotípusával *in vivo* és *in vitro* egyaránt [75-77]. Melanoma szövetmintákon bizonyították, hogy a daganatfészkek szélső tereületein, ahol a kötőszövetes állomány kapcsolatban áll a tumorsejtekkel az MMP-2 és MMP-9 hatása kifejezett, míg a centrális állományra ez nem jellemző [78]. Az alaphártyában jelen lévő laminin-5-ről az MT1-MMP (MMP-14) és MMP-2 lehasítja a γ 2 alegységet, mely a sejteket migrációra készíti, az eredeti fehérje maradéka pedig elveszíti a sejtet kihorgonyzó funkcióját. Világos sejtes petefészkek karcinóma vonalakban Western blottal kimutatták a lehasított γ 2 alegység jelenlétét, valamint immunhisztokémiával igazolták az MT1-MMP kifejeződését a hámsejtek felszínén [79]. Kifejezett áttétképző képességgel rendelkező melanomákban és fibroszarkómákban a laminin γ 2 alegységének tízszeres felszaporodását írták le [80]. Az MT1-MMP enzim a lamininon kívül

olyan sejtfelszíni fehérjéket is hasít, melyeknek szerepük van a hámsejtek kihorgonyzásában (pl: α v integrin és a syndecan-1). Az enzim hasítással aktiválja a TGF- β -t is [81]. Az MMP-1, -3, -7 és MMP-9 magas expressziója és a daganat rosszindulatú jellege között is találtak összefüggést *in vivo* és *in vitro* [82, 83]. A fibroblasztok által termelt MMP-3 a hámsejtek E-cadherin-jének hasításával járul hozzá a tumorsejtek migrációs képességének előmozdításához [14]. Klinikai adatok szerint az MMP-1 jelenléte vastagbélrákokban, az MMP-3 jelenléte emlőrákban egyértelműen rossz prognózist jelent [84, 85]. Normál hámokban az amúgy alacsony MMP-7 és MMP-9 expresszió nő a sebgyógyulás és a hámsejtek malignus átalakulása során. A korábban már említett CD151 köti az MMP-7 előalakját, segítve a mátrix degradációt [24]. Tehát az MMP-k az extracelluláris mátrix lebontása során befolyásolják a daganatok invázióját és metasztázisát [86].

3. 6. A tumor stróma, mint lehetséges terápiás célpont

A fejnyaki laphámrák kifejezés magába foglalja az orrüreg, orrmelléküregek, a szájüreg, a garat és a gége daganatos betegségeit, mely a hatodik leggyakoribb daganattípus világszerte. Ez közel 650000 új diagnózist és ~350000 halálesetet jelent évente [87]. A korszerű műtéti, sugárterápiás és kemoterápiás kezelések ellenére e daganattípus túlélési aránya kevés javulást mutatott az elmúlt 30 évben [7, 88]. Hasonlóképpen a méhnyakrák az évi újabb ~500000 új esettel jelentős egészségügyi problémát jelent a világon. A mellrák után a második legmagasabb előfordulási aránnyal rendelkező betegség a nők körében [89].

A rosszindulatú daganatos betegek életkilátásait, egyben a terápiát alapvetően meghatározza a daganat aktuális kiterjedése és stádiuma. Mindkét laphámrák típusnál prognosztikai jelentőségű a lokális nyirokcsomói érintettség. A tumor invazivitásának helyes értékelése klinikopatológiai vagy immunhisztokémiai vizsgálatok segítségével meghatározza a terápiát, és a beteg életkilátásait. A korai stádiumú laphámrákok kezelése elsősorban a sebészeti, ezt követi a sugárterápia és/vagy kemoterápia, mely segítségével operábilissá válhat

a tumor. Ezek a kezelések elsősorban a daganatsejtek eliminálását célozzák, kevésbé koncentrálnak a daganatos mikrokoznyezetre. Pedig a TAF-ok nem csak a tumorok kialakulásában és növekedésében fontosak, hanem különböző molekulák termelésével nehezítik a daganatgátlók célbajutását. Tehát a daganatos mikrokoznyezet szabályozza a tumorsejtek különböző terápiákkal szembeni érzékenységét [90].

A daganatos mikrokoznyezet, mint terápiás célpont vizsgálata során felfedezésre került a fibroblaszt aktiváló fehérje (FAP), mely a myofibroblasztok plazmamembránjában megjelenő sejtfelszíni szerin-proteáz glikoprotein. Kizárólag a sebgyógyulásban részt vevő és a tumor mikrokoznyezetében található fibroblasztokra jellemző. Túltermeléses vizsgálatok alapján feltételezhető, hogy a FAP fehérje befolyásolja az extracelluláris mátrix újraszervezését, mivel magas expressziója korrelál az MMP-2 és egyéb mátrix fehérjék túltermelésével [91]. Loeffler és munkatársai olyan FAP elleni vakcinát állítottak elő, mely hatására a CD8+ T sejtek szelektíven támadják a TAF-okat. Így sikerült egerekben a multidrog-rezisztens tumorsejtvonalakból létrehozott vastagbél- és emlőrák sejtek növekedését és terjedését visszaszorítani. Azok az egerek, amelyekben a TAF-okat ilyen módon kiiktatták, háromszor olyan hosszán éltek a kemoterápiás kezelés után, mint a kontroll csoport egyedei. Továbbá a vakcinával kezelt állatokban a tumorok növekedése is gátolt, mivel itt a kemoterápiás szerekkel nagyobb hatás érhető el [90].

4. CÉLKITŰZÉSEK

Elsődleges célunk a tumorok invazivitását befolyásoló strómális változások feltérképezése volt két, szövettanilag hasonló tulajdonságú, de eltérő lokalizációjú laphám daganatban. Ehhez méhnyakrák sejteket (CSCC7) normál (NF) és daganatos (TF) méhnyaki területről származó fibroblasztokkal, valamint szájúregi laphámrák sejteket (SCC-25) fogból eredetű normál fibroblasztokkal (PDL) tenyésztettük *in vitro* modellrendszerekben. Másodlagos célként a normál és a tumor-asszociált fibroblasztok eltérő működésének bizonyítását tűztük ki. Az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

- Milyen eltérések mutatkoznak a bazális membrán és extracelluláris mátrix fehérjék lokalizációja, valamint intenzitása között az ép és daganatos méhnyaki kötőszövetben?
- Milyen expressziós különbségek mutathatók ki a normál és a tumor-asszociált fibroblasztok között?
- A fibroblasztok milyen mértékben befolyásolják a tumorsejtek életképességét és proliferációját?
- Milyen fibroblasztok által termelt faktorok segítik vagy gátolják a daganatok invázióját?
- A két daganattípus inváziós képessége milyen mértékben hasonlít vagy tér el egymástól?

5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

5. 1. Vegyszerek, oldatok és pufferek

A méhnyaki modellrendszer vizsgálata a budapesti Semmelweis Egyetem I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet Molekuláris Diagnosztika laboratóriumában történt. A használt oldatok és pufferek elkészítéséhez, és hígításához steril, desztillált, endotoxinmentes Millipore desztilláló rendszerrel előállított vizet használtunk.

A fejnnyaki modellrendszer vizsgálata az innsbrucki Orvosi Egyetem Fül-Orr-Gége Klinikájának Onkológia-Molekuláris biológia laboratóriumában történt. Az ott használt általános vegyszerek a Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Germany) cégtől származnak. A vizsgálatokban használt reagensek mindegyike molekuláris biológiai tisztaságú volt. Az oldatok és pufferek elkészítéséhez, és azok hígításához steril, desztillált, endotoxinmentes AMPUWA (Fresenius KABI, Bad Homburg, Germany) vizet használtunk.

A disszertációban előforduló speciálisabb anyagok és reagensek adatait az alábbi felsorolás tartalmazza:

DMEM-low glucose medium (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA; D6046)

RPMI-1640 medium (Sigma-Aldrich Co.; R8758)

DMEM/Ham's F-12 medium (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria; E15-817)

Amnio Grow Plus (CytoGen GmbH, Sinn, Germany; AGM-100M)

Fetal Bovine Serum Heat Inactivated (Sigma-Aldrich Co.; F9665)

Penicillin-Streptomycin Solution (Sigma-Aldrich Co.; P4333)

Trypsin-EDTA Solution (Sigma-Aldrich Co.; T4049)

Dimethyl sulfoxide (Sigma-Aldrich Co.; D2650)

Sulforhodamine B sodium salt (Sigma-Aldrich Co.; S9012)

Mitomycin C from *Streptomyces caespitosus* (Sigma-Aldrich Co.; M0503)

Dexamethasone (Sigma-Aldrich Co.; D4902)

Recombinant Human IL-1 β (Sigma-Aldrich Co.; SRP6169)

Recombinant Human TGF- β 1 (Sigma-Aldrich Co.; T7039)
Fibronectin from human plasma (Sigma-Aldrich Co.; F0895)
Laminin from Engelbreth-Holm-Swarm murine sarcoma basement membrane (Sigma-Aldrich Co.; L2020)
TRIZOL[®] Reagent (Invitrogen by Life Technologies Co., Carlsbad, California, USA; 15596-026)
RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany; 74134)
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems by Life Technologies Co., Warrington, UK; 4368814)
Power SYBR[®] Green PCR master mix (Applied Biosystems by Life Technologies Co.; 4367659)
Protease from Streptomyces griseus (Sigma-Aldrich Co.; P6911)
Dako Liquid DAB + Substrate Chromogen System (DakoCytomation, Dako North America Inc, Carpinteria, CA, USA; K3468)
Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Rosche, Mannheim, Germany; 04693159001)
Bromophenol Blue (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Germany; 161-0404)
Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories GmbH; 500-0006)
2-Mercaptoethanol (Fulka, Sigma-Aldrich Co.; 63690)
30% Acrylamide/Bis Solution (Bio-Rad Laboratories GmbH; 161-0156)
Ammoniumpersulfate (Serva Feinbiochemica GmbH & Co., Heidelberg, Germany; 13375)
Sodium dodecyl sulfate (Sigma-Aldrich Co.; L-4390)
TEMED (Bethesda Research Laboratories by Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD, USA; 5524UB)
Novex[®] Sharp Pre-stained Protein Standard (Invitrogen by Life Technologies Co.; LC5800)
Coomassie Brilliant Blue R-250 (Bio-Rad Laboratories GmbH; 161-0400)
Zselatin (Reanal Finomvegyszergyár ZRt., Budapest, Hungary; 6001)

Casein from bovine milk chromatography (Sigma-Aldrich Co.; C6780)

Ponceau S (Sigma-Aldrich Co.; P-3504)

Blotting Grade Blocker Non-Fat Dry Milk (Bio-Rad Laboratories GmbH; 170-6404)

Albumin from bovine serum (BSA) (Fulka, Sigma-Aldrich Co.; 05488)

Tween[®] 20 (Sigma-Aldrich Co.; P5927)

Hydrogen peroxide 30% (Scharlau Chemie S. A., Sentmenat, Spain; HI01361000)

ECL SuperSignal[®] West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA; 3478)

Az általánosan használt laboratóriumi vegyszerek a Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA), Merck (Darmstadt, F. R. Germany), és REANAL Finomvegyszergyár Zrt. (Budapest, Hungary) vegyszergyártó cégektől származnak. A fehérje vizsgálatokhoz használt elsődleges és másodlagos ellenanyagok adatait a függelék 1. táblázata tartalmazza. A vizsgálatokhoz használt általános pufferek összetétele:

TBS (10x): 150mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH=7,5

TBST: 1 x TBS + 0,05% Tween[®] 20

PBS (10x): 1,7M NaCl, 33,5 mM KCL, 18,4 mM KH₂PO₄, 76,6 mM Na₂HPO₄.2H₂O, pH=7,5

PBST: 1 x PBS + 0,005% Tween[®] 20

Fehérje extrakciós puffer: 20 mM Hepes pH=7,8, 10 mM KCL, 0,1 mM EDTA, Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets, DTT, 10% v/v NP40

Zselatináz lízis puffer: 50 mM Tris-HCL pH=7,6, 500 mM NaCl, 5 mM CaCl₂

Zselatináz emésztő puffer: 50 mM TRIS*HCl pH=7,4, 10 mM CaC₂

Laemmli puffer (5x): 250 mM Tris-HCL pH=6,8, 50% Glicin, 5% SDS, 0,05% Bromophenol Blue

SDS-PAGE futtató puffer (10x): 192 mM Glicin, 25 mM Tris, 0,1% SDS

Blottoló puffer (10x): 192 mM Glicin, 25 mM Tris, 10% Methanol

5. 2. Sejtenyésztés, sejt kísérletek

5. 2. 1. Sejtkultúrák

A méhnyaki fibroblasztok egy Wertheim-műtéten átesett beteg méhnyaki kötőszövetéből származnak. A méhnyak tumoros és a tumortól távoli (normál) területeiről kimetszett szövetdarabokat szikével apróra vágtuk, majd az explantátumokat sejtenyésztő edényben Cytogene Amnio Grow Plus médiumban tenyésztettük, míg passzálható fibroblaszt tenyészetet kaptunk. A harmadik passzálást követően a sejteket 37°C-on 5% CO₂ tartalom mellett alacsony glükóz tartalmú DMEM tápfolyadékban tenyésztettük, mely 10% FBS-t, 2 mM L-glutamint, 100 U/ml penicillint, és 100 µg/ml streptomycint tartalmazott. A továbbiakban a normál fibroblasztokat NF, a tumoros területről kinőtt fibroblasztokat TF jelöléssel használom.

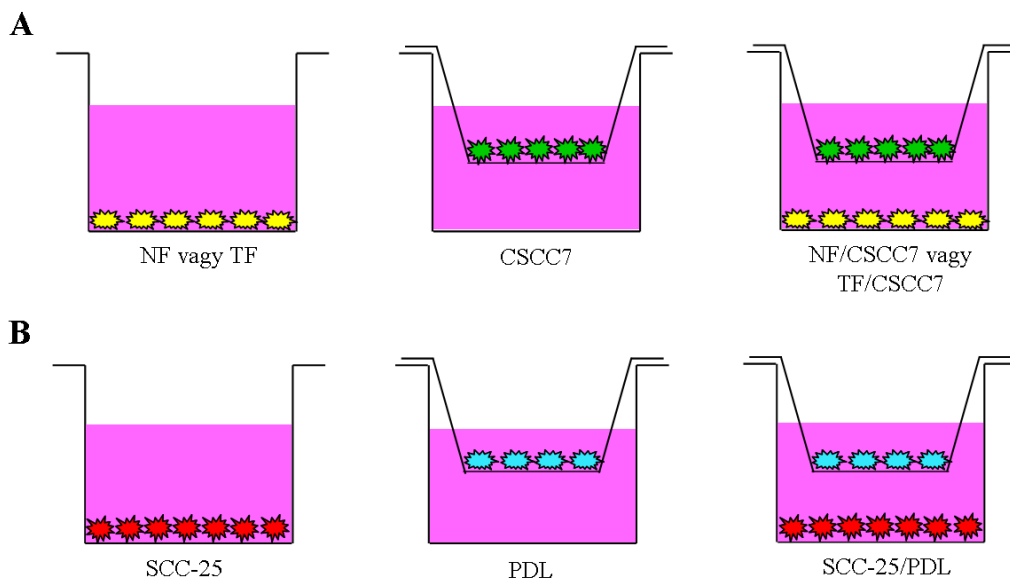
A méhnyakrák sejtvonal (non keratinizing large cell cervical squamous cell carcinoma (CSCC7)) a leideni egyetemről származik [92]. A CSCC7 tumorsejteket 37°C-on 5% CO₂ tartalom mellett RPMI-1640 tápfolyadékban tenyésztettük, mely 10% FBS-t, 2 mM L-glutamint, 100 U/ml penicillint, és 100 µg/ml streptomycint tartalmazott.

A humán fogbél fibroblasztok (human peridontal ligament fibroblast (PDL)) Prof. Dr. Miosge-től (Department of Prosthodontics, Georg-August-University, Göttingen, Germany) származnak. A PDL fibroblasztokat 37°C-on 5% CO₂ tartalom mellett alacsony glükóz tartalmú DMEM tápfolyadékban tenyésztettük, mely 10% FBS-t, 2 mM L-glutamint, 100 U/ml penicillint, és 100 µg/ml streptomycint tartalmazott.

A humán szájüregi laphámrák sejtvonal (human oral squamous carcinoma cell (SCC-25)) a German Collection of Microorganisms and cell cultures (DSMZ, Braunschweig, Germany) cégtől származik. Az SCC-25 sejteket 37°C-on 5% CO₂ tartalom mellett DMEM/Ham's F-12 tápfolyadékban tenyésztettük, mely 10% FBS-t, 2 mM L-glutamint, 100 U/ml penicillint, és 100 µg/ml streptomycint tartalmazott.

5. 2. 2. Direkt és indirekt kokultúrák

A méhnyaki modellrendszer esetében kezdetben direkt kokultúra rendszerben vizsgáltuk a fibroblasztok és tumorsejtek közti kölcsönhatást, mely esetben a két sejt között fizikai kontaktus jön létre. Az NF, TF és CSCC7 sejteket külön, és együtt 10 cm átmérőjű tenyésztőedényekbe (SARSTEDT AG&Co, Nümbrecht, Germany) 50000 sejt/ml sejtszámmal helyeztük 5% FBS tartalmú kevert médiumban (50% DMEM-low glucose/ 50% RPMI-1640). A kirakást követő 48. órában a tenyészeteken tápfolyadékot cseréltünk, a 72. órában az 5% FBS tartalmat 0,3%-ra cseréltük. A 96. órát követően a felülűszót lefagyasztottuk, és a sejteket felkapartuk a későbbi fehérje szintű vizsgálatokhoz. A direkt kokultúrák mintákat a továbbiakban NF+CSCC7 és TF+CSCC7 jelöléssel használom.



4. ábra. A méhnyaki (A) és a fejnnyaki (B) modellrendszerek: mono- és indirekt kokultúrában való tenyésztés inzerttel elválasztott tenyésztőedényekben.

Az NF, TF és CSCC7 sejteket, illetve a PDL és SCC-25 sejteket egymástól inzerttel elválasztott indirekt kokultúra rendszerben is tenyésztettük. A sejtek Trypsin EDTA-val történő felszedését követően a fibroblasztokat 10^4 /ml sejtszámmal, az SCC-25 és CSCC7 sejteket 4×10^4 /ml sejtszámmal saját

médiumukban, 10% FBS tartalom mellett 6 lyukú platekben (Corning Incorporated Life Sciences) tenyésztettük. A tenyésztő edénybe 0,45 µm műanyag membrán filterrel rendelkező Transwell®-clear polietilén membránokat (Corning Incorporated Life Sciences) helyeztünk, melyekkel térben elválasztottuk a fibroblasztokat a tumorsejtektől. A méhnyaki modellrendszer esetében a NF és TF az edény alján, a CSCC7 sejtek az inzertekben nőttek (4A. ábra), míg a fejnyaki modellrendszer esetében az SCC-25 sejtek a platek alján, a PDL fibroblasztok pedig az inzertben nőttek (4B. ábra). Ezt a kísérleti rendszert alkalmaztuk a kontrollok esetében is. A kokultúra rendszerben 48 órával a kitevést követően az PDL illetve CSCC7 sejteket tartalmazó inzerteket az SCC-25, illetve NF és TF sejtek fölé helyeztük, a médiumot 5% FBS tartalmú kevert médiumra (fejnyaki modellrendszer: 50% DMEM-low glucose/ 50% DMEM/Ham's F-12; méhnyaki modellrendszer: 50% DMEM-low glucose/ 50% RPMI-1640) cseréltük. A kontroll mintákon is a tápfolyadékot kevert médiumra cseréltük. A kitevést követő 5. napon a kontroll és kokultúrában nevelt tenyészeteken tápfolyadékot cseréltünk, a 6. napon az 5% FBS tartalmú kevert médiumot 0,3% FBS tartalmú kevert médiumra cseréltük, majd 24 óra múlva felkapartuk RNS és fehérje izolálás céljából.

A továbbiakban az indirekt kokultúra minták esetében az alábbi jelöléseket használom:

NF/CSCC7 – NF minta az edény aljából izolálva CSCC7-el indirekt kokultúrában

NF/CSCC7 – CSCC7 minta az inzertből izolálva NF-el indirekt kokultúrában

TF/CSCC7 – TF minta az edény aljából izolálva CSCC7-el indirekt kokultúrában

TF/CSCC7 – CSCC7 minta az inzertből izolálva TF-el indirekt kokultúrában

PDL/SCC-25 – PDL minta az inzertből izolálva SCC-25-el indirekt kokultúrában

PDL/SCC-25 – SCC-25 minta az edény aljából izolálva PDL-el indirekt kokultúrában

5. 2. 3. Kezelések

A PDL és SCC-25 sejteket 10 cm átmérőjű tenyésztő edényekben (SARSTEDT AG&Co) 2×10^5 /ml sejtszámmal, monokultúrában, 10% FBS tartalmú saját médiumban tenyésztettük. 48 órával a sejtek kirakását követően a 10% FBS tartalmú médiumot 0,3% FBS tartalmúra cseréltük, és 0,015-1,5 ng/ml IL-1 β kezelést alkalmaztunk [93]. A kezelést követő 4., 8. és 24. órában a sejtekből RNS-t izoláltunk.

A fejnnyi kokultúra rendszerben nevelt tenyészetek egy részét dexamethasone-nal (DEX) (Sigma-Aldrich) kezeltük [62]. A tenyészeteket a drog gyors felezési ideje miatt, a kokultúra mind a négy napján 0,3% FBS tartalmú kevert médium cseréje mellett 10^{-6} mol/L DEX-el kezeltük.

5. 2. 4. Proliferációs vizsgálat

A fibroblasztok és tumorsejtek proliferációs aktivitását szulforodamin B (SRB) kolometriás módszerrel mértük. Az NF és TF sejteket 2500 sejt/well, a CSCC7 sejteket 3500 sejt/well sejtszámmal 200 μ l tápfolyadékban helyeztük a 96 lyukú tenyésztő edényekbe (Corning Incorporated Life Sciences). A vizsgálatok minden sejttel minden kondícióban 8 vagy 16 párhuzamos használatával történtek. A proliferációs aktivitást a sejtek letapadását követően (kirakás után 3 órával) 0, 24, 48, 72 és 96 órás időpontokban mértük.

A sejtek egymáshoz viszonyított proliferatív képességének mérésekor vizsgáltuk a szérumsökkentés, lassú éheztes hatását. A 10%, 5% és 0,3% FBS tartalmú tápfolyadékban tenyésztettük a sejteket, melynél a 0,3% FBS tartalmú tápfolyadék mindig csak 24 órán át volt a sejteken. A tápfolyadékot 48 óránként cseréltük.

Vizsgáltuk, hogy a fibroblaszt kondicionált tápfolyadék hogyan befolyásolja a tumorsejt proliferációját, illetve fordítva. Ebben az esetben az ellenkező konfluens sejtenyészet 48 órás kondicionált, szűrt tápfolyadékát (amit ~0% FBS tartalmúnak tekintettünk) kevertünk össze 10% FBS tartalmú friss

tápfolyadékkal. Így az ~5% FBS tartalmú kondicionált tápfolyadékot 24 óránként cseréltük.

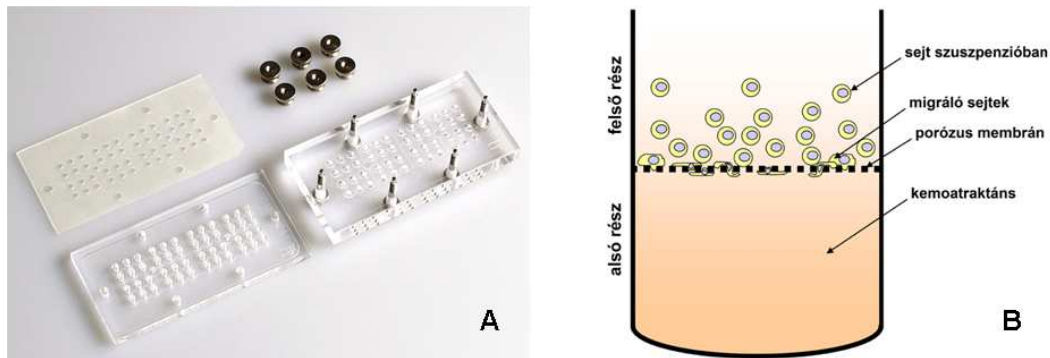
A mintákat öt időpontban triklórecetsavval (TCA) fixáltuk 1 órán át, 4°C-on 10%-os végkoncentrációban. A TCA ebben a koncentrációban a letapadt sejteket az edény aljához fixálta. A fixálást követően a mintákat ötször csapvízzel átmostuk, majd szárítottuk. A fixált sejteket 1% ecetsavban oldott 0,4% SRB-vel festettük a fixált sejteket 20 percen keresztül. A felesleges festéket 1%-os ecetsavval mostuk, majd szárítottuk. Végül a mérés előtt lyukanként 150 µl pufferezetlen, 10 mM-os Trissel oldottuk a sejtekhez kötődött festékanyagot. Teljes kioldódás után Labsystem Multiskan MS 352 készülékkel (Labsystems, Finland) 570 nm-en abszorbanciát mértük, mely a sejtek mennyiségével arányos.

5. 2. 5. Tumorsejt migrációs és inváziós assay

A migrációs vizsgálatok esetében a két modellrendszert más módszerekkel vizsgáltuk. A méhnyaki modellrendszerrel az NF, TF és CSCC7 sejtek kemoattraktánsokkal szembeni migrációs képességét Boyden-kamrában való migráltatással vizsgáltuk. A fejnyaki modellrendszer esetében inzertes mono- és indirekt kokultúra rendszerekben vizsgáltuk miként befolyásolják a PDL fibroblasztok az SCC-25 tumorsejtek inváziós és migrációs képességét.

A méhnyaki modellrendszer sejtjeinek motilitását 48-lyukú Boyden-kamrában vizsgáltuk (48-Well Micro Chemotaxis Chamber Neuro Probe, Gaithersburg, MD, USA, 5A ábra), melynek 48 darab vakon végződő alsó kamráját a felső kamráktól egy 8 µm pórusátmérőjű polikarbonát membrán (Whatman, GE, Healthcare Bio-Sciences Co., Florham Park, NJ, USA) választja el (5. ábra).

Kemoattraktánsnak 10% FBS tartalmú médiumot, saját, másik sejt és a kettő keverék kondicionált médiumát, 25 µg/ml savómentes médiumban hígított fibronektint, valamint laminin-1-et használtunk, melyeket az alsó kamrába töltöttünk. Erre helyeztük a membránt, majd a tömítő szilikonlapot, végül a felső kamrát.



5. ábra. Az A ábrán a 48 mintás Boyden-kamra alsó- és felső egysége látható a köztes tömítő szilikonos gumilappal, valamint a két egységet összefogó csavarokkal. A B ábrán a Boyden-kamra egy cellájának sematikus ábrája látható a kemotaxis vizsgálat közben. Az alsó egységben a kemoatraktáns, a felső egységben a vizsgálandó sejt szuszpenziója van helyezve, melyeket porózus polikarbonát membrán választja el egymástól.

Az NF és CSCC7 sejteket 10% FBS tartalmú DMEM és RPMI-1640 tápfolyadékokban neveltük a konfluencia állapot kialakulásáig Petri-csészékben. A sejtek proliferációját 10 µg/ml koncentrációjú 5 perces mitomycin C kezeléssel gátoltuk [94], majd a tenyészeteket 10% FBS tartalmú médiumban tenyésztettük tovább egy napig. Az összeállított Boyden-kamra felső részébe az EDTA-val felvett, majd a centrifugálást követően 10% FBS tartalmú médiumban szuszpendált sejteket (50 µl 10⁶ sejt/ml) töltöttünk (5B ábra). A Boyden-kamrát 24 órán át inkubáltuk 5% CO₂ mellett 37°C-on, majd szétszedtük. A membránt a nem migrált sejtek eltávolítása után -20°C-os metanollal fixáltuk. A migrált sejtek mennyiségét Toluidin-kék festés után denzitometriával mértük a Kodak Image Station 4000MM készülékkel (Carestream Health, Inc., Rochester, NY, USA) és a hozzá tartozó programmal.

A mono- és kokultúra rendszerben tenyésztett SCC-25 sejteket Trypszin EDTA-val felszedtük és megszámoltuk. A sejteket 2 ml 0,3% FBS tartalmú DMEM/Ham's F-12 illetve RPMI-1640 médiumban szuszpendáltuk 2 x 10⁵/ml végső sejtszámmal. A migrációs és inváziós vizsgálatokhoz a 6 lyukú edények aljába (Corning Incorporated Life Sciences), a 8 µm átmérőjű lyukakat tartalmazó inzertek alá 2 ml 10% FBS tartalmú DMEM/Ham's F-12 illetve RPMI-1640

médiumot tettünk. Az inváziós assay esetében mátrigélt 200 µg/ml koncentrációjúra hígítottuk, majd 1 órán keresztül bevontuk vele a filter felső részét. Mindkét vizsgálatnál 1-1 ml sejt szuszpenziót töltöttünk az inzertekre és 24 órán át 37°C-on inkubáltuk, majd a 8 µm vastag inzertek tetejéről a sejteket óvatosan egy vattapálcikával letöröltük. Az elvándorolt vagy migrált sejteket feltripszinezttük az inzertek alsó oldaláról, majd megszámoztuk [95].

5. 3. Génexpressziós vizsgálatok

5. 3. 1. RNS izolálás

Teljes RNS izoláláshoz a sejttenyészeteket 3x mostuk hideg PBS-el, majd 1 ml a sejtekhez adott Trizol reagensben a sejteket felkapartuk. A mintákat 5 percig jégen inkubáltuk, majd a mintákhoz 200 µl kloroformot adtunk és 13000 g fordulatszámmal 15 percig 4 °C-on centrifugáltuk. A felső vizes fázist tiszta csőbe pipettáztuk, majd ehhez 70 µl 3M-os nátrium-acetátot, ezt követően 700 µl izopropanolt adtunk. Ismételt centrifugálás után a pelletet először 500 µl abszolút etanollal, majd 75%-os etanollal mostuk. Centrifugálás után a csapadékot szobahőmérsékleten kiszárítottuk, majd 30 µl vízben oldottuk. Az RNS koncentrációt NanoDrop ND-1000 Full-spectrum UV/Vis spektrofotométerrel (NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, DE, USA) határoztuk meg. Az izolált RNS mintákat -80 °C-on tároltuk.

5. 3. 2. Reverz transzkripció

A teljes RNS-t reverz transzkripcióval cDNS-re írtuk át. A reverz transzkripció lineáris kinetikát követ, a keletkező cDNS mennyisége egyenesen arányos az mRNS mennyiségével. Az RNS-bemérés esetleges pontatlanságából adódó hibák kiküszöbölésére az expressziókat *ACTB* belső standardhoz viszonyítottuk. A reakció összemérésének adatait az 1. táblázat tartalmazza. Az átírást követően 20 µl cDNS terméket kaptunk, melyet vízzel ötszörösére hígítottunk a további real-time PCR munkákhoz.

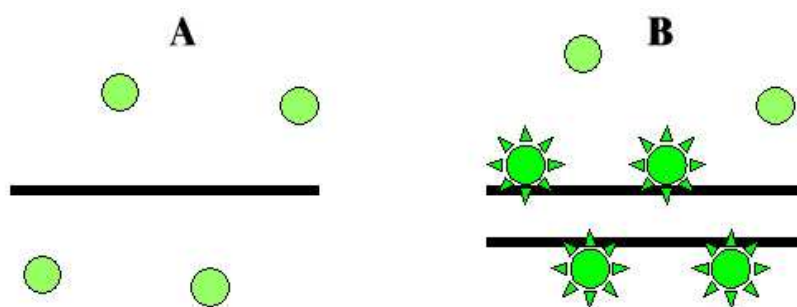
1. táblázat. A reverz transzkripció metodikája.

Felhasznált anyagok	Törzsoldat koncentrációja	Térfogat (μl)	Végkoncentrációk ill. mennyiségek
Össz RNS	-	10	1 μg
RT Buffer	10x	2	-
dNTP mix	25x	0,8	100 mM
RT Random Primers	10x	2	-
Reverse Transcriptase	1x	1	-
RNase Inhibitor	1x	1	-
H ₂ O	-	3,2	-
25 °C - 10 perc 37 °C - 120 perc 85 °C - 5 perc 4 °C - ∞			

5. 3. 3. Valós idejű (real-time) PCR

A mRNS expressziót reverz transzkripciót követő real-time PCR módszerrel mértük. Ez a hagyományos PCR-hez képest több információt nyújt, mivel minden egyes ciklusban (fluoreszcens technikával) megméri a reakcióelegyben aktuálisan jelen lévő termék mennyiségét. Az X-tengelyen a ciklusszámot, az Y-tengelyen pedig a relatív fluoreszcencia mennyiségét ábrázolva felrajzolja a reakció kinetikai görbét. A polimeráz reakció exponenciális szakaszára igaz a 2ⁿ kinetika, mely szerint a termékek mennyisége minden ciklusban megduplázódik. Tehát ha egy bizonyos fluoreszcencia értéket két különböző reakció egy ciklus különbséggel ér el, akkor az egyik reakcióban kétszer annyi kiindulási templát volt, mint a másikban. Ezzel a módszerrel különböző genotípusok, ill. kezelések hatására bekövetkező fehérjék mRNS-einek mennyiségi változásait mérjük.

A ciklusonkénti relatív termékmennyiség-meghatározásra SYBR Green módszert használtunk. A SYBR Green egy DNS-be interkalálódó fluoreszcens festék, mely a kétszálú DNS-hez kötve válik fluoreszcensen aktívvá (6. ábra). A ciklusonként mért fluoreszcencia érték tehát arányos a reakció elegyben jelen lévő termék mennyiségével.



6. ábra. A PCR termék detektálása SYBR Green-nel. A SYBR Green a denaturált (egyszálú) DNS-hez nem kötődik, és így fluoreszcensen sem aktív (A). A festék a kétszálú DNS-be interkalálódik és fluoreszcens fényt bocsájt ki, melynek intenzitása arányos a keletkezett termék mennyiségével (B).

Fontos azonban megjegyezni, hogy ennél a detektálási módnál az esetlegesen jelen lévő aspecifikus termékek és primer-dimerek is jelet adnak, zavarva az objektív kiértékelést. Ezért célszerű a reakció után olvadáspont analízist végezni, melynek során a készülék a hőmérséklet emelésével párhuzamosan méri a fluoreszcenciát. A jelen lévő termék olvadáspontját elérve a termék egyszálúvá válik, és a fluoreszcencia hirtelen csökken. Amennyiben többféle termék képződött a reakcióban, úgy az olvadáspont vizsgálat során több fluoreszcencia esés is bekövetkezik, ebből következtethetünk arra, hogy a reakció nem működik optimálisan, további beállítások szükségesek.

A génexpressziós vizsgálatokhoz használt primerek adatait a függelék 2. táblázata tartalmazza. A 2. táblázat a reakciók összemérésének és paramétereinek adatait foglalja össze.

2. táblázat. A PCR reakció összemérésének adatai.

Felhasznált anyagok	Törzsoldat koncentrációja	V (µl)	Végkoncentrációk ill. mennyiségek
Sybr green	2X	12,5	1X
Forward primer	5 µM	1	0,005 µM
Reverse primer	5 µM	1	0,005 µM
H ₂ O	-	8,5	-
cDNS		2	20 ng

Minden génre a 3. táblázatban látható PCR programot alkalmaztuk ABI Prism 7000 Sequence Detection System készüléken (Applied Biosystems by Life Technologies Co.) Sequence Detection Software version 1.2.3. program segítségével. A kapott C_T értékből a relatív expressziós értékeket a $2^{-\Delta C_T}$ képlet alapján kalkuláltuk.

3. táblázat. A real-time PCR reakció paramétereit.

Folyamat	Hőmérséklet (°C)	Időtartam	Ciklusszám
Enzimaktiváció	95	10 perc	1
Denaturálás	95	15 sec	40
Anellálás	55-61	30 sec	40
Primer extenzió	72	10 sec	40
Olvasáspont elemzés	95	1 perc	1
	55	1 perc	1
	55	10 sec	81

5. 4. Fehérje vizsgálatok

5. 4. 1. TMA, immunhisztokémia és immuncitokémia

A szöveti microarray analízishez (tissue microarray (TMA)) felhasznált szöveti blokkok az I. sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikán végzett Wertheim műtétekből származnak. Olyan mintákat válogattunk vizsgálatunkhoz, melyek HPV státusza már kutatócsoportunk egyik korábbi munkája során megállapításra került [96]. A betegek életkorát, a FIGO stádium szerinti besorolást, a szövettani diagnózist, és a HPV státusz adatait a függelék 3. táblázata foglalja össze. A portio vaginalis uteri területről származó szövetek paraffinos blokkjaiból metszeteket készítettünk. A hematoxilin-eozinnal festett metszeteken kijelöltük a tipikusan tumoros és ép területeket, majd a blokkokból a jelölt terület kivágott szöveti hengerét 7x10 lyukat tartalmazó TMA paraffin blokkba helyeztük. Az így elkészített 27 ép és 29 tumoros mintát tartalmazó multiblokkból metszeteket készítettünk, és az alábbiakban leírt immunhisztokémiai módszerrel vizsgáltuk. Elsődleges ellenanyagként SMA, laminin-1, laminin-5 és fibronektin ellenanyagokat használtunk (függelék 1. táblázat). A kész immunlemezeket Scan Scope CS2 szkennelőrrel (Aperio Technologies Inc., Vista, CA, USA) szkenneltük

és a műszerhez tartozó MAN-0023 Color Deconvolution Algorithm szoftverrel elemeztük. A kapott adatok alapján az immunreakciók intenzitás különbségeit statisztikailag értékeltük.

A formalinba fixált, paraffinba ágyazott metszetek antigén feltárása deparaffinálást (kétszer váltott xilol, majd leszálló ethanol sor), és pufferes mosást követően a citrát pufferes (10 mM Na-citrát pH=6, 30 perc, 100°C) főzés után 10 perces proteáz emésztéssel (2,5 mg/ml) történt. Az endogén peroxidáz aktivitást 10%-os H₂O₂-dal blokkoltuk 10 percig szobahőmérsékleten. A mosási lépést követően az aspecifikus kötődések megakadályozásához a lemezeket 5 w/v%-os BSA (PBS) oldattal inkubáltuk 1 órán át szobahőmérsékleten, majd az 1 w/v%-os BSA-ban (PBS) oldott elsődleges ellenanyaggal egész éjszakán át 4°C-on. Az immunreakciók vizualizálása egyrészt fluorofórral konjugált másodlagos ellenanyagokkal, másrészt konjugált polimer módszerrel történt. A konjugált polimer módszer esetében az immunreakciót Dako Cytomation EnVision System/HRP másodlagos antitestekkel, és HRP enzimekkel konjugált DAB/H₂O₂ kromogén-szubsztrát kittel hívtuk elő.

Az immuncitokémiai vizsgálatokhoz 6 lyukú tenyésztőedényekbe (Corning Incorporated Life Sciences) helyezett steril fedőlemezre növesztettük a sejteket mono és direkt kokultúrában. A sejteket -20°C-os metanollal 10 percig, majd acetonnal 1 percig fixáltuk az üveglemezre. PBS-sel történő mosást követően a lemezeket 5 w/v%-os PBS-ben oldott BSA oldattal blokkoltuk 1 órán át szobahőmérsékleten, nedves kamrában. Az 1 w/v%-os BSA-ban (PBS) oldott elsődleges ellenanyaggal egész éjszakán át 4°C-on inkubáltuk nedves kamrában a lemezeket, majd a mosási lépés után fluorescens festékekkel konjugált másodlagos antitestet alkalmaztunk 1 órán keresztül. A sejtmagokat kék színű 4',6-diamidino-2-fenilindolal (DAPI) festettük. Az immunfluorescens készítmények vizsgálata, és a fotók készítése Nikon Eclipse E600 epifluorescens mikroszkóppal (Nikon Co., Tokyo, Japan), VDS Vosskuhler CCD-1300 monokróm kamerával, LUCIATM Cytogenetics version 1.5.6 szoftverrel, vagy Bio-Rad MRC 1024 konfokális lézer mikroszkóppal (Bio-Rad Laboratories GmbH) történt.

5. 4. 2. Fehérje izolálás

A Western blot vizsgálatok esetében a sejteket 6 lyukú tenyésztőedényekben (Corning Incorporated Life Sciences), és Petri-csészékben (SARSTEDT AG&Co) neveltük. A 0,3% FBS tartalmú kondicionált tápfolyadék eltávolítása és fagyasztása után a sejteket mostuk hideg PBS-el, majd 500 µl hideg extrakciós pufferben felkapartuk és homogenizáltuk. A fehérjék koncentrációját Bradford módszerrel [97], Ultrospec-2000 UV/Vis spektrofotométerrel (Hoefer Pharmacia Biotech Inc, San Francisco, CA, USA) határoztuk meg, és a mintákat -80 °C-on tároltuk.

A zselatin és casein zymogramhoz a sejteket 500 µl hideg zselatináz lízis pufferben vettük fel, majd a 15 µg fehérje mintákat 2X koncentrációjú mintapufferben oldottuk.

5. 4. 3. Kazeináz és zselatináz zymogram, Coomassie festés

Az MMP-1 és MMP-7 aktivitásának mérésére kazein-tesztet, az MMP-2 és MMP-9 aktivitásának vizsgálatához zselatináz-tesztet végeztünk sejt kultúra felülúszó és sejt lizátum mintákon.

A mintapufferben oldott, 20 µg fehérje tartalmú mintákat 300 µg/ml kazeint vagy 150 µg/ml zselatint tartalmazó 10%-os vagy 7,5%-os SDS-poliakrilamid géltre vittük fel. Az elektroforézis (40 mA, 1 óra) után a géleket 2,5%-os TritonX-100 oldatban mostuk 30 percig, majd 20 órán keresztül 37 °C-on emésztő pufferben inkubáltuk. A géleket 30% metanolt és 10% ecetsavat tartalmazó oldatban fixáltuk 30 percig, majd 0,5% Coomassie Brilliant Blue R-250 oldattal festettük 30 percig. A fixáló oldatba visszatett géleken néhány perc múlva kék háttéren előtűnő átlátszó csíkok jelentek meg a zselatináz aktivitás helyén. A differenciáltatott géleket a fejnyaki modellrendszer esetében HP Scanjet G2410 szkennelvel (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA) szkenneltük és az ImageJ programmal denzitometráltuk. A cervix minták esetében a géleket Kodak Image Station 4000MM Digital Imaging System készülékkel (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA) dokumentáltuk.

Az SDS-PAGE gélek Coomassei festését aztért alkalmaztuk, hogy a zselatin és kazein gélek esetében is tudjuk detektálni az azonos mintabemérést. Az elektrofozízist követően a poliakrilamid géleket 30% metanolt és 10% ecetsavat tartalmazó oldatban fixáltuk háromszor 15 percig, majd az ecetsavban oldott Coomassie Brilliant Blue R-250 oldatban 1 órán át inkubáltuk enyhe mozgítás mellett. A festéket az előbb leírt fixáló oldatban differenciáltattuk, majd az átlátszó gélen kék színben előtűnő fehérjéket a fentiekben leírt módokon dokumentáltuk és denzitometráltuk.

5. 4. 4. Western bolt

Az izolált fehérje mintákból 15 µg-ot összekevertünk β-merkaptóetanolt tartalmazó Laemmli-féle mintapufferrel, denaturáltuk 95°C-on 5 percig, majd betöltöttük standard 7,5% vagy 10%-os poliakrilamid gélek zsebeibe. Az elektroforézis 200 V feszültséggel 30 percig Bio-Rad Power Pac 3000 (Bio-Rad Laboratories GmbH) készülékkel történt.

A blottolás a fejnyaki modellrendszer esetében nitrocellulóz membránra (Bio-Rad Laboratories GmbH) történt, konstans 400 mA áramerősség mellett 1 órán át. A cervix mintákat PVDF membránra (Merck Millipore Co.) 75 mA áramerősség mellett, 24 órán keresztül, 4°C-on blottoltuk. A blottolás hatékonyságát Ponceau-festéssel ellenőriztük. Ezt követte az aspecifikus antitestkötődés blokkolása 5 w/v%-os tejpor és 1 w/v%-os BSA TBS-ben oldott keverékével 1 órán keresztül szobahőmérsékleten inkubálva. Az elsődleges és másodlagos antitestek adatait a függelék 1. táblázata tartalmazza. A cervix mintáknál jelerősítést nem alkalmaztunk, a reakciót ECL szubsztráttal hívtuk elő és Kodak Image Station 4000MM Digital Imaging System készülékkel dokumentáltuk. A fejnyaki minták esetében a biotinilált másodlagos antitest mosását követően a jelerősítést 1:2000 hígítású tormaperoxidázzal jelölt streptavidin oldattal (Southern Biotech, Birmingham, AL, USA) végeztük, majd a reakciót TBM membrán peroxidáz szubsztráttal (Kriegaard & Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, Maryland, USA) hívtuk elő. Az előhívott

membránokat száradás után HP Scanjet G2410 szkennelvel (Hewlett-Packard) szkenneltük, majd az ImageJ programmal denzitometráltuk.

5. 4. 5. Dot blot

A Dot blot vizsgálatnál a 96 kamrát tartalmazó Minifold-Vakuum-Filtrationssystem SRC-96 (Schleicher&Schuell, Dassel, W. Germany) berendezés felső részébe a sejtekről leszívott 24 órás 0,3% FBS tartalmú, 200 µl térfogatú kondicionált tápfolyadékot pipettáztunk, majd a vákuum-pumpa segítségével (Merck Millipore Co.) a folyadékot a berendezés közepébe helyezett PVDF membránra blottoltuk. Minden mintánál három párhuzamos lyukat használtunk minden immunreakció esetében. 1x TBS-ben való mosást követően a membránt Ponceu-val festettük a blottolás hatékonyságának ellenőrzése végett. A 10 perces 3%-os H₂O₂ endogén peroxidáz blokkot követően TBST-ben háromszor 5 perces mostuk a membránokat, majd 5 w/v%-os TBS-ben oldott BSA-val blokkoltuk az aspecifikus fehérjék kötődését. Az elsődleges ellenanyaggal a membránt egy éjszakán át 4°C-on inkubáltuk, majd a mosási lépést követően a membránra az elsődleges antitestnek megfelelő HRP-konjugált másodlagos ellenanyagot helyeztük 1 órán keresztül szobahőmérsékleten. Az enzim szubsztrátjaként ECL-t használtunk, a membrán kemiluminescens jeleit Kodak Image Station 4000MM Digital Imaging System készülékkel dokumentáltuk és a műszerhez tartozó software segítségével denzitometráltuk.

5. 4. 6. ELISA

A mono- és kokultúra rendszerben növesztett sejtenyészetekről eltávolított kondicionált médiummintákat használtunk az ELISA vizsgálatokhoz. A kokultúras tenyészeteknél a mintavétel az inzert mindkét oldaláról történt. Minden esetben 100 µl sejtkultúra felülúszót használtunk az SDF-1 és TGF-β1 kvantitatív meghatározásához humán SDF-1 és TGF-β1 ELISA kittekkel (RayBiotech, Norcross, GA, USA és R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) a

gyártók ajánlása szerint. Az ELISA plateket Labsystem Multiskan MS 352 készülékkel 570 nm-en dokumentáltuk.

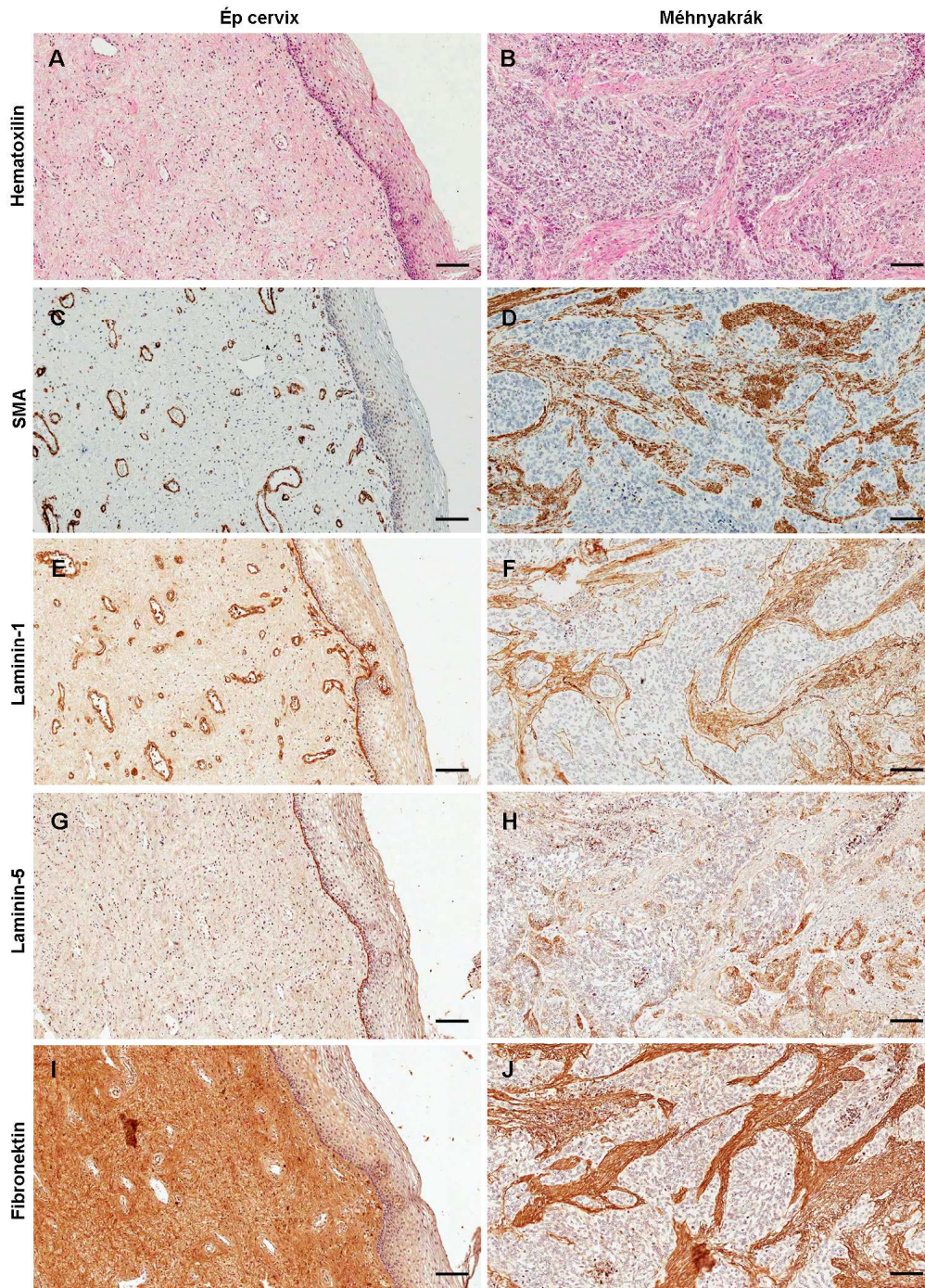
5. 5. Statisztikai analízis

Minden esetben három vagy négy, egymástól független biológiai párhuzamossal végeztük kísérleteinket. A relatív géneszpressziós eredményeket D'Agostino & Pearson omnibus normalizációs teszttel vizsgáltuk a Graphpad Prism 4.03 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) program segítségével. A mono- és kokultúrás csoportok közti szignifikáns változásokat az adatok eloszlásától függően nem parametrikus (Mann-Whitney) vagy Student-féle t-próbával vizsgáltuk. A kísérletek reprodukálhatóságát ellenőriztük, és csak a reprodukálható változásokat tekintettük $p < 0,05$ esetében szignifikánsnak. A géneszpressziós eredmények közti korrelációs vizsgálatot SPSS 15.0 Software (IMB Corporation, New-York, USA) programmal végeztük. Az SRB mérések eredményeit χ^2 -próbával értékeltük.

6. EREDMÉNYEK

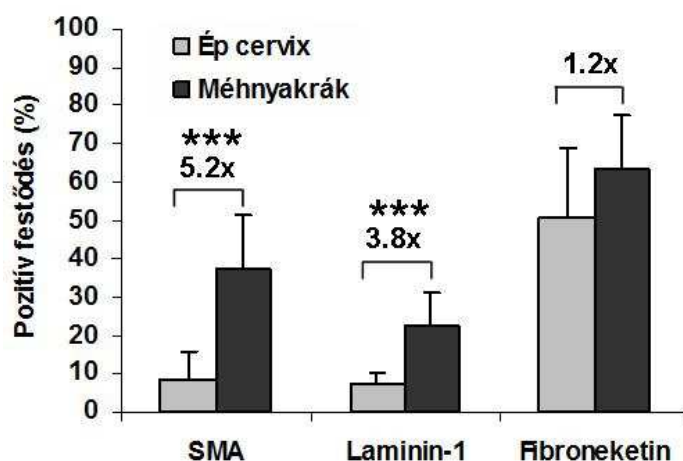
6. 1. Méhnyaki modellrendszer vizsgálata

6. 1. 1. Az extracelluláris mátrix komponensek változása méhnyakrákban



7. ábra. Mátixfehérjék szöveti lokalizációjának változása méhnyakrákban az ép szövethez képest. Mércse: 100 μ m.

A tumorsejtek hatására a strómában végbemenő változások vizsgálatához extracelluláris mátrixfehérjék immunhisztokémiai festéseit alkalmaztunk. Ép és tumoros szöveti blokkokból összeállított TMA-n vizsgáltuk az SMA, laminin-1, laminin-5 és fibronectin strómális intenzitásváltozásait. A hematoxin festéssel (7A. és 7B. ábrák) kiegészített immunhisztokémiák reprezentatív képeit a 7. ábra, a TMA statisztikai elemzésének eredményét a 8. ábra tartalmazza.



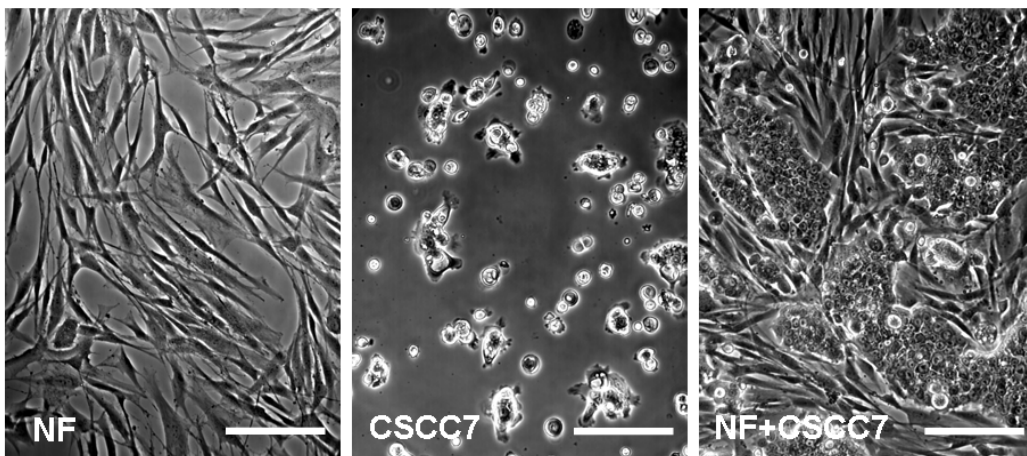
8. ábra. Az SMA, laminin-1 és fibronectin TMA immunreakciók statisztikai kiértékelése.

Az ép, hám alatti strómában az SMA csak a kötőszöveti erek falában mutatható ki (7C. ábra), a daganatos szövetben a daganatfészkek közé ékelődött stróma myofibroblasztjait festi (7D. ábra). A normál szövethez képest az immunreakció intenzitása 5,2x nő (Mann Whitney teszt: $p < 0,0001$) a méhnyakrákban (8. ábra). A laminin-1 ellenanyag az ép szövetben kirajzolja a hámsejtek bazális sejtrétege alatt vékony vonalként végighúzó bazális membránt, valamint az SMA-hoz hasonlóan festi az strómában található erek falát (7E. ábra). A daganatos szövetben a laminin-1 reakció körülrajzolja a daganatos fészkek határát és kitölti a strómát (7F. ábra). A reakció intenzitása 3,8x nő (Mann Whitney teszt: $p < 0,0001$) a daganatos szövet strómájában éphez képest (8. ábra). A laminin-5 a laminin-1-hez hasonlóan ép szövetben a bazális membránt festi (7G. ábra), de a daganat kialakulását követően csak a daganatfészkek és a stróma határán vonalszerűen, valamint a tumor széli daganatsejtjeinek citoplazmájában

figyelhető meg az immunreakció (7H. ábra). A kiterjedtebb strómális reakció hiánya miatt a többi festéshez hasonló kiértékelést nem alkalmaztuk a laminin-5 esetében. A fibronectin a többi fehérjével ellentétben homogéne oszlik el nagy mennyiségben az ép strómában (7I. ábra). A daganatos szövetben a reakció hasonlóan homogén a daganatfészkek körüli strómában is (7J. ábra), a reakció intenzitásnövekedése csupán 1,2x (Mann Whitney teszt: $p=0,0031$) normálhoz képest (8. ábra).

6. 1. 2. Morfológiai megfigyelések

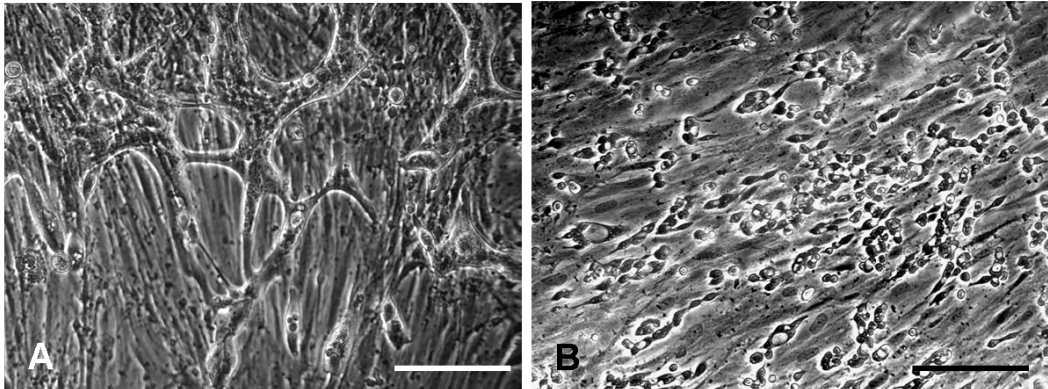
A szöveti metszeten látható mátrix átalakulás további vizsgálatához méhnyaki területről származó fibroblasztokból és tumorsejtekből álló modellrendszert hoztunk létre. Rendszerünkben a fibroblasztok, mint a kötőszövet fő sejtalkotói modellezik a strómát, a tumorsejtek pedig a daganatot. A köztük lévő kapcsolat feltérképezése, valamint a mátrix átalakulás vizsgálata céljából a sejteket monokultúrában, direkt és indirekt kokultúrában is tenyésztettük.



9. ábra. Mono és direkt kokultúrában tenyésztett méhnyaki fibroblasztok és tumorsejtek növekedése a kirakást követő 48. órában. Mércse: 100 μm .

A 9. ábrán az NF és CSCC7 sejtek láthatók mono és direkt kokultúrában 48 órával a kirakást követően. A fibroblasztok orsó alakú sejtek, melyek a tenyésztő edényre való kitapadáskor szétterülnek. A tenyészet növekedése alkalmával egyre vékonyabb és hosszúkásabb alakúvá válnak a hely fogyatkozása

miatt. A sejtek keresik egymás társaságát, leggyakrabban örvényt formáló alakzatban nőnek. A kis, kerek tumorsejtek a kitapadást követően csoportokba rendeződnek. Ha direkt kokultúrában tenyésztjük a két sejtípust, akkor a fibroblasztok a tumorsejt fészkek közé ékelődnek, és azok között határt képeznek. Jól látható, hogy az ép fibroblasztokkal való együttélés hatására a tumorsejtek jobban szaporodtak, mint a fibroblasztok nélkül (9. ábra).

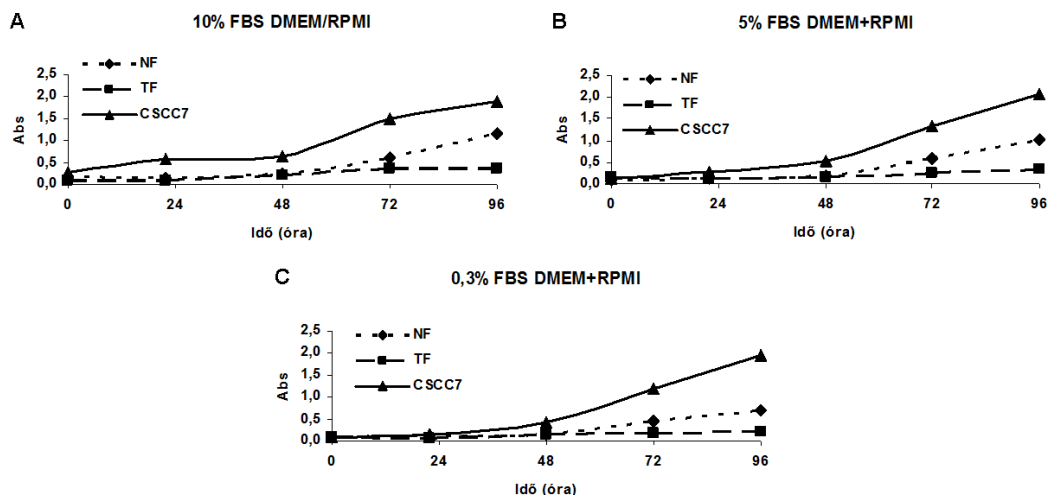


10. ábra. Tumorsejtek terjedése a fibroblasztok felszínén primer (A) és nem primer sejt kultúrában (B). Mércse: 100 μ m.

A szöveti explantátumokból nevelt primer tenyészetekben néhány esetben nem csak fibroblasztok, hanem tumorsejtek is kitapadtak és növekedésnek indultak. Minden esetben ez csak akkor valósult meg, ha a fibroblasztok már előbb növekedésnek indultak, így a tumorsejtek a felszínükön kapaszkodva voltak képesek megtapadni és terjedni. Tehát a tumorsejtek növekedéséhez szükséges a fibroblasztok jelenléte. Ebben az esetben a tumorsejtek nem csoportokban, hanem egyesével, nyúlványokat képezve terjedtek a fibroblaszt szőnyegen (10A. ábra). Ugyanezt a jelenséget tapasztaltuk a már nem primer állapotú modellrendszerünk esetében is. Ha a CSCC7 sejteket fibroblaszt szőnyegre növesztettük (a konfluens fibroblaszt tenyészet proliferációját mitomycin C-vel gátoltuk), akkor a tumorsejtek nem rendeződtek nagy sejtcsoporthoz, hanem egymástól szétválva helyezkedtek el a fibroblasztok rostjai mentén (10B. ábra).

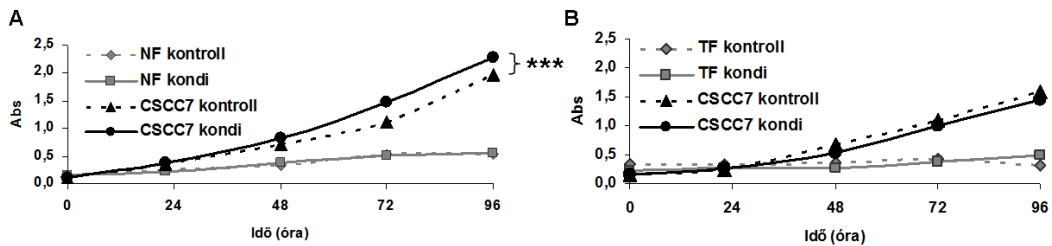
6. 1. 3. Proliferáció

A mono és kokultúrában nevelt sejtek tenyésztése során megfigyeltük, hogy a tumorsejtek gyorsabban proliferáltak, ha fibroblasztokkal együtt tenyésztettük őket, mintha nélkülük (9. ábra). Ezt a megfigyelésünket proliferációs vizsgálatokkal támasztottuk alá. Szulforodamin B (SRB) kolorimetriás módszerrel mértük az NF, TF és CSCC7 sejtek proliferációs aktivitását különféle kondíciók esetén.



11. ábra. Különböző összetételű tápfolyadékok hatása a méhnyaki modellrendszer sejteinek proliferációjára. **A:** saját tápfolyadékban 10% szérumszint mellett, **B:** kevert tápfolyadékban 5% szérumszint mellett, **C:** kevert tápfolyadékban 0,3% szérumszint mellett.

A 11. ábrán különböző kondíciójú tápfolyadékok (10%, 5% és 0,3% FBS tartalom) hatását vizsgáltuk monokultúrák sejtenyésztéseken. A CSCC7 tumorsejt a leggyorsabban, a TF fibroblaszt a leglassabban proliferált mindhárom kondíció esetében. A növekedési görbék alapján a különböző szérumszint és tápfolyadék összetétel csak kis mértékben befolyásolta a sejtek proliferációs aktivitását, mely értékek χ^2 próbával statisztikailag nem szignifikánsak (Student-féle t -próba: $p=0,22$). Tehát ezek a kondíciók alkalmasnak bizonyultak az indirekt és direkt kokultúrák kísérletek kivitelezéséhez.



12. ábra. Kondicionált tápfolyadékok hatása a méhnyaki modellrendszer sejteinek proliferációjára.

A 12. ábrán olyan növekedési görbék láthatók, ahol a fibroblasztokat a tumorsejt, a tumorsejtet a fibroblasztok kondicionált felülűszójával kezeltük. Ezáltal lehetővé vált, hogy a kokultúra hatását vizsgáljuk SRB módszerrel. Az NF fibroblasztok proliferációját nem befolyásolta a CSCC7 sejtek kondicionált tápfolyadéka, míg a CSCC7 sejtek szignifikánsan gyorsabban (Student-féle t -próba: $p < 0,0001$) proliferáltak az NF kondicionált felülűszójának hatására 96 órával a kitevést követően (12A. ábra). A TF vs. CSCC7 kísérlet esetében a kondicionált felülűszók szignifikáns mértékben nem befolyásolták a sejtek proliferációját (12B. ábra).

6. 1. 4. A kokultúra hatására bekövetkező expressziós változások

A fibroblasztok és tumorsejtek közti kölcsönhatást direkt és indirekt kokultúra rendszerekben vizsgáltuk. A direkt kokultúra esetében fizikai kontaktus van a sejtek között, az indirekt kokultúránál csak a tápfolyadék közlekedik a két sejt közé illesztett $0,45 \mu\text{m}$ pórusátmérőjű membránon keresztül. A méhnyaki modellrendszerben az NF és TF fibroblasztok a tenyésztőedény alján, a CSCC7 tumorsejtek a fibroblasztok fölé helyezett inzert membránjára tapadva nőttek.

6. 1. 4. 1. mRNS expressziós változások a méhnyaki modellrendszerben

Az RNS szintű vizsgálatokat a direkt kokultúrás mintákon nem végeztük el, mivel nem választható szét melyik sejt expressziója mérhető. Számos gén mRNS expressziós változását vizsgáltuk azonban monokultúrákban és indirekt

kokultúrákban. Az *ACTB* génre normalizált mRNS expressziós adatokat a függelék 4. táblázata foglalja össze. Az expressziós változások adatait a 4. táblázat tartalmazza. A nyilak a $\geq 1,5x$ expresszió változást jelentik a fibroblaszt monokultúrák és az indirekt kokultúrák csoportok között, a csillagok a szignifikáns eltéréseket jelölik (Mann Whitney teszt * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Ha a két fibroblaszt monokultúrák eredményeit hasonlítottuk össze, akkor a TF sejtekben a *FNI*, *ITGA3*, *MMP3* és *MMP14* szintje csökkent, míg az *ITGB1*, *ITGB3* és *THBS1* szignifikáns mértékben nőtt NF-hez képest.

A kokultúra hatására az NE/CSCC7 fibroblasztokban szignifikánsan nőtt az *ITGB3*, *MMP2*, *THBS1*, csökkent az *MMP1* mRNS expressziója kontrol NF-hez képest. A TF kontroll mintákhoz képest a TF/CSCC7 mintákban csökkent az *MMP1* és *TIMP1* gének expressziója. A tumorsejt kokultúrák mintákban a fibroblasztok hatására szignifikánsan nőtt az *ITGA3*, *ITGA6*, *ITGB1*, *MMP7* és *TIMP2* gének expressziója kontrollhoz képest.

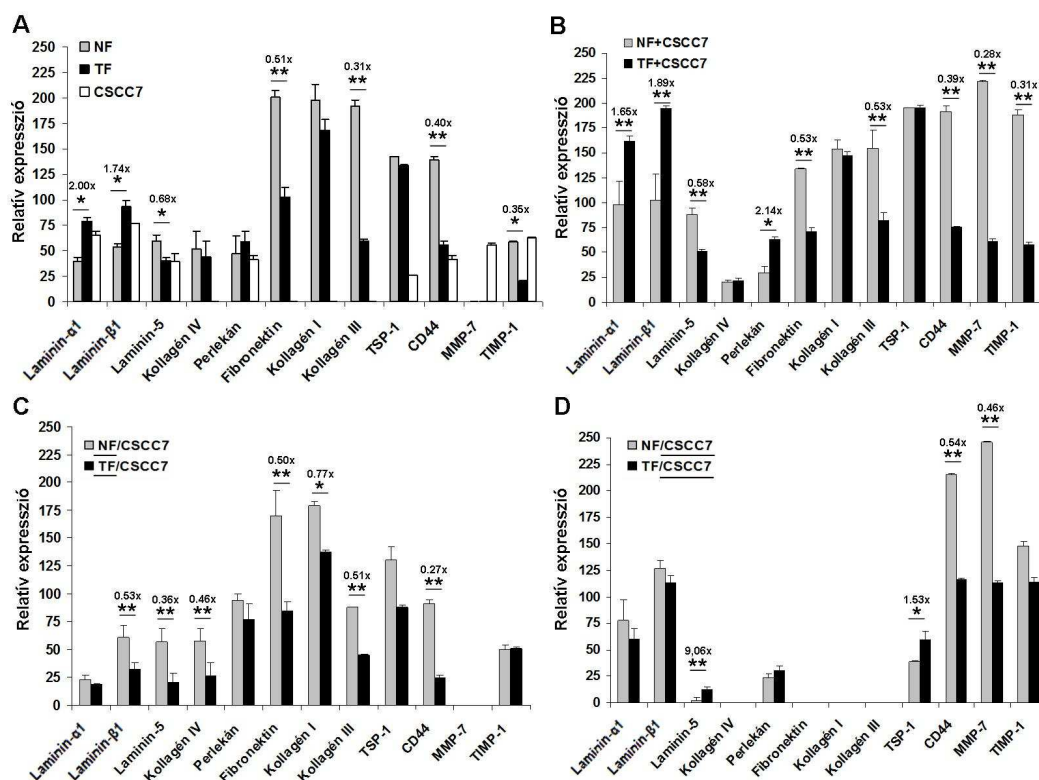
Ha a két fibroblaszt kokultúra eredményeit hasonlítjuk össze, akkor a gének expressziója a két kontroll fibroblaszt összevetésének eredményeivel mutat nagy hasonlóságot. A TF/CSCC7 mintákban szignifikánsan csökken az *FNI*, *ITGA3*, *MMP14* és *TIMP1*, míg szignifikánsan nő a *THBS1* szintje NE/CSCC7-hez képest. A tumorsejt kokultúrák összehasonlítása során csupán az *MMP7* szignifikáns expresszióbeli csökkenése jelentős.

4. táblázat. qRT-PCR mRNS expressziós változások monokultúrában és indirekt kokultúrában.

Gének	MONO	INDIREKT					
	Változás TF vs. NF	Változás <u>NF/CSCC7</u> vs. NF	Változás <u>TF/CSCC7</u> vs. TF	Változás <u>NF/CSCC7</u> vs. CSCC7	Változás <u>TF/CSCC7</u> vs. CSCC7	Változás <u>TF/CSCC7 vs.</u> <u>NF/CSCC7</u>	Változás <u>TF/CSCC7 vs.</u> <u>NF/CSCC7</u>
<i>FN1</i>	0.60 ↓*	1.26	1.07	-	-	0.51 ↓**	-
<i>ITGA3</i>	0.53 ↓	0.85	0.77	4.50 ↑* ³	6.37 ↑**	0.48 ↓**	1.42
<i>ITGA4</i>	1.22	0.78	0.75	-	-	1.17	-
<i>ITGA5</i>	0.81	1.23	1.02	-	-	0.67	-
<i>ITGA6</i>	-	-	-	1.86 ↑**	1.40 *	-	0.75
<i>ITGB1</i>	1.36 *	1.08	0.74	1.09	1.24 *	0.93	1.14
<i>ITGB3</i>	1.37 *	1.56 ↑*	1.05	1.30	0.94	0.92	0.73
<i>ITGB5</i>	1.11	1.32	1.07	1.41	1.43	0.90	1.01
<i>TGFB1</i>	0.82	1.05	0.93	1.00	0.89	0.73	0.88
<i>THBS1</i>	3.04 ↑**	1.91 ↑*	1.21	1.19	1.02	1.93 ↑**	0.86
<i>CD44</i>	1.00	0.88	0.69	1.15	0.97	0.79	0.84
<i>MMP1</i>	0.86	0.41 ↓**	0.39 ↓*	-	-	0.82	-
<i>MMP2</i>	0.90	1.35 *	1.00	-	-	0.67	-
<i>MMP3</i>	0.58 ↓	0.74	1.04	-	-	0.81	-
<i>MMP7</i>	-	-	-	9.10 ↑***	2.65 ↑	-	0.29 ↓**
<i>MMP14</i>	0.50 ↓**	0.66	0.80	-	-	0.62 ↓	-
<i>TIMP1</i>	0.98	1.15	0.58 ↓*	1.24	1.07	0.49 ↓**	0.86
<i>TIMP2</i>	1.13	1.10	1.10	1.70 ↑**	0.81	1.14	0.81

6. 1. 4. 2. Fehérje expressziós változások a méhnyaki modellrendszerben

Dot blottal vizsgáltuk sejtkultúra felülúszóból a mátrix átalakításában fontos szerepet játszó fehérjék mennyiségi változásait monokultúrában és mindkét kokultúra rendszerben. A 3 párhuzamossal végzett kísérletek ponceau S festésre normalizált jelintenzitás értékeit a 13. ábra foglalja össze, a csillagok a szignifikáns eltéréseket jelölik (Mann Whitney teszt: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$). A monokultúrában a direkt és indirekt kísérletek kontroll adatainak átlagából számoltuk a TF mintákban bekövetkező változást NF-hez képest.

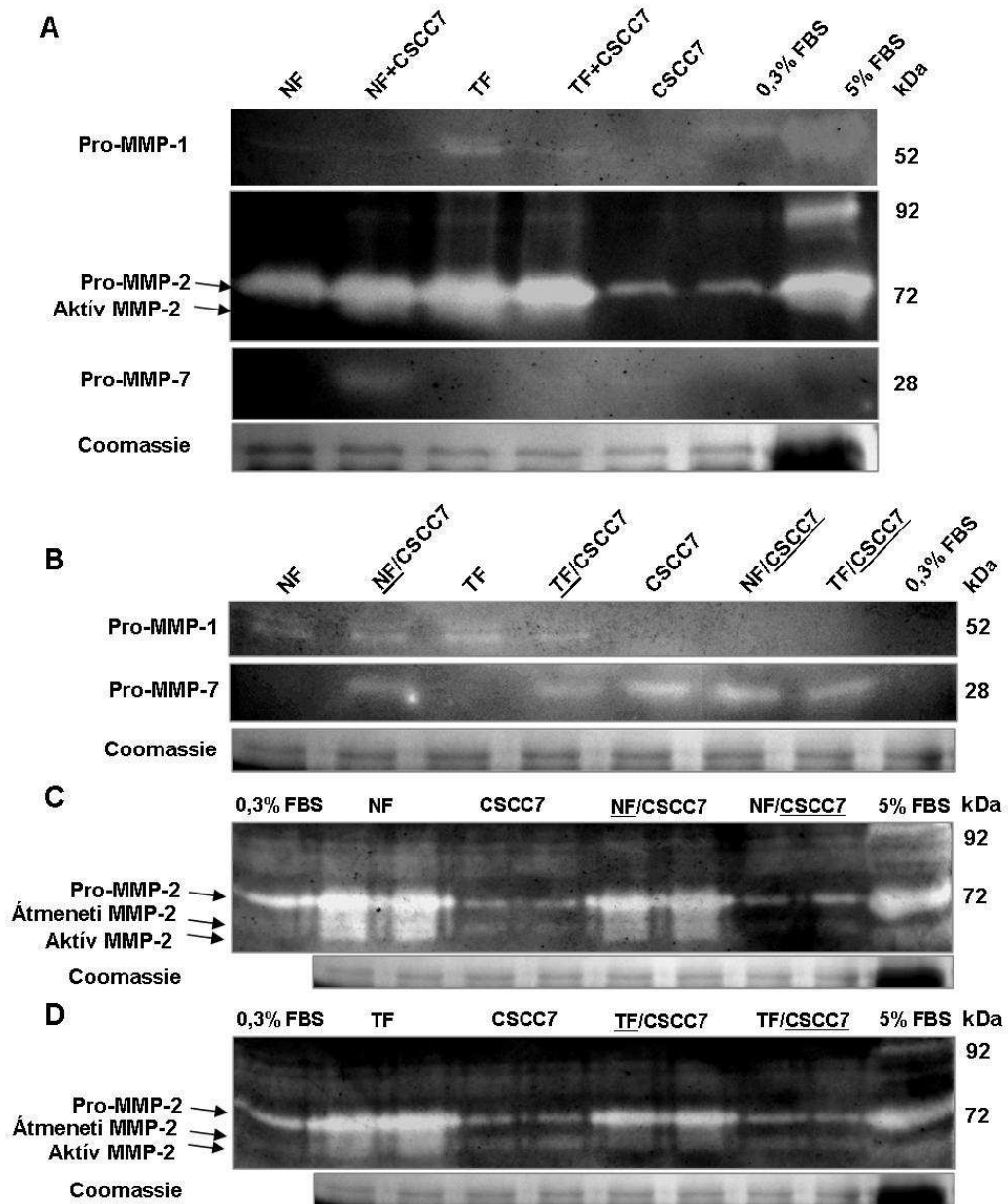


13. ábra. Ponceau S festésre normalizált dot blot fehérje expressziós változások sejtkultúra felülúszóból a méhnyaki modellrendszerben. A: TF, NF, CSCC7 monokultúrában; B: TF+CSCC7 vs. NF+CSCC7 direkt kokultúrában; C: TF/CSCC7 vs. NF/CSCC7 indirekt kokultúrában; D: TF/CSCC7 vs. NF/CSCC7 indirekt kokultúrában.

A TF sejtek sejtkultúra felülúszójában szignifikánsan több laminin- α 1 és - β 1, valamint szignifikánsan kevesebb laminin-5, fibronektin, kollagén III, CD44 és TIMP-1 szintet mértünk NF-hez képest (13A. ábra). A fibroblasztok és tumorsejtek fizikai kölcsönhatása erőteljes fehérjeexpressziós változásokat idéztek elő. Az NF és CSCC7 sejtek közt létrejövő fizikai kapcsolat jelentős mértékben fokozta a tumorsejtek MMP-7 termelését kontrollhoz képest. A TF+CSCC7 mintákban szignifikánsan nőtt a laminin- α 1, - β 1 és perlecan expresszió, míg szignifikás mértékben csökkent a laminin-5, fibronektin, kollagén III, CD44, MMP-7 és TIMP-1 szintje az NF+CSCC7 csoporthoz képest (13B. ábra). Indirekt kokultúrában a fibroblaszt oldalon a vizsgált fehérjék mindegyikének szintje csökkent a TF/CSCC7 mintákban NF/CSCC7-hez képest, a változás szignifikáns

mértékű volt a laminin- β 1, laminin-5, fibronectin, kollagén I, III, IV és CD44 fehérjék esetében (13C. ábra). A tumorsejt oldalon a laminin-5 és TSP-1 szintje szignifikánsan magasabb, míg a CD44 és MMP-7 expresszió alacsonyabb volt a TF/CSCC7 mintákban NF/CSCC7 -hez képest (13D. ábra). Az indirekt kokultúra nem idézett elő lényegi változást a tumorsejtek fehérjetermelésében (13A. és 13B. ábrák).

Kazein és zselatináz zymogrammal vizsgáltuk az MMP-1, MMP-2 és MMP-7 enzimaktivitását sejt kultúra felülúszóból direkt és indirekt kokultúrában (14. ábra). A pro-MMP-1-et csak a fibroblasztok termelik, mindkét kokultúra rendszerben a TF fibroblasztokban mértük a legmagasabb fehérjeszintet és a CSCC7 sejtek jelenléte csökkentette az aktivitást (14A. és 14B. ábrák). A zselatináz zymogramokon az MMP-2 aktív és inaktív formáját is egyaránt detektáltunk (14B. ábra), direkt kokultúrában a CSCC7 sejtek aktiválták az MMP-2-t (14A. ábra). Indirekt kokultúrában inkább csökkentette a tumorsejt jelenléte mind az aktív, mind az inaktív MMP-2 forma felülúszóban mért mennyiségét a fibroblaszt mintákban. A CSCC7 sejtek által termelt pro-MMP-7 direkt kokultúrában egyértelműen csak az NF+CSCC7 mintákból volt kimutatható (14A. ábra). Az indirekt kokultúrában látható, hogy a fehérje egyenesen oszlott el az inzert mindkét oldalán és a fibroblasztok jelenléte nem befolyásolta a CSCC7 sejtek pro-MMP-7 aktivitását (14B. ábra).

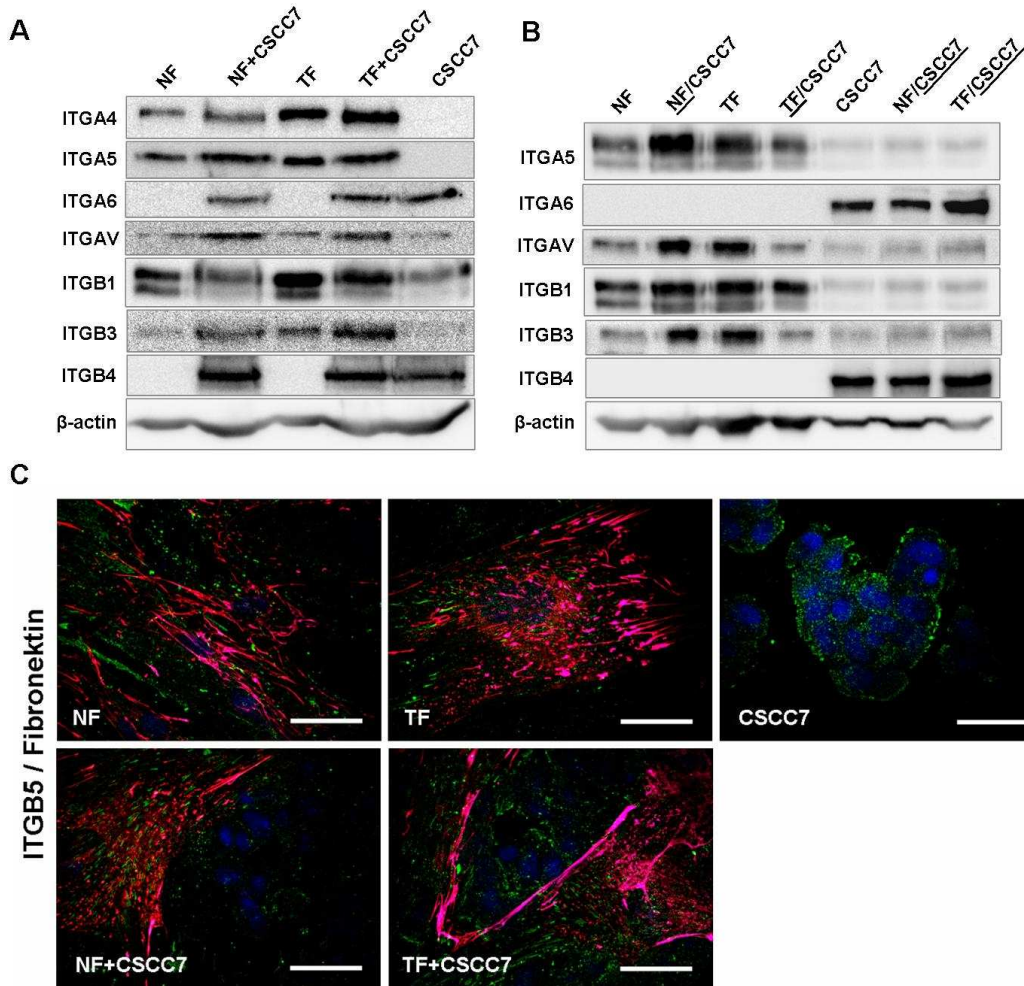


14. ábra. Kazeináz és zselatináz zymogramok direkt (A) és indirekt (B-D) kokultúrák sejtkultúra felülúszójából.

6. 1. 4. 3. Az extracelluláris mátrix kötő membránfehérjék és receptorok a méhnyaki modellrendszerben

A 15. ábra tartalmazza a direkt (15A. ábra) és indirekt (15B. ábra) kokultúra hatására bekövetkező integrin expressziós változásokat, a jeleket β -

actinra normalizáltuk. Az integrin $\beta 5$ ellenanyag csak immuncitokémiai módszerre volt vizsgálható (15C. ábra).

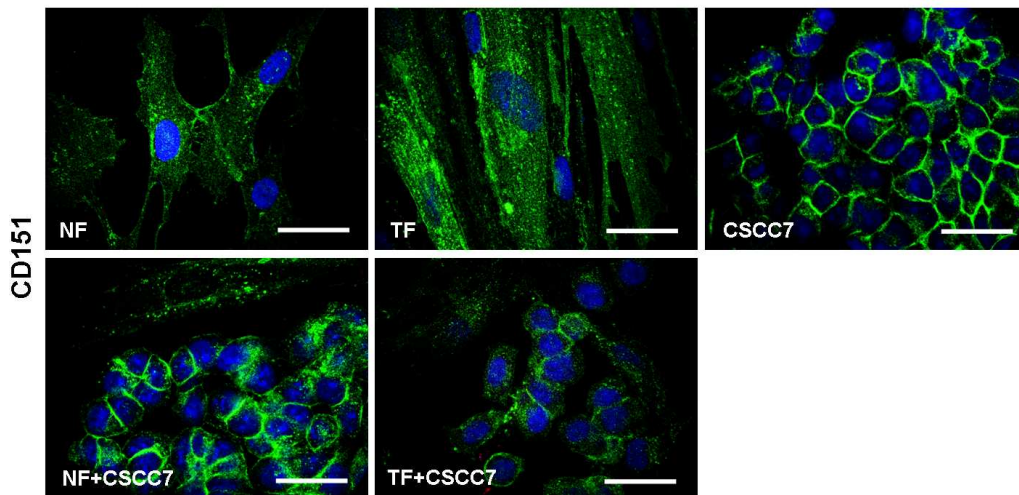


15. ábra. Integrinprofil direkt (A) és indirekt (B) kokultúrában. ITGB5 (zöld) és fibronektin (piros) fluorescens immuncitokémia (C). A magok kék DAPI festésűek, mércse 20 μ m.

Az integrin $\alpha 4$ -et és $\alpha 5$ -öt csak a fibroblasztok, az integrin $\alpha 6$ -ot és $\beta 4$ -et csak a tumorsejtek, az integrin αv -t, $\beta 1$ -et, $\beta 3$ -at és $\beta 5$ -öt mindkét sejttípus expresszálja (15. ábra). Az ép és tumoros fibroblasztokon, valamint a CSCC7 sejteken kimutatott integrinek alapján az alábbi integrinpárok jelenléte feltételezhető. A fibroblasztok a thrombospondint ($\alpha 3\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$ $\alpha v\beta 3$), fibronektint ($\alpha 5\beta 1$, $\alpha v\beta 1$, $\alpha v\beta 3$), tenascint ($\alpha v\beta 3$), vitronektint ($\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$) és VCAM-1-et

($\alpha 4\beta 1$) kötő integrinpárokkal rendelkezhetnek. A tumorsejtek fibronektint ($\alpha v\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 6$), thrombospondint ($\alpha v\beta 3$) és vitronektint ($\alpha v\beta 5$) kötő integrineket csak kis mértékben, lamininokat kötőket ($\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 6\beta 4$) nagy mennyiségben expresszálják. Ezen kívül mindkét sejt rendelkezik olyan integrinokkal ($\alpha v\beta 1$, $\alpha v\beta 6$), melyek képesek kötni a mátrixban szabad formában található LAP-TGF β komplexet.

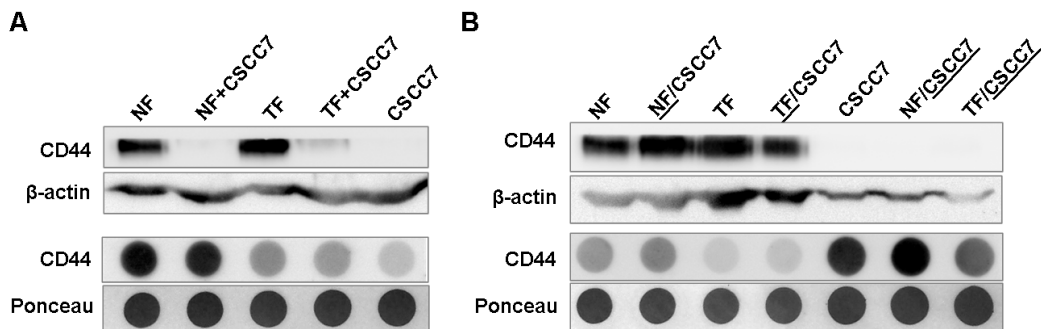
Az eddigi eredményekhez hasonlóan a fibroblasztok és tumorsejtek közti fizikai kontaktus nagyobb hatással volt a sejtek integrin expressziós tulajdonságaira, mint az indirekt kokultúra. A direkt kokultúra esetében szinte az összes integrin expressziója nőtt a kokultúra hatására, és a TF fibroblasztok jobban expresszálták a vizsgált integrineket, mint az NF sejtek (15A. ábra). Az indirekt kokultúra esetében azonban fibroblasztok integrin expressziós tulajdonságait kevésbé befolyásolta a tumorsejt jelenléte, és a TF sejtek integrin expressziója is csökkent NF-hez képest (15B. ábra). Azonban a TF sejtek jelenléte fokozta a CSCC7 sejtek fibronektin és laminin kötő integrinjeinek expresszióját (15B. ábra). Az ITGB5 a fibroblasztok és a tumorsejtek felszínén egyaránt detektálható volt (15C. ábra).



16. ábra. CD151 (zöld) immuncitokémia mono- és direkt kokultúrában. A magok kék DAPI festésűek, mérce 20 μ m.

A pro-MMP-7 kötő és integrin stabilizáló CD151-et főként a CSCC7 sejtek, de a fibroblasztok is expresszálják a felszínükön. A CSCC7 tumor fészkekben a szorosan kapcsolódó sejtek között erős az immunreakció, mely a TF fibroblasztok hatására direkt kokultúrában az egymástól eltávolodó sejtekben csökken (16. ábra).

A membránfehérjék közül az integrineken kívül vizsgáltuk CD44 standard formát is, mely extracelluláris és transzmembrán egységekből áll. Az ektodomén proteolitikus hasítása következtében létrejön a szolubilis CD44 forma, és a membránban maradt intracelluláris fragment [98]. A sejtfelszíni fehérjét Western blottal, a lehasadt formát dot blottal mutattuk ki (17. ábra).



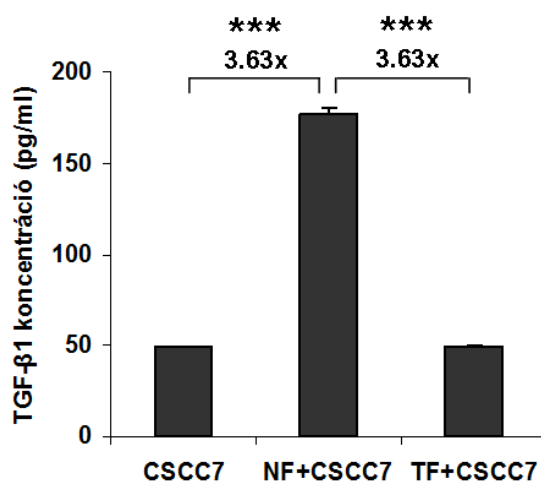
17. ábra. CD44 Western blot sejtlizátumból és dot blot sejtkultúra felülúszóból direkt (A) és indirekt (B) kokultúrában.

A direkt (17A. ábra) és indirekt (17B. ábra) kokultúra eredményeket együttesen elemezve megállapítható, hogy mind a fibroblasztok, mind a tumorsejtek termelnek olyan proteázokat, melyek hasítani képesek a CD44 fehérjét, mivel a felülúszóban mindegyik mintából kimutatható a CD44 szolubilis fragment. A Western blot eredmények arra utalnak, hogy a tumorsejtek által termelt proteázok (pl: MMP-7) más helyen hasítják a CD44 fehérjét, mint a fibroblasztok által termelt enzimek (pl: MMP-1). Míg az NF/CSCC7 és TF/CSCC7 mintákban a CSCC7 sejtek által termelt proteázok hatása nem érvényesül, addig az NF+CSCC7 és TF+CSCC7 mintákban a tumorsejtek által termelt proteázok hasítják a CD44-et. Feltételezzük, hogy a tumorsejt mintákban

az enzimhasítás következtében olyan kisméretű intracelluláris darab jön létre, melyet az ellenanyag Western blottal már nem mutat ki (17. számú kép).

6. 1. 4. 4. Szabályozó mechanizmusok a méhnyaki modellrendszerben

A mátrix fehérjék termelődését és mennyiségét több komponens befolyásolhatja. Ezek közül a fibroblasztok myofibroblasztá alakulásában fontos SDF-1 és TGF- β 1 szabályozó szerepét vizsgáltuk. Teljes sejtlizátumból mRNS szinten és sejtkultúra felülúszóból ELISA-val sem tudtunk kimutatni az SDF-1-et egyik kísérleti rendszerünkben sem.

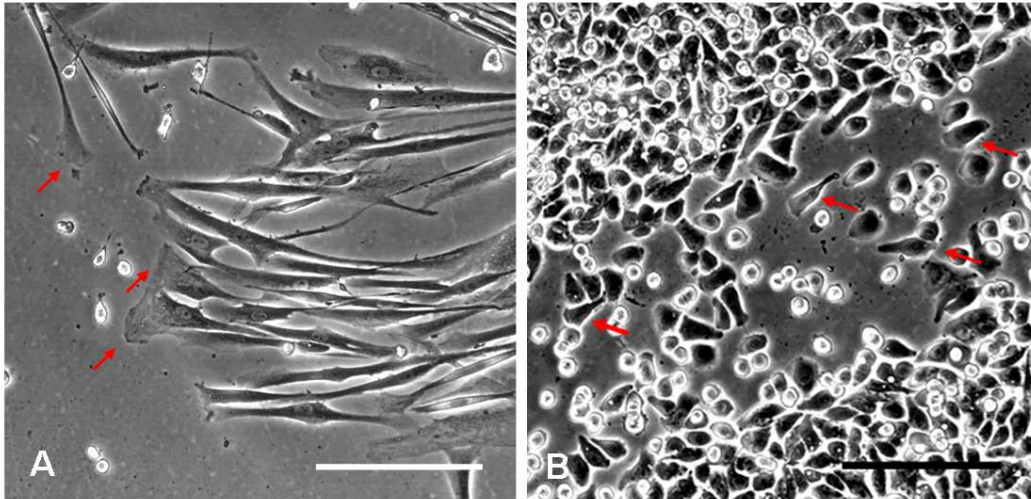


18. ábra. ELISA vizsgálattal sejtkultúra felülúszóból kimutatott aktív TGF- β 1 koncentrációja direkt kokultúrában. *** $p < 0.0001$.

Az mRNS szintű eredmények azt mutatták, hogy mind a fibroblasztok, mind a tumorsejtek expresszálják a TGF- β 1-et, de a CSCC7 sejtek fokozottabb mértékben, és a különböző tenyésztési feltételek nem befolyásolták a gén expresszióját (4. táblázat, függelék 4. táblázat). A TGF- β 1 ELISA vizsgálat a felülúszóban található aktív TGF- β 1-et képes kimutatni. A CSCC7 sejtek felülúszója tartalmazott immunreaktív TGF- β 1-et (mono-, direkt és indirekt kokultúrás mintákban is ~50 pg/ml), melynek mennyisége csak az NF+CSCC7 direkt kokultúrás mintában változott meg. Az NF sejtek fizikai közelsége 3,63x

magasabb (Mann Whitney teszt: $p < 0,0001$) expressziót eredményezett a CSCC7 és TF+CSCC7 mintákhoz képest (19. ábra).

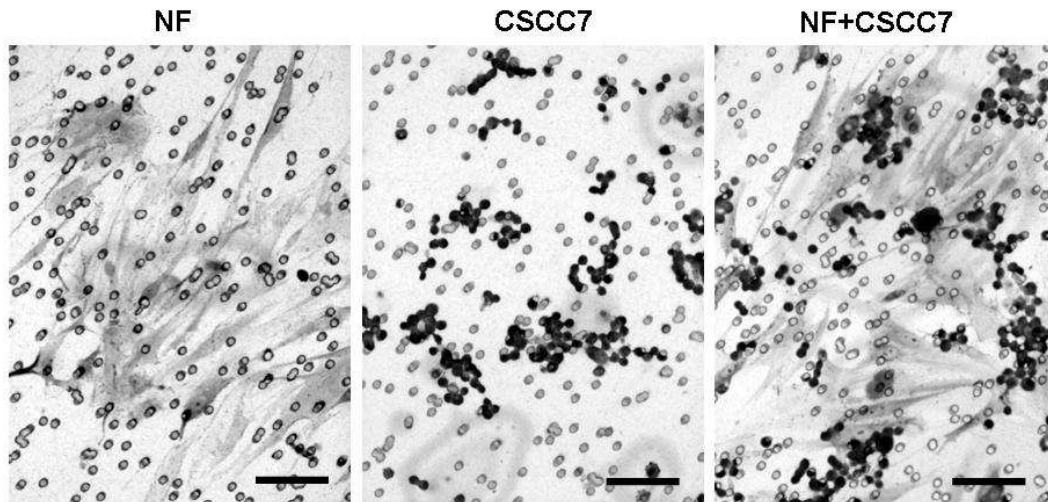
6. 1. 5. Migrációs vizsgálatok a méhnyaki modellrendszerben



19. ábra. Méhnyaki modellrendszer sejtjeinek migráló fenotípusa NF (A) és CSCC7 (B) sejtek esetében. A jellegzetes migráló sejteket piros nyíllal jelöltük. Mércé: 100 μm .

A méhnyaki modellrendszerben Boyden-kamrában való migráltatással vizsgáltuk különböző kemoattraktánsok migrációra kifejtett hatását. A konfluens tenyészetek mitomycin C-vel történő kezelésével gátoltuk a proliferációt, így hatékonyabban tudtuk vizsgálni a migráló sejteket az említett módszerekkel.

Kezdetben különböző szérumkoncentrációjú saját tápfolyadékot, majd az NF sejtek esetében a CSCC7 sejtek, a CSCC7 sejtek esetében az NF tenyészetek kondicionált felülúszóját használtuk kemoattraktánsként 24 órán át. A kondicionált tápfolyadék egyik sejt esetében sem váltott ki migrációt. Mivel alapvetően a tenyészetekben mindig láthatóak migráló sejtek, így valószínűleg a tápfolyadékban található kemoattraktánsok nem álltak rendelkezésre elég nagy koncentrációban az ellentétes sejttenyészetek felülúszójában. Korábbi fehérje vizsgálatainkból kiindulva a továbbiakban a két sejtípus által termelt fehérjék közül használtunk kemoattraktánsként koncentrált mennyiségben.



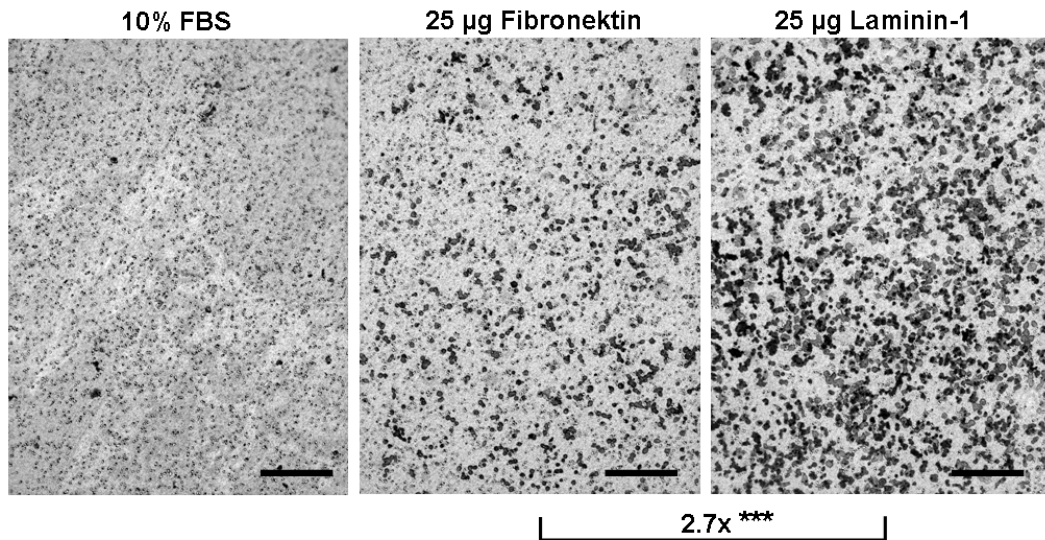
20. ábra. Az NF és CSCC7 sejtek migrációjának vizsgálata Boyden-kamrával monokultúrában és direkt kokultúrában 24 óra után. Mércé: 50 μm .

Extracelluláris mátrix fehérje, más néven mátrigél mind a normál fibroblaszt, mind a tumorsejt esetében a 25 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációban bizonyult a megfelelőnek, ez esetben mindkét sejtípus átvándorolt a 8 μm átmérőjű lyukakkal rendelkező membrán egyik oldaláról a másikra. A CSCC7 sejtek kis csoportokba rendeződve migráltak, míg az NF sejtek inkább egyesével. Ha a két sejtípust keverve töltöttük a kamra felső részébe, akkor a tumorcsomók a fibroblasztok közelében csoportosultak, ahogy azt a direkt kokultúrás tenyészetek esetében láttuk (20. ábra).

Az integrin receptorok vizsgálata során megbizonyosodtunk afelől, hogy a fibroblasztok fibronectin és egyéb extracelluláris mátrix fehérje receptorokkal rendelkeznek, míg a tumorsejtek leginkább laminin receptorokkal vannak felvértezve, de kis mértékben fibronectin receptor expresszió is kimutatható volt. A fibroblasztok termelnek fibronectint és lamininokat is, míg a tumorsejtekre főként a laminin-1 szintézis jellemző. A migrációs vizsgálatok főként a CSCC7 sejtek esetében lényegesek, így a továbbiakban ezekre a kísérletekre szorítkoztunk.

A 10% szérumtartalmú tápfolyadék mellett azonos koncentrációjú (25 $\mu\text{g/ml}$) fibronectin és laminin-1 fehérjét alkalmaztunk kemoattraktánsként a

CSCC7 sejtek migrációs vizsgálatánál. A 21. ábra jól szemlélteti, hogy a tumorsejtek laminin-1-re 2,7x (Mann Whitney teszt: $p < 0,0001$) jobban migráltak, mint fibronectinre. Ez az eredmény megerősíti az eddigi eredményeinket, miszerint a laminin-1 fokozott jelenléte kulcsszerepet játszik a tumorsejtek migrációjában.



21. ábra. CSCC7 sejtek motilitásának vizsgálata 24 órás Boyden-kamrában történő migráltatással 10% szérum, 25 µg fibronectin, és 25 µg laminin-1 kemoattraktánsok használata mellett. Mércé: 200 µm.

6. 2. Fejnyaki modellrendszer vizsgálata

6. 2. 1. A kokultúrában tenyésztés hatására bekövetkező expressziós változások

6. 2. 1. 1. mRNS expressziós változások a fejnyaki modellrendszerben

A méhnyakrák modellrendszer eredményei és az irodalmi adatok alapján a 7. táblázatban felsorolt extracelluláris mátrix komponensek mRNS expressziós változásait vizsgáltuk indirekt kokultúrában monokultúrához képest a fejnyaki modellrendszerben is.

7. táblázat qRT-PCR mRNS expressziós változások monokultúrában és indirekt kokultúrában. Az expressziós értékek mindegyike x100.

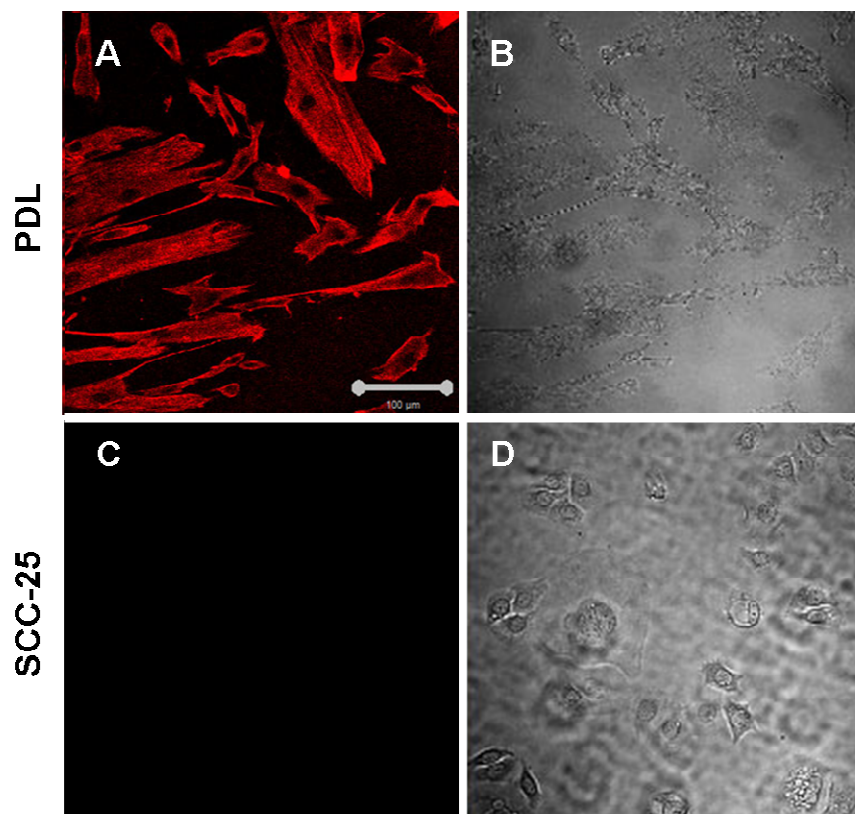
Gén	Norm. exp. PDL	Norm. exp. PDL/SCC-25	Norm. exp. SCC-25	Norm. exp. PDL/SCC-25	Változás a PDL/SCC-25 vs. PDL	Változás az PDL/SCC-25 vs. SCC-25
<i>FN1</i>	29,06±7,99	37,11±11,66	1,12±0,38	6,59±2,32	1,28	5,88 ↑
<i>ITGA3</i>	0,52±0,17	0,22±0,09	0,85±0,24	1,20±0,29	0,43 ↓	1,41
<i>ITGA4</i>	0,17±0,04	0,24±0,04	-	-	1,41	-
<i>ITGA5</i>	1,19±0,24	3,48±1,19	0,87±0,13	1,75±0,30	2,92 ↑*	2,01 ↑*
<i>ITGA6</i>	-	-	1,77±0,21	1,72±0,22	-	0,97
<i>ITGAV</i>	0,74±0,20	1,61±0,08	0,92±0,03	0,53±0,03	2,18 ↑***	0,57 ↓***
<i>ITGB1</i>	18,64±4,06	16,80±2,11	8,54±1,30	8,93±1,37	0,90	1,05
<i>ITGB3</i>	0,25±0,07	0,60±0,20	0,52±0,14	0,68±0,11	2,40 ↑*	1,30
<i>ITGB5</i>	0,38±0,05	0,47±0,09	0,13±0,01	0,14±0,01	1,22	1,09
<i>ITGB6</i>	-	-	0,57±0,08	0,40±0,05	-	0,71
<i>TGFB1</i>	2,42±0,28	5,89±1,39	1,81±0,14	2,88±0,26	2,44 ↑**	1,59 ↑**
<i>THBS1</i>	40,45±5,60	76,96±10,07	3,88±0,55	3,60±0,71	1,90 ↑**	0,93
<i>CD44</i>	-	-	19,18±7,344	20,77±4,42	-	1,08
<i>MMP1</i>	0,05±0,02	0,20±0,05	0,02±0,00	0,26±0,07	4,01 ↑*	13,82 ↑***
<i>MMP2</i>	12,24±1,40	27,83±5,56	0,39±0,02	0,68±0,14	2,27 ↑**	1,74 ↑
<i>MMP3</i>	0,26±0,14	0,93±0,25	-	-	3,60 ↑*	-
<i>MMP9</i>	-	-	0,16±0,04	0,22±0,08	-	1,35 ***
<i>MMP14</i>	-	-	0,01±0,00	0,01±0,00	-	0,93
<i>TIMP1</i>	13,32±1,49	37,43±6,39	0,09±0,02	0,24±0,03	2,81 ↑**	2,56 ↑***
<i>TIMP2</i>	2,12±0,36	1,73±0,25	0,09±0,01	0,17±0,03	0,82	1,85 ↑*
<i>TIMP3</i>	16,34±0,93	69,60±11,63	1,38±0,04	3,84±0,29	4,26 ↑***	2,78 ↑***

Az *ITGA4*-et és az *MMP3*-at csak a fibroblasztok, az *ITGA6*-ot, *ITGB6*-ot, *CD44*-et, *MMP9*-et és *MMP14*-et csak a tumorsejtek expresszálták, míg a többi gén esetében mindkét sejt mérhető mRNS intenzitást mutatott. Azonban a *FNI*, *THBS1*, *MMP2*, *TIMP1* és *TIMP3* esetében egyértelműen a fibroblaszt mintákban mért expresszó a meghatározó. A PDL fibroblaszt mintákban a kokultúrá

tenyésztés hatására szignifikánsan nőtt az *ITGA5*, *ITGAV*, *ITGB3*, *TGFBI*, *THBS1*, *MMP1*, *MMP2*, *MMP3*, *TIMP1* és *TIMP3* gének expressziója, ugyanakkor az *ITGA3* szintje jelentős mértékben lecsökkent. A tumorsejt oldalon nagy mértékben nőtt a *FNI*, *ITGA5*, *TGFBI*, *MMP1*, *MMP2*, *MMP9*, *TIMP1*, *TIMP2* és *TIMP3* mRNS szintje és szignifikáns mértékben csökkent az *ITGAV* expresszió (7. táblázat).

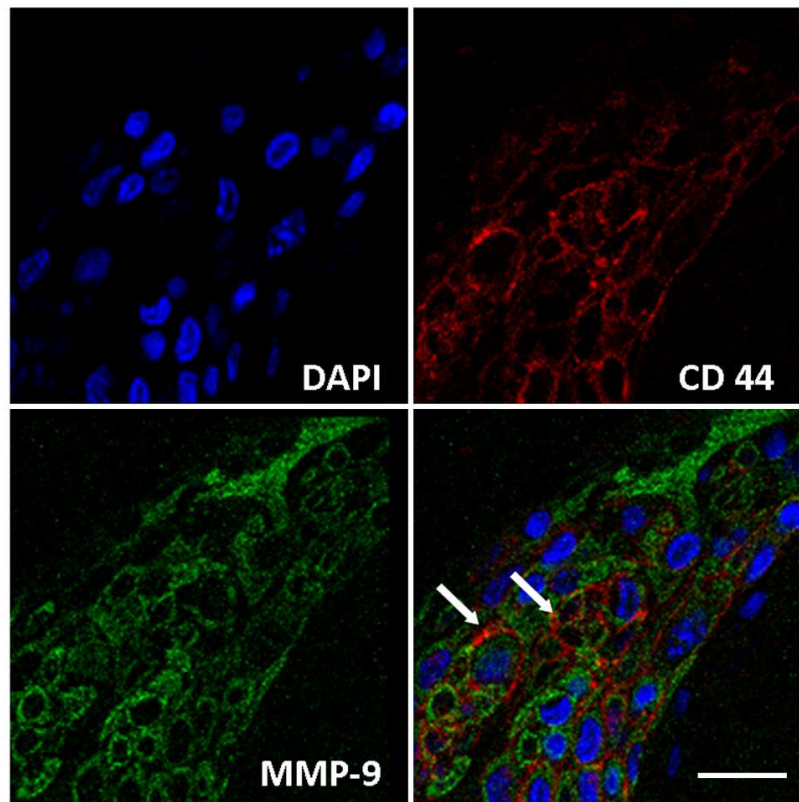
6. 2. 1. 2. Fehérje expressziós változások a fejnnyaki modellrendszerben

Az mRNS expressziós eredményekkel ellentétben fehérje szinten már csak a fibroblasztokban tudunk fibronectin immunreakciót kimutatni (22A. és 22B. ábrák), a celluláris fibronectin az SCC-25 sejtekben nem expresszálódott (22C. és 22D. ábrák).



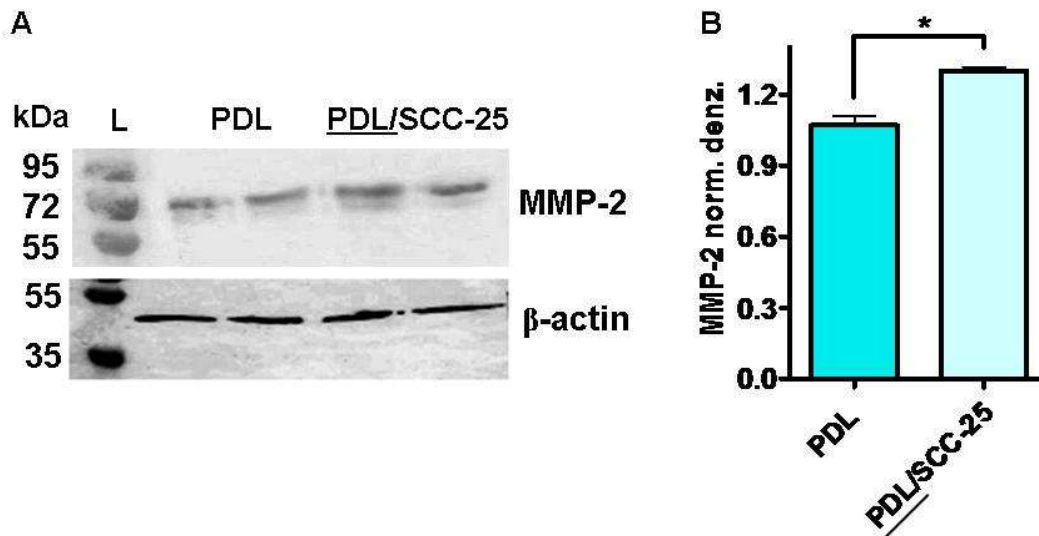
22. ábra. Fibronectin immuncitokémia a PDL (A) és SCC-25 (C) sejteken. A B és D ábrán a sejtek elhelyezkedése látható a fáziskontraszt felvételeken. Mércse: 100µm.

Paraffinba ágyazott szöveti metszetek fluorescens immunhisztokémiai festésével vizsgáltuk a CD44 és MMP-9 fehérjék szöveti lokalizációját (23. ábra). Mindkét fehérje az RNS eredményekkel összhangban csak a daganatsejteken expresszáldott. A daganatsejtek felszínén expresszáldó CD44, és a felszínen valamint a citoplazmában is kimutatható MMP-9 reakciók kolokalizációt mutatnak (23. ábra nyilak).



23. ábra. CD44 (piros) és MMP-9 (zöld) fluorescens immunhisztokémia fejnyaki daganatszöveten. Kék színű magfestés DAPI-val. A nyilak a vizsgált fehérjék kolokalizációját mutatják. Mércé: 100 μ m.

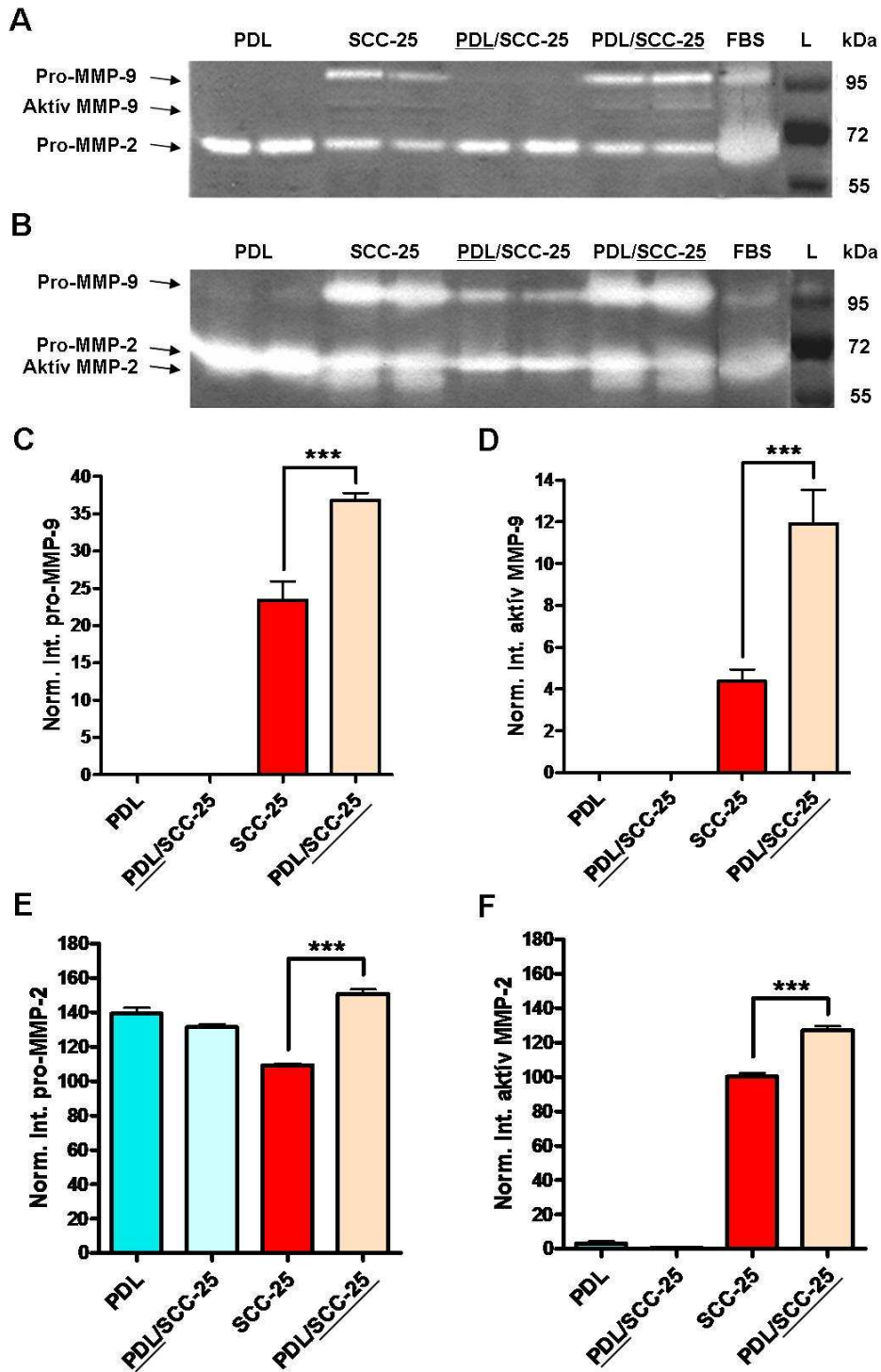
A fibroblasztok sejtlizátumából kimutatott MMP-2 fehérjeszint igazolta az mRNS eredményeket (24A. ábra). A β -actinra normalizált MMP-2 expresszió szignifikáns növekedést mutatott (Mann Whitney teszt: $p < 0,05$) kokultúrában a monokultúrához képest (24B. ábra).



24. ábra. MMP-2 és β -actin Westen blot mono- és kokultúrában tenyésztett fibroblaszt mintákon (A). A B ábra a β -actinra normalizált denzitometriás eredményét ábrázolja.

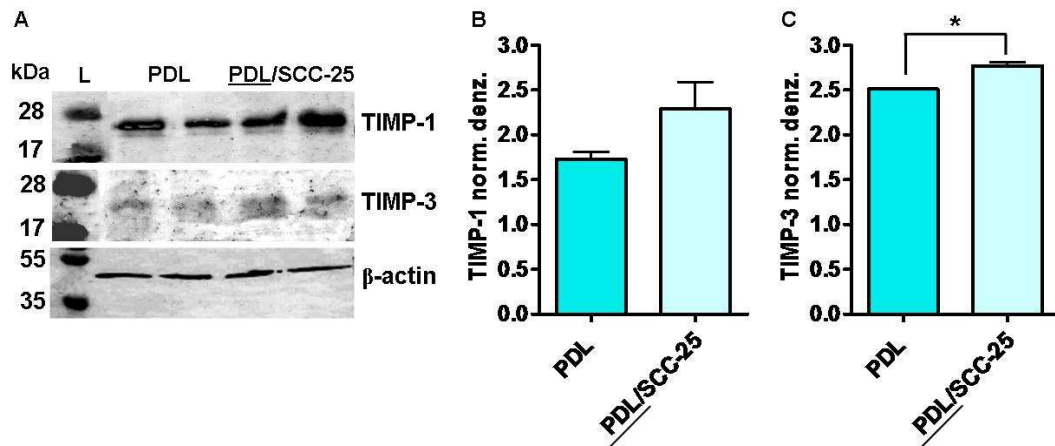
Mindkét sejttípus sejtlizátumából (25A ábra) és sejtkultúra felülúszójából (25B. ábra) zselatináz teszttel vizsgáltuk az MMP-2 és MMP-9 fehérjék aktivitását.

A PDL fibroblaszt sejtlizátumából (25A. ábra) és sejtkultúra felülúszójából (25B. ábra) a mono- és kokultúras tenyésztés esetében is csak az MMP-2 inaktív formája volt kimutatható, mennyisége nem változott a tumorsejt jelenlétében. Az SCC-25 tumorsejtek sejtlizátumában három csík különíthető el, az inaktív és aktív MMP-9 formák, valamint az MMP-2 előalakja (25A. ábra). Kokultúrában a pro- (25C. ábra) és aktív (25D. ábra) MMP-9 intenzitása is szignifikáns mértékben nőtt a monokultúrában észlelthez képest (Mann Whitney teszt: $p < 0,001$), míg az inaktív MMP-2 csíkok hasonló intenzitást mutattak. A tumorsejtek felülúszójából a pro-MMP-9, az MMP-2 inaktív és aktív formái is kimutathatók (25B. ábra). Mindkét MMP-2 forma mennyisége szignifikánsan nőtt (Mann Whitney teszt: $p < 0,001$) a fibroblasztokkal való együtt tenyésztés hatására (25E. és 25F. ábrák).



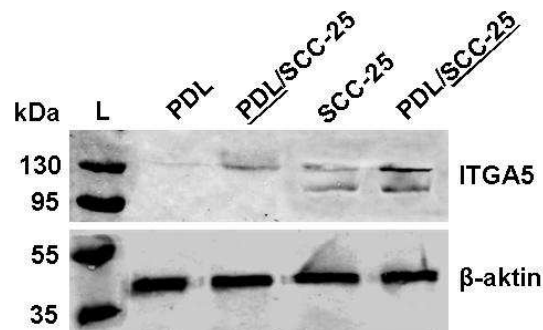
25. ábra. A PDL és SCC-25 sejtek zselatináz aktivitása sejtlyázumból (A) és sejt kultúra felülúszóból (B). A zselatináz aktivitás denzitometriás értékei a C-F grafikonokon láthatóak. A tumorsejtek lizátumában az inaktív (C) és aktív (D) MMP-9 formák is megjelennek, a felülúszóban az MMP-2 inaktív (E) és aktív (F) formája látható.

Az eredményeket összegezve elmondható, hogy az MMP-9 tumorsejt specifikus funkcióval rendelkezik, mivel aktív formája csak az SCC-25 sejtekben fordul elő. Az MMP-2 inaktív formáját mindkét sejt termeli, de az aktív forma csak a tumorsejtek által termelt felülúszóban jelent meg. A monokultúrához képest a kokultúrában mind az MMP-9, mind az MMP-2 aktív formájának mennyisége nőtt az SCC-25 sejtekben, vagy azok környezetében.



26. ábra. TIMP-1, TIMP-3 és β -actin Western blot mono- és kokultúrában tenyésztett fibroblasztokon (A). A B ábra a TIMP-1, a C ábra a TIMP-3 β -actinra normalizált denzitometriás eredményét ábrázolja.

Az MMP-k természetes gátlójaként ismert négytagú TIMP család TIMP-1 és -3 tagját vizsgáltuk tovább a fibroblaszt mintákban az mRNS eredmények alapján (26A. ábra). Mind a két fehérje expressziója nőtt az SCC-25 sejtekkel való együtt tenyésztés hatására (26B. és 26C. ábrák), a TIMP-3 szignifikáns mértékben (Mann Whitney teszt: $p < 0,05$).

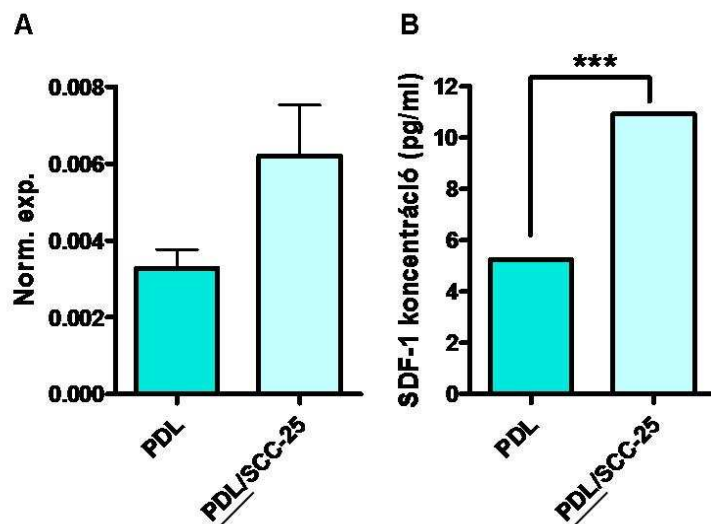


27. ábra. ITGA5 Western blot a fejnyci modellrendszerben.

A fejnnyaki modellrendszer esetében az integrinek közül az integrin $\alpha 5$ -öt vizsgáltuk Western blottal (27. ábra). A mRNS eseményekhez hasonlóan mindkét sejtben 1,5x nőtt a fehérje mennyisége kokultúrában monokultúrához képest.

6. 2. 2. Szabályozó mechanizmusok a fejnnyaki modellrendszerben

A mátrix átalakulást szabályozó SDF-1 és TGF- $\beta 1$ hatásán túl munkacsoportunk korábbi eredményei alapján [69] vizsgáltuk az IL-1 β szabályozó szerepét is.



28. ábra. SDF-1 mRNS (A) és fehérje (B) expresszió a PDL fibroblaszt mintákban.

Az *SDF1* gén mRNS expressziója ahogy vártuk csak a PDL mintákban volt detektálható real-time PCR-el. Szintje nőtt a tumorsejt hatására, de a változás nem szignifikáns (28A. ábra). Sejtkultúra felülúszóból ELISA-val vizsgáltuk az SDF-1 szekretált fehérje mennyiségi változásait. Míg monokultúrában 5,233 pg/ml koncentrációt mértünk, addig az indirekt kokultúrában tenyésztés hatására az SDF-1 szint szignifikáns mértékben (Kruskal-Wallis teszt: $p < 0,0001$) 2,1x-re, azaz 10,94 pg/ml-re nőtt (28B. ábra).

A TGF- $\beta 1$ -et, ahogy már említettük mRNS szinten mind a két sejt típus közel azonos mértékben expresszálta, és a kokultúrákban szignifikánsan nőtt az expresszió a monokultúrákban mért szintekhez képest (8. táblázat).

ELISA-val vizsgáltuk a felülúszóban található aktív fehérje mennyiségét. Az TGF- β 1 fehérje expresszió a PDL és SCC-25 mintákban hasonlóan alakult (8,5-37,8 pg/ml). Állandó TGF- β 1 szint volt mérhető a mintákban, a kokultúrában való tenyésztés nem eredményezett szignifikáns változást egyik sejt esetében sem. Az aktív fehérje állandó jelenléte viszont a jelátvitel további tagjainak vizsgálatára ösztönzött minket, így real-time PCR-el vizsgáltuk a *TGFBR2*, *LTBP1* és *TIEG* gének mRNS expressziós szintjeit (8. táblázat).

8. táblázat. A TGF- β 1 útvonal szabályozó génjeinek expressziós változásai a fejnyaki modellrendszerben. Az expressziós értékek (Δ Ct) mindegyike x100.

Gén	Norm. exp. PDL	Norm. exp. PDL/SCC-25	Változás PDL/SCC-25 vs. PDL	Norm. exp. SCC-25	Norm. exp. PDL/SCC-25	Változás PDL/SCC-25 vs. SCC-25
<i>TGFBR2</i>	0,28±0,04	0,46±0,08	1,67 ↑*	0,06±0,01	0,05±0,00	0,85
<i>LTBP1</i>	5,17±0,65	5,98±0,69	1,16	0,20±0,03	0,67±0,10	3,35 ↑***
<i>TIEG</i>	0,51±0,10	1,40±0,32	2,76 ↑*	1,50±0,14	1,07±0,08	0,71

A TGF- β 1 receptorai közül a *TGFBR2* főképp a fibroblasztokban expresszáldott, szintje szignifikánsan nőtt a CSCC7 sejtek hatására (8. táblázat). Az aktív TGF- β 1 kialakulásában fontos szerepet játszó *LTBP1* expressziója szintén a PDL mintákban volt magas, szignifikáns expresszióbeli változás viszont a tumorsejtek esetében volt tapasztalható. A kokultúras mintában nőtt az *LTBP1* szintje a kontrollhoz viszonyítva (8. táblázat). A *TIEG* gén a TGF- β 1 hatékonyságának és aktivitásának markeréül szolgál. Mindkét sejt expresszáta, a PDL mintákban nőtt a gén expressziója a tumorsejt jelenlétében (8. táblázat).

A TGF- β 1 jelátvitelben szerepet játszó gének extracelluláris mátrix átépülést szabályozó funkcióira SPSS program segítségével világítottunk rá (9. táblázat). A mono- és kokultúrában tenyésztett fibroblaszt minták *MMP* és *TIMP* génexpressziós értékeit összevetettük a *TGFBR2*, *LTBP1* és *TIEG* gének mRNS expresszióival. A *TGFBR2* és a *TIEG* eredmények szignifikáns mértékben korreláltak a *TIMP* és *MMP2* eredményekkel, illetve egymással (korrelációs koefficiens magasabb, mint 0,66, $p < 0,01$) (9. táblázat).

9. táblázat. mRNS expressziós korrelációs vizsgálat a fejnnyi modellrendszerben.

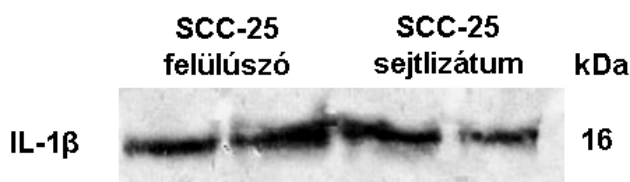
Korrelációs koefficiens	<i>MMP2</i>	<i>TIMP1</i>	<i>TIMP2</i>	<i>TIMP3</i>	<i>TGFBR2</i>
<i>TGFBR2</i> (N=28; **p<0,01)	0,767**	0,689**	0,766**	0,711**	-
<i>TIEG</i> (N=28; **p<0,01)	0,854**	0,760**	0,766**	0,660**	0,891**

Az irodalomban találunk utalást arra, hogy az IL-1 β kezelés befolyásolja a sejtek MMP termelését, főleg az MMP-1 és -3 esetében [99]. Emiatt és kutatócsoportunk korábbi eredményei alapján vizsgáltuk az IL-1 β gyulladási citokin szerepét a fejnnyi modellrendszerben.

10. táblázat. Az IL-1 β és receptorának mRNS expressziós eredményei a fejnnyi modellrendszerben. Az expressziós értékek mindegyike x100.

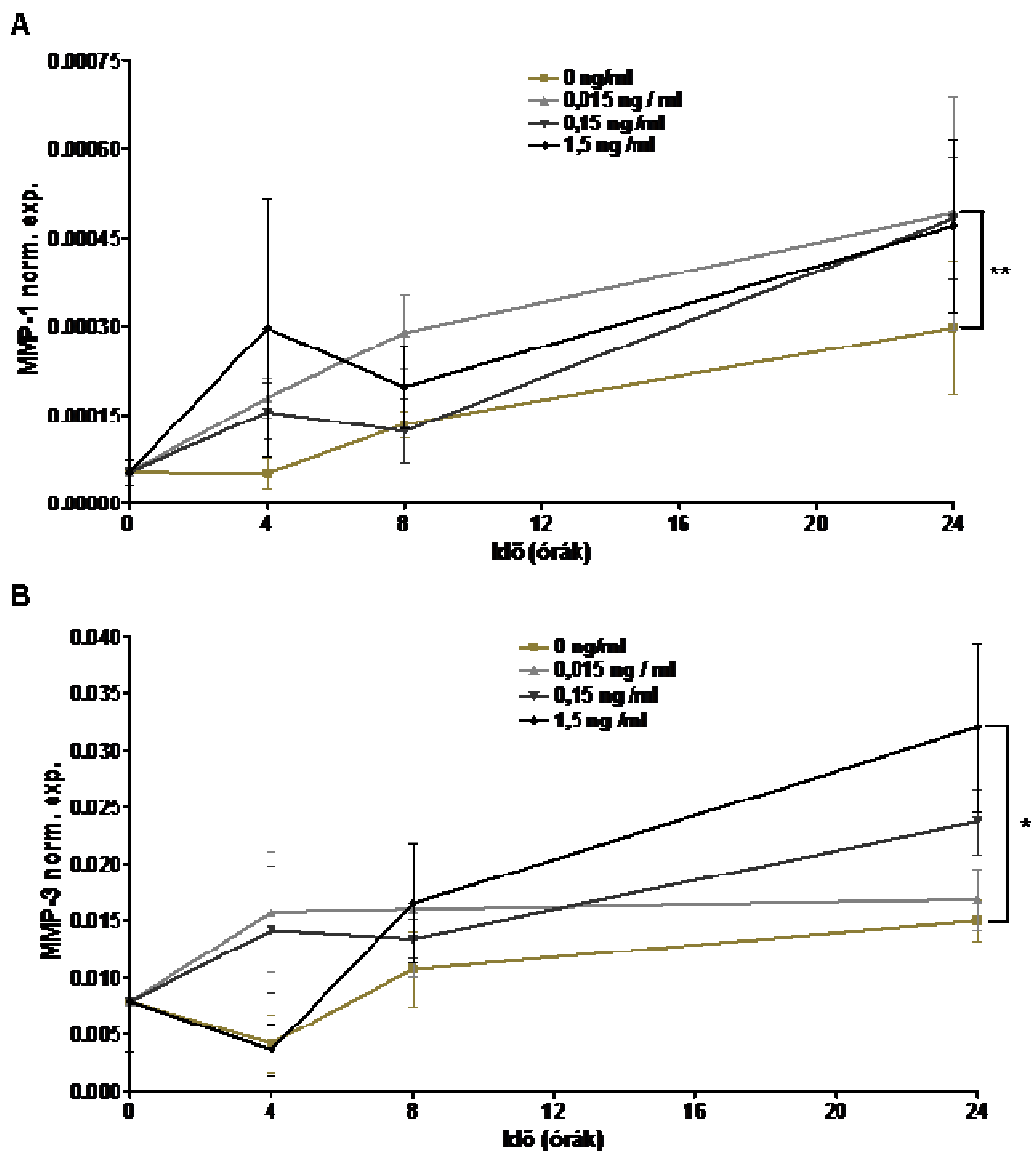
Gén	Norm. exp. PDL	Norm. exp. PDL/SCC-25	Változás PDL/SCC-25 vs. PDL	Norm. exp. SCC-25	Norm. exp. PDL/SCC-25	Változás PDL/SCC-25 vs. SCC-25
<i>IL1B</i>	0,02 \pm 0,01	0,06 \pm 0,01	2,7 \uparrow ***	1,83 \pm 0,25	1,88 \pm 0,26	1,03
<i>IL1BR</i>	0,16 \pm 0,02	0,53 \pm 0,07	3,8 \uparrow ***	0,03 \pm 0,01	0,03 \pm 0,00	0,76

Az *IL1B* főként az SCC-25 sejtekben, receptora (*IL1BR*) pedig a fibroblasztokban expresszálódott. Az *IL1BR* expressziója a PDL sejtekben szignifikánsan nőtt a tumorsejtekkel való együttélés hatására (10. táblázat). A tumorsejtek esetében immunprecipitációval kombinált Western blottal is ki tudtuk mutatni az IL-1 β fehérje jelenlétét, az mRNS eredményekhez hasonlóan az expresszió fehérje szinten sem változott a kokultúrás tenyésztés hatására (29. ábra).



29. ábra. SCC-25 tumorsejtek IL-1 β fehérje expressziója.

Az IL-1 β MMP szabályozó szerepének felderítéséhez különböző koncentrációjú (0,015-1,5 ng/ml) és időtartamú kezelést (0, 4, 8, 24 óra) alkalmaztunk a PDL és SCC-25 sejtek monokultúrák tenyészeteinél, majd mRNS expresszióbeli változásokat vizsgáltuk az *MMP* és *TIMP* gének esetében. A PDL fibroblasztoknál az *MMP1* és *MMP3* gének expressziója szignifikánsan nőtt (Student-féle *t*-próba Welch korrekcióval: ***p*<0,01 és **p*<0,05) a 24 órás 1,5 ng/ml IL-1 β kezelés hatására (30. ábra), az *MMP2* szintje nem változott.



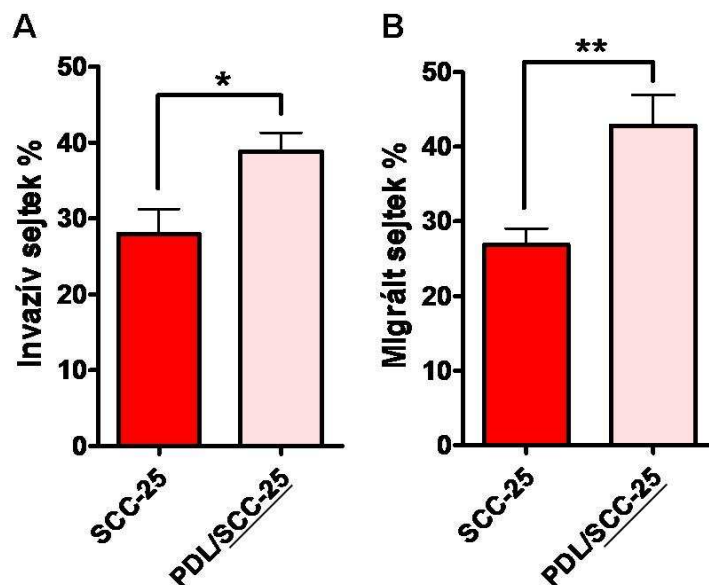
30. ábra. A PDL fibroblasztok *MMP1* (A) és *MMP3* (B) mRNS expressziós változásai az IL-1 β kezelésekre hatására.

Az *MMP1* és *MMP9* eredmények a SCC-25 sejtek esetében nem bizonyultak szignifikánsnak. Ahogy vártuk, az IL-1 β receptort szinte alig exprezáló tumorsejtek *MMP* és *TIMP* termelését nem befolyásolta a kezelés.

A gyulladási ciktokinek hatásának visszaszorítása érdekében a klinikumban alkalmazott szintetikus szteroid a dexametazon (DEX), mely ugyanúgy gátolja a CRH és az ACTH termelését, mint a kortizol. A tumorsejtek által termelt IL-1 β fibroblasztokra gyakorolt hatását kokultúrában DEX kezeléssel gátoltuk, és vizsgáltuk az *MMP* és *TIMP* gének expresszió változásait. A *TIMP1* és *TIMP3* génextpresszió szignifikáns mértékben lecsökkent a DEX kezelés hatására a kezeletlen kokultúrák mintákhöz képest (Student-féle *t*-próba Welch korrekcióval: $p < 0,01$). A *TIMP3* DEX kezelt minta expressziója a monokultúrák kontroll minták szintjére csökkent vissza. A többi gén esetében a változás nem volt szignifikáns.

6. 2. 3. Inváziós és migrációs vizsgálatok a fejnyci modellrendszerben

Inváziós és migrációs teszttel vizsgáltuk a kokultúra hatását SCC-25 sejtek motilitására.



31. ábra. Az invazív (A) és migrált (B) SCC-25 sejtek százalékos aránya monokultúrában és indirekt kokultúrában.

A fibroblasztok indirekt jelenlétének hatására a tumorsejtek szignifikánsan nagyobb invazivitást mutattak (Student-féle t -próba Welch: $p < 0,05$) (31A. ábra), és szignifikánsan több sejt vándorolt át a mátrigéllal bevont inzerten keresztül (Student-féle t -próba Welch korrekcióval: $p < 0,01$) a kontroll tenyészetekhez képest (31B. ábra).

7. MEGBESZÉLÉS

Napjainkban bizonyított ténynek tarthatjuk, hogy a daganatokban jelenlévő nem tumoros sejtek szoros, funkcionális kapcsolatban vannak a tumorsejtekkel [1]. Következésképpen a tumorszövet biológiai viselkedését ez a közösség együtt határozza meg. Kérdés, hogyan működik a daganatszövet mint társadalom, milyen munkamegosztás van a tumorsejtek és a strómális sejtek, valamint az extracelluláris mátrix között? A tumor-stróma interakció természetesen számtalan eseményt befolyásol a daganat életében a sejteken belül és a sejtek környezetében. Kutatásunk ennek a kérdésnek néhány szeletét kívánta górcső alá venni, nevezetesen 1. a normális és a tumor-asszociált fibroblasztok között fellelhető eltéréseket, 2. mátrix fehérje szintetizáló aktivitásuk változását tumorsejtekkel történő interakció esetén. Kapott eredményeinket az irodalom tükrében értelmezzük.

Két modellrendszert alkalmaztunk, a fejnyak eredetű laphámrák tenyésztet fogbél eredtű fibroblasztokkal, a HPV-16 pozitív méhnyakrák sejteket méhnyakrákból származó fibroblasztokkal, illetve a műtéti preparátumban látszólag tumormentes portio-ból tenyésztett fibroblasztokkal neveltük kokultúrákban. Látható tehát, hogy fibroblasztjaink három csoportot képviselnek: 1. biztosan daganatmentes szövetből származó sejtek (PDL); 2. tumor környéki ép szövetből származó sejtek (NF); 3. biztosan tumorból kinövesztett sejtek (TF).

Jóllehet az összehasonlítás során tekintetbe kell vennünk a sejtek topográfiai eredetének potenciális hatását az általunk megfigyelt fenotípusos változásokban, bizonyos szintű analógia a kétféle ráktípus között vonható, hiszen mindkét esetben laphámrákokról beszélünk. Mégis felvetődik a kérdés, hogy az eltérő lokalizációjú laphámrákok és strómális elemeik azonos módon viselkednek-e a tumorprogresszió során?

Több tanulmány is arról számolt be, hogy a differenciálódott testi sejtek, így a hámok és a strómális fibroblasztok is „pozícionális memóriával” rendelkeznek. Sági és munkatársai igazolták, hogy mesenchymális össejt

populációk egyedi „Hox kóddal” vagy „Hox gén kifejeződési ujjlenyomattal” bírnak, amely specifikus a sejtek anatómiai eredetére. Ennek megfelelően preferenciálisan fejeznek ki olyan transzkripciós faktorokat, melyek az adott szerv vagy szövet embrionális fejlődésében is nélkülözhetetlen szereppel bírnak. A sejtek topografikus hovatartozása, illetve ennek sejtszintű emlékei a különböző szöveti eredetű kultúrákban még igen hosszú távú *in vitro* tenyésztés (10-15 átoltás) után is megőrződnek [100]. Microarray vizsgálatok bizonyítják, hogy különböző donorokból származó fibroblasztok génexpressziós mintázata azonos testtájaknak megfelelően szignifikáns hasonlóságot mutat, ugyanakkor a közös donorból, de különböző testtájokról származó gének expressziója jelentősen eltér. Hox expressziós mintázatuk alapján meghatározható, hogy az egyes fibroblasztok melyik anatómiai területről származnak. Bizonyos fehérjék átírása, vagy mennyisége, mint az extracelluláris mátrixot alkotó kollagének, fibronektin, fibrillin tehát helyspecifikus lehet a fibroblasztok esetében [15]. A pozicionális memória elméletet támasztja alá egy másik közlemény is, melyben nem talpi eredetű hámsejteket kokultúrában növesztettek talpi dermális papillákból származó, illetve talpi, de retikuláris kötőszövetből származó fibroblasztokkal. A papilláris fibroblasztok az összes esetben indukálták a talpra jellemző keratintípus expresszióját a nem-talpi hámsejtekben, míg a retikuláris fibroblasztok csak az esetek felében [101].

A tumorprogresszió során bekövetkező extracelluláris mátrixváltozások és sejtes események sokban hasonlítanak a sebgyógyulánál megfigyeltekéhez. Kalluri szerint a tumor egy olyan seb, ami sosem gyógyul [14]. Jogos tehát, hogy a változások feltérképezése során olyan makromolekulákat vizsgáljunk, melyek a sebgyógyulásban is aktív szereplők. Szöveti immunfestések és PCR-el validált RNS microarray eredményei adták meg elsőként a kutatás irányvonalát a méhnyakrák esetében, rámutatva azokra a molekulákra, melyek változása jelentős lehet a méhnyakrák élete szempontjából. Ezek a bazális membrán laminin- α 1, - β 1, laminin-5, perlekán, az intersticiális mátrix fehérjéi közül a fibronektin, több MMP, a thrombospondin, a CD44 és a TGF- β 1 voltak.

A méhnyakrákok esetében már a szöveti mikroarray felhívta a figyelmünket arra a tényre, hogy ez a tumorféleség nagymértékben átszervezi az intersticiális mátrixát. Külön feltűnő volt az SMA pozitív TF sejtek felszaporodása, a laminin-1 depozíciója, és a laminin-5 megjelenése a tumorsejtek citoplazmájában.

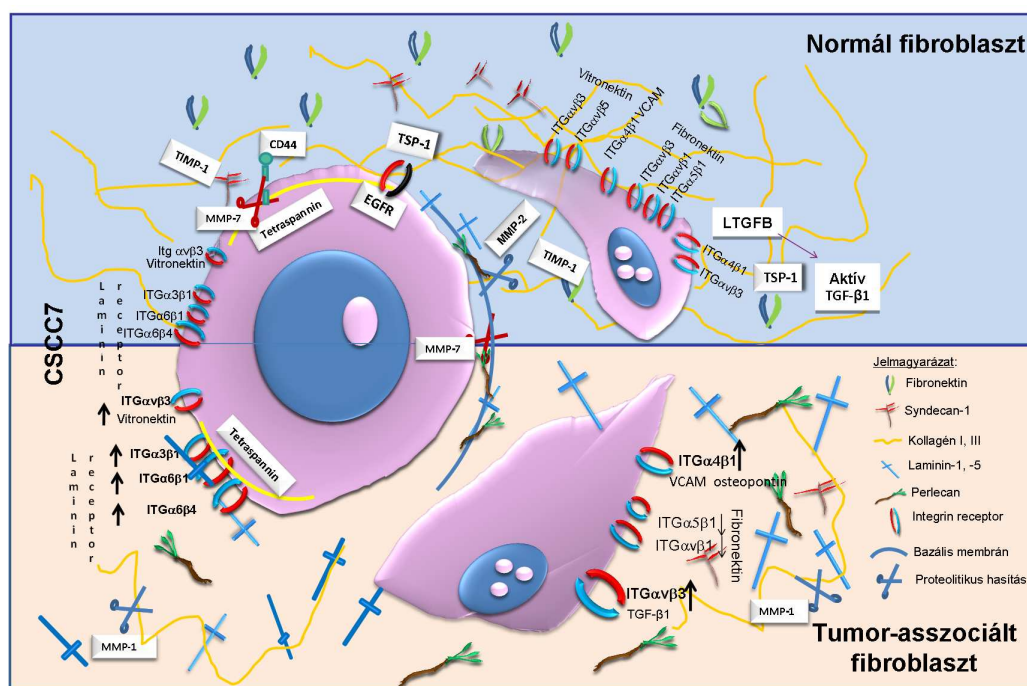
In vitro kokultúra rendszereink érdekes megfigyelésekhez vezettek, melyek összhangban voltak az immunhisztokémiai vizsgálatokkal. A dagantmentes régiókból származó fibroblasztok elsősorban fibrilláris mátrix komponenseket, I, III típusú kollagént és fibronektint termeltek, míg a TF sejtek több bazális membrán komponenst szekretáltak a tenyésztőfolyadékba. A két laphámrák sejtvonal eltérő MMP szintetizáló aktivitással bírt, és eltérő módon működött együtt a strómális fibroblasztjaival. A mátrix szintézis és az EMT fő stimulátorát, a TGF- β 1-et a fejnyakrák modellnél a tumorsejt és a fibroblaszt egyaránt termelte, míg a méhnyakrák modellben csak a tumorsejtben tudunk termelést kimutatni. Az ép fibroblaszt jelenléte fokozni tudta a tumorsejtek TGF- β 1 termelését. Eltérő volt a tumorsejtek mátrix fehérje igénye is. Az SCC-25 sejt fibronektin receptorokat expresszált és fibronektin hatására fokozta MMP-9 termelését, míg a CSCC7 sejteken főleg laminin receptorokat tudunk kimutatni. Utóbbi tumorsejt laminin függőségét bizonyította, hogy Boyden-kamrában elsősorban a laminin fokozta a migrációját.

Annak ellenére, hogy a méhnyaki és fejnyaki modellrendszereink vizsgálatakor a tumor-stróma interakció más-más elemeire fókuszáltunk, mégis a két modellrendszerben tapasztalt eredmények összevetése során közös vonások is fellelhetőek voltak.

Mindkét daganattípus kialakulásában az egyik legfontosabb kiváltó tényező a HPV-16 vírusfertőzés. Számos közlemény számol be arról, hogy a TSP-1 és CD151 által aktivált integrin α 6 felelős a vírus hámsejtbe jutásáért [24, 27, 102, 103]. A CSCC7 sejtekről köztudott a HPV-16 pozitivitás [92], sejtlizátumaikból ki is mutattuk az integrin α 6 jelenlétét, mely az integrin β 1-el és β 4-el párt alkotva laminin receptor funkciót tölt be. Az SCC-25 sejtek igaz HPV-

16 negatívak [104], de a vírustranszfecció fokozza a sejtek proliferációját, életképességét és terjedését [105]. Az *ITGA6* mRNS expressziót ebben a sejtípusban is kimutattuk, azonban sem a PDL, sem a méhnyaki fibroblasztok nem expresszálták ezt a gént. Eddig nem említett vizsgálataink alapján az NF és a TF sejtízátumából sem mutatható ki a HPV-16 vírus jelenléte.

A topográfiailag különböző daganatrendszerünk vizsgálatakor számos eltérés és hasonlóság mutatkozott. Az általunk vizsgált legfontosabb mátrix komponensek ismert szerepe elősegíti rendszerünkben észlelt változások értelmezését. A méhnyaki modellrendszerben történt legfontosabb változásokat a 32. ábra foglalja össze, melynek részleteit a következőkben taglaljuk.



32. ábra. Összefoglaló ábra a méhnyaki modellrendszerben kapott eredményeinkről. Az ép fibroblasztok a stróma fibrilláris elemeit termelik, melyek elengedhetetlenek a daganatsejtek lokális inváziójához. A tumor-asszociált fibroblasztok az invazív tumorsejtek progresszióját és migrációját segítik elő fokozott laminin-1 és perlekan, valamint csökkent kollagén IV termelésükkel. A szekretált metalloproteinázok megbontják a bazális membrán szerkezetét, megemésztik az intersticiális stróma fibrilláris kollagénjeit, így a lamininkötő integrinokkal felvértezett tumorsejtek a strómában rendezetlen hálózatként megjelenő laminin-1 mentén hatékony migrációra képesek. A tetraspanin által membránhoz horgonyzott és aktivált

mátrix metalloproteinázok lehasítják a CD44 extracelluláris fragmentjét, így csökkentik a daganatsejtek adhézióját és elősegíti terjedésüket.

7. 1. A bazális membrán és komponenseinek változásai

A laminin-1, illetve a mai terminológiával laminin-111, a nevének megfelelően $\alpha 1$, $\beta 1$ és $\gamma 1$ láncból áll [106]. Vizsgálataink során az $\alpha 1$ és $\beta 1$ láncot tanulmányoztuk, melyekhez kizárólag a $\gamma 1$ lánc kapcsolódhat, tehát minden bizonnyal az általunk mért változások a laminin-1 változásait reprezentálják. A laminin-1 tumorprogresszióban játszott szerepe jól ismert. A molekula mindhárom lánc tartalmaz olyan peptidszekvenciákat, melyek szignálként szerepelnek és befolyásolják a tumorok viselkedését. Az $\alpha 1$ láncon található IKVAV és AG73, a $\gamma 1$ láncre lokalizálódó C16 peptidek erősen fokozzák a tumornövekedést, míg a $\beta 1$ láncon található YIGSR motívum gátolja azt. Érdekességként megjegyzendő, hogy az AG73 a tumornövekedést és az áttétképződést syndecan-1-hez történő kapcsolódással fejti ki, az IKVAV viszont integrin receptorhoz történő kapcsolódással fokozza a tumor növekedést és metasztázis képződést [107]. Az irodalmi adatok szerint azonban több mint 40 biológiai aktivitással rendelkező peptid található a molekulán. Szükséges hangsúlyozni azt a tényt is, hogy a daganatokban megtalálható proteázok ezek mellett számos, ma még nem biztosan ismert un. matricriptin anyagot képesek létrehozni a laminin molekula emésztésével [107]. Legalább négy eredményünk utal arra, hogy modellrendszerünkben a laminin-1-nek fontos szerepe van: 1. a tumoros fibroblasztok sokkal több laminin-1-et termeltek, mint a normál fibroblasztok; 2. direkt kokultúrában a laminin-1 komponenseinek szekrécija fokozódott; 3. indirekt kokultúrában, ha a fibroblasztok laminin szekrécija csökkent, a tumorsejtek fokozott laminin-1 termelésbe kezdtek, 4. a tumorsejtek felszínén kitüntetetten laminin receptorokat találtunk.

A laminin-5 (laminin-332) a sebgyógyulás során fontos szerepet játszik mind a keratinociták migrációjában, majd annak leállításában és a hemidezmoszómák létrehozásában [108]. Számos irodalmi adat erősíti meg, hogy a molekula elősegíti a daganatsejtek invázióját. Ennek során a γ -lánc hasítási

termékének szerepét feltételezik, amit az MMP-2 hoz létre [109]. A laminin-5 méhnyak adenocarcinómában inváziós markerként használható [110, 111]. Az általunk készített szöveti microarray-n valóban jól látható volt bőséges immunreakciója a tumorsejtek citoplazájában, és az inváziós frontoknak megfelelően bazális membránt is formált. Ezért volt számunkra kezdetben nehezen értelmezhető, hogy *in vitro* rendszerünkben a laminin-5 szekréciója az NF-hez képest fokozatosan csökkent a TF és a kokultúrák médiumában. Ugyanakkor a tumorsejtek jelentős mennyiségű $\alpha\beta 4$ integrint expresszáltak, ami tudva levően a laminin-5 fő receptora. Az indirekt TF kokultúra tumorsejt oldali médiuma azonban szignifikánsan több laminin-5-öt tartalmazott, mint az NF kokultúráé. Ez az immunhisztokémiával összevetve azt bizonyítja, hogy nem a TF, hanem a tumorsejt fokozza a laminin-5 termelését. Elmondható tehát, hogy a méhnyakrák sejtek autokrin módon fokozzák a saját inváziójukat a laminin-5 termelésével. A szövettani vizsgálatok során azt is megfigyelték, hogy a laminin-5 termelés fokozódása elsősorban a korai méhnyakrákok inváziójára jellemző, és expressziója csökken a daganat progressziója során [111]. Ez a megfigyelés összecseng saját adatainkkal, melyek szerint az NF-tumorsejt interakció során magasabb laminin-5 expressziót mértünk, mint a TF-tumorsejt interakció esetében.

A perlekán a bazális membrán fő heparán-szulfát (HS) proteoglikánja. Molekulaszűrő szerepe mellett HS láncain keresztül növekedési faktorok, citokinek kötésére képes, ezáltal szabályozva a környezetben található sejtek működését. A multidomén szerkezetű molekula angiogenezist fokozó és angiogenezist stimuláló szekvenciákat hordoz. A molekula szerepéről a daganatok növekedésében ellentmondó adatok találhatók [112-114]. Kétségtelen, hogy kitüntetett szerepet játszik az angiogenezisben, daganatnövekedést stimuláló vagy gátló hatása is részben ezen alapul. Vizsgálatainkban a perlekán termelése a laminin-1-hez hasonlóan alakult. A daganatsejtek fizikai közelsége fokozott perlekán szekrécióra ösztönözte az aktiválódott strómasejteket, de a tumorsejtek maguk is termelték a molekulát és ezt a TF sejtek jelenléte jobban stimulálta. A

lamininhez hasonlóan irodalmi adatok szerint részt vesz a daganatos extracelluláris mátrix kialakításában is [115].

A IV típusú kollagén a bazális membrán fő strukturális komponense. Rendszerünkben termelésének csökkenése vált fő gátjává a szabályos bazális membrán kialakításának. Expressziójának csökkenése elősegíti az EMT létrejöttét [116].

Összességében a fentiek alapján megállapítható, hogy méhnyakrák mintáinkra jellemző a bazális membrán komponensek szintézisének egyensúlyzavara. Mi több, a lamininek megjelennek az intersticiális strómában. A szabályos bazális membrán hiányában a hámsejtek, vagy az *in situ* tumorsejtek kapcsolatba kerülnek a tőlük addig elhatárolt intersticiális stróma komponenseivel. Ez önmagában előidézhetheti bizonyos MMP-k aktiválódását [78, 86]. Másrészt az abortív bazális membrán többé nem szabályozza a hámsejtek statikus elrendeződését a hemidezmoszómák által, hanem a sebgyógyuláshoz hasonlóan azok migrációját segíti elő.

7. 2. Az intersticiális stróma változásai

A fibrilláris stróma leghatározottabb változását a fent leírtak jelentik. A méhnyakrákos eseteinkben immunhisztokémiával nem tudtunk szignifikáns eltérést kimutatni az ép és tumoros stróma fibronektin mennyiségében, ugyanakkor a fibroblasztjaink szintetikus aktivitása *in vitro* eltért egymástól. Adataink alapján azt a következtetést vontuk le, hogy a fehérje szerepe eltérő a fejnyakrák és a méhnyakrák esetében. Előbbinél ismert tény, hogy a fibronektin az $\alpha 5\beta 1$ és $\alpha v\beta 6$ integrinen keresztül fokozza az MMP-9 termelését, ami a fejnyaki tumorok inváziójában fontos szerepet játszik [117]. A fibronektin szerepét hangsúlyozzák emlőrák esetén a tumorsejtek alvó állapotából invazív vá válásakor is [118]. A fibronektin ED-B izoformája jellemző a fejnyaki rákokra, ezért terápiás targetként is szolgál [119]. Ugyanakkor az $\alpha 5\beta 1$ integrin nincs a méhnyakrák sejtek felszínén, és a tumorsejtek nem termelnek MMP-9-et. *In vitro* a TF sejtek médiumában feleannyi fibronektin találtunk, mint az NF sejtekében,

és ez a különbség minden tenyésztési feltétel mellett megmaradt. A méhnyakrák sejtek sem termelik a fehérjét. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a méhnyakrák inváziója során kevésbé veszi igénybe a fibronektint, jöllehet annak sruktúrája számos módon segíthetné elő az inváziót [29].

Feltűnő, hogy a III típusú kollagén szekréciója a TF sejtekben jelentősen lecsökkent, míg az I típusú kollagéné kevésbé változott. A kollagén I szerepéről eltérő közlemények láttak napvilágot. Glioma sejteket az I típusú kollagén $\alpha 1$ láncával transfektálva azok növekedése és inváziós képessége szignifikánsan csökkent [120]. Ugyanakkor pancreas rákban az I és III típusú kollagén felszaporodását a fokozott invázióval hozták kapcsolatba [121]. Feltételezések szerint a kötőszövet merevsége aktiválja a Rho-Rock rendszert, ami tovább fokozza a kollagén produkciót. Utóbbi a β -katenin útvonalon keresztül vezet a sejtek fokozott proliferációjához [122]. Mindezek a közlemények, összevetve saját rendszerünkben tapasztaltakkal arra utalnak, hogy a kollagének szerepe nagymértékben függ az alkalmazott tumormodelltől.

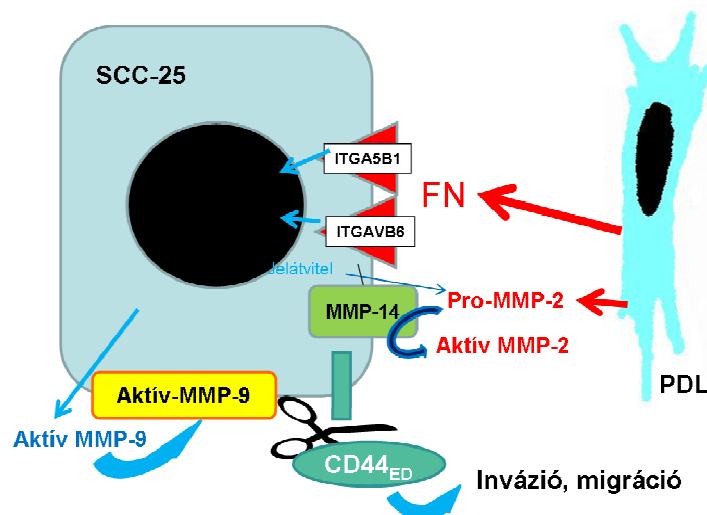
7. 3. Mátrícéluláris fehérjék

Mátrícéluláris fehérjéken azokat a molekulákat értjük, melyeket a sejtek az extracelluláris mátrixba szekretálnak, de nincsen strukturális funkciójuk. Általában antiadhezív tulajdonságúak, és számos más mátrix komponenssel, valamint sejt felszíni molekulával képesek interakcióba lépni. Legfontosabb reprezentánsaik a thrombospondin-1, a tenascin C, és a SPARC. Ezek közül fehérje szinten a TSP1-et vizsgáltuk a méhnyakrák modellben. A molekula fontosságára utal folyamatosan magas relatív expressziója a fibroblasztokban, mely a tumorsejtek közvetlen interakciójára tovább fokozódik. A tumorsejtek szintén képesek a termelésére. Jelenléte feltehetőleg az extracelluláris mátrix szervezésében betöltött sokrétű funkciója miatt elengedhetetlen. Multidomén szerkezete miatt nagyszámú molekulával lép interakcióba, ennek köszönhető, hogy az aktuális interakcióktól függően adhezív és anti-adhezív képességét figyelték meg, leírták daganat gátló és serkentő hatását [123, 124]. Saját

vizsgálataink szempontjából két hatása érdemel kitüntetett figyelmet. Az egyik a TGF- β 1 aktiváló képessége, a másik az, hogy úgy tűnik EGF szerű doménjeivel képes annak receptorához kapcsolódva stimulálni a sejtproliferációt [125, 126]. A progresszió során a tumorsejtek által egyre kevésbé, míg a strómasejtek által egyre inkább termelődő fehérje [127] erős strómális lokalizációt mutat a fejnyaki daganatok körül [128]. Fokozza a tumorsejtek lamininhoz kötődését, az integrin α 6 expressziót [27], és ligandjául szolgál számos receptornak, ezáltal jelátviteli utakat aktivál [28].

Méhnyakrákokban számos MMP aktivitását kimutatták, részben a HPV-16 E6 és E7 fehérje hatásával összefüggésben [129]. A méhnyakrák modellünkben a tumorsejtek MMP-7-et, a fibroblasztok MMP-1-et és MMP-2-öt termeltek, RNS szinten *MMP3* és *MMP14* is kimutatható volt. A fejnyaki modellben a tumorsejtek MMP-9-et, a fibroblasztok MMP-2-t termeltek, és utóbbiakban RNS szinten kevés *MMP1* és *MMP3* volt mérhető. A legjelentősebb különbség tehát a két modellrendszer között az, hogy a CSCC7 sejtek az MMP-7-et expresszálták és az MMP-9-et nem, addig az SCC-25 sejtek mintáiból az MMP-9-et tudtuk kimutatni és az MMP-7-et nem. A két proteázban közös, hogy képesek bontani a bazális membrán struktúrfehérjéjét, a kollagén IV-et, így fontos szerepet játszanak az invazív daganat kialakulásában. Eredményeink arra utalnak, hogy az inváziót mindkét MMP elősegíti a CD44 extracelluláris egységének hasítása révén (35. ábra). Az MMP-9 esetében irodalmi adat is bizonyítja, hogy a membrán kötött MMP-9 lehasítja a CD44 egy darabját, és ennek hatására invazívabbá válik a daganat [130]. A méhnyakrák modellben CD44-et minden esetben ki tudtuk mutatni Western blottal a fibroblasztokon, a reakció viszont eltűnt, ha a fibroblasztokat direkt kokultúrában növesztettük a tumorsejtekkel. Arra a következtetésre jutottunk, hogy az MMP-7 is lehasítja a CD44 extracelluláris doménjét, ami megjelenik a médiumban. Ugyanakkor, a fibroblasztok médiumában mindig mértünk immunreakciót, ami arra utal, hogy valamelyik fibroblaszt által termelt MMP (pl. MMP-1) szintén képes hasítani a molekulát, de hatékonysága lényegesen kisebb. A 17A. és 17B. ábrán látható, hogy a CD44

extracelluláris, lehasadt doménje jóval kevesebb a TF/CSCC7 mintákban. Erre magyarázatul szolgál a 14B. és 14C. ábra, ahol látható, hogy a tumor-asszociált fibroblaszt sokkal gyengébben stimulálta a daganatsejtek MMP-7 produkcióját/vagy aktivációját. A CD151 a pro-MMP-7 membránhoz horgonyzásával elősegíti annak aktiválódását és a mátrix degradációt [131]. A membrán kötött MMP-7 feltehetőleg a MMP-9 esetében leírtakhoz hasonlóan lehasítja a CD44 extracelluláris doménjét, mely a daganatsejtek adhéziós tulajdonságait csökkenti. Az enzim hatékonyan hasítja a perlekánt is, ezáltal destabilizálva a bazális membránt, elősegítve a tumorsejtek invázióját. Emellett felfüggeszti a perlekán DmIV-3 doménjének sejtklaszter képző hatását, ami a sejtek szétszóródását eredményezi [132]. Aktiválja a fibroblasztok által termelt pro-VEGF molekulát, ezáltal stimulálva az angiogenezist [133].

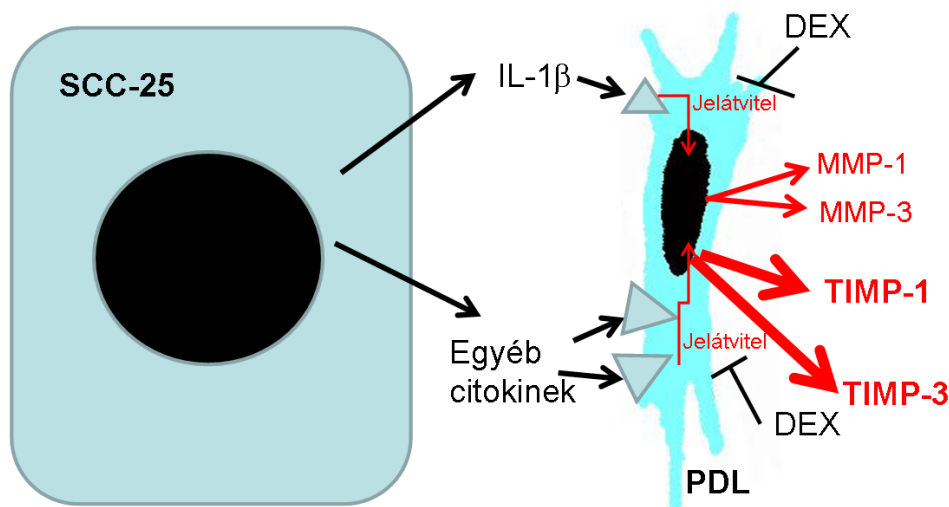


33. ábra. Sematikus összefoglaló ábra a fejnyci tumorsejtekben végbemenő folyamatokról a fibroblaszttal való interakció hatására. A daganatsejtek közelsége a strómális fibroblasztokat fokozott fibronectin termelésre készíteti, mely a tumorsejtek fibronectin receptorain keresztül fokozott MMP-9 termelést idéz elő. A sejt felszínhez kötött aktív MMP-9 lehasítja a CD44 extracelluláris fragmentjét, mely a tumorsejtek adhézióját csökkentve serkenti azok inváziós és migrációs képességét. A fibroblasztok által termelt pro-MMP-2 a tumorsejt felszínén lokalizálódó MMP-14-hez kapcsolódva aktiválódik, és bontja a stróma fibrilláris komponenseit.

Mint már említettük, a fejnyaki SCC-25 sejtek MMP-9 termelésében meghatározó szerepe van a fibronektinnek, ami integrineken keresztül fokozza a proenzim termelését. Az MMP-2 termeléséért mindkét modellünkben döntően a fibroblasztok felelősek, jóllehet kisebb mennyiségben a tumorsejtek médiumában kis kimutatható volt az inaktív és aktív forma egyaránt. Az MMP-2 a kokultúrákban aktiválódott, amiért feltehetően a tumorsejtek membránján található MMP-14 a felelős [134]. Utóbbit RNS szinten tudtuk kimutatni rendszerünkben (33. ábra). Sem a pro-MMP-2 mennyiségében, sem aktivációjában nem volt különbség az NF és TF sejtek között. Az MMP-1 aktivitását csak a méhnyakrák modellben tudtuk igazolni, itt is elsősorban a TF sejtek zselatináz aktivitása volt szembeűnő, a CSCC7 sejtek nem termelték az enzimet. Az MMP-1 elsősorban a fibrilláris, így az I és III típusú kollagéneket bontja, tehát aktivitása rendszerünkben szintén az intersticiális mátrix átszerveződése irányába hat. Az enzim aktivitását méhnyakrákokban is kimutatták, és fordított összefüggést találtak a túlélés és az MMP-1-1607insG polymorfizmus között, mely a gén fokozott átíródását idézi elő [135].

7. 4. Az MMP-k szabályozása

Előrebocsájtvá, hogy az MMP-eket számos faktor képes szabályozni, vizsgálatainkban ezek közül csak a TIMP-ek és az IL-1 β hatását vizsgáltuk. Mindkét modellrendszerünkben ki tudtuk mutatni bizonyos TIMP-ek jelenlétét. A méhnyakrák modellben a TIMP-1 fehérje változását figyelhettük meg, itt a várakozásnak megfelelően a TF-ben és a kokultúrában volt szignifikánsan alacsonyabb a fehérje szekréciója. A CSCC7 sejt is termelte a molekulát. Ugyanakkor a fejnyaki modellben a fibroblaszt-tumor interakció a TIMP-1 és TIMP-3 fehérje szignifikáns fokozódását idézte elő (34. ábra).



34. ábra. Sematikus összefoglaló ábra a SCC-25 sejtek által termelt citokinek PDL fibroblasztokra tett hatásáról. A fibroblasztok elősegíthetik a tumorsejtek invázióját részben az MMP-k génexpressziójának parakrin szabályozása révén, részben az MMP-k termelésével, mely egyben egy válaszreakció a tumorsejtek által termelt citokinek jelenlétére.

A jelenség nehezen érthető, hiszen azt várnánk, hogy a TIMP-ek fokozott reprezentációja gátolva az MMP-ekt a tumoros invázió ellen hat. Nagyszámú fejnyakrákos beteg vizsgálatánál szintén megfigyelték a TIMP-1 fokozott expresszióját, ami kedvezőtlen túléléssel járt együtt. Ugyanakkor a szerzők nem vizsgálták milyen összefüggés van a TIMP túltermelése és az MMP-9 aktivitása között [136].

Kollaborációs partnereink már korábban felfigyeltek arra, hogy az SCC-25 sejtek által termelt IL-1 β a fibroblasztokat olyan molekula termelésére (BDNF) készíti, ami stimulálja az EMT létrejöttét [69]. Felmerült a kérdés, befolyásolja-e az IL-1 β az ECM komponensek termelését is? Braundmeier munkacsoportja már beszámolt arról, hogy az IL-1 β kezelés dóziszfüggően stimulálta az endometriumból származó fibroblasztok MMP-1, MMP-2 és MMP-3 expresszióját [137]. A PDL fibroblaszt mintákban kimutattuk az IL-1 β receptorát, így logikusnak tűnt a citokin kezelés hatásának vizsgálata. A fejnyaki modellrendszerben bebizonyosodott az IL-1 β kezelés MMP stimuláló hatása, melyet a dexamethasone kezelés a kontroll szintre csökkentett vissza. Ebből arra

következtethetünk, hogy a fibroblasztok a tumorsejtek invázióját részben az MMP-k termelése révén fejtik ki, mely egy válaszreakció a tumorsejtek által termelt citokinek jelenlétére (34. ábra). A méhnyaki modellrendszerben IL-1 β szerepéről nem tettünk említést, mivel előzetes vizsgálataink alapján a CSCC7 tumorsejtek nem termelték az IL-1 β -át, és a citokin kezelés nem gyakorolt számottevő hatást a sejtekre.

7. 5. Sejtfelszíni molekulák és mátrix receptorok

Jelen vizsgálatainkban két sejtfelszíni molekulát a standard CD44-et, és a CD151 említjük csak meg, tudatában annak, hogy szükséges lenne érintenünk a syndecan-1 és -4 szerepét is. Ez azonban meghaladja aktuális vizsgálataink határait. A CD44 shedding szerepét a sejtinvázióban az MMP-nél említettük, ezért a továbbiakban nem térünk ki rá.

Eredményeink értékelése során szembesültünk a CD151 fontos szerepével mind a mátrixbontás, mind a laminin-asszociált invázió esetén. A molekula expressziója immunhisztokémiával a fibroblasztok és a CSCC7 sejt felszínén egyaránt megfigyelhetőek volt, tehát a neki tulajdonítható inváziókapcsolt funkciók rendszerünkben is feltételezhetőek. Fiziológias körülmények között a CD151 interakcióba lép az $\alpha 6\beta 4$ integrinnel és a laminin-5-el, így meghatározó szerepet játszik a hámsejtek bazális membránhoz történő rögzítésében [138], és a sebgyógyulásban [139]. Integrinekkal való kölcsönhatásának következtében fontos szerepe van a sejt-ECM interakciójában nem csak az adhezív, hanem a nem polarizált, migráló sejtek (pl immunsejtek) esetében is.

Fontos fiziológias szerepe ellenére a tetraspanin több módon is elősegíti a daganatok invázióját. Expressziója szükséges az MMP-2, -7, -9 aktiválásához, de úgy tűnik expressziójához is. A laminin receptor $\alpha 6\beta 4$ integrinnel kapcsolatba lépve fokozza a laminin-integrin kötés stabilitását, ezáltal elősegítve a receptort expresszáló tumorsejt migrációját [140]. Tekintetbe véve, hogy méhnyakrák sejteink felszínén kitüntetetten laminin receptorok és elsősorban integrin $\alpha 6\beta 4$

mutatható ki, a modellben a CD151 szerepe meghatározó, így részletes vizsgálatát tervezzük.

A mátrixmolekulák hordozta információkat a mátrixreceptor-integrinek továbbítják a sejtek felé, ezáltal befolyásolják azok működését. Az integrineket más vonatkozásban említettük a megbeszélés során. Vizsgálataink nem terjedtek ki az összes integrinre, de számos, a laminin, a fibronectin és a vitronectin kötéséért felelős reprezentásuk változását vizsgáltuk. Két modellrendszerünket összehasonlítva látható, hogy a tumorsejtjeink eltérő laminin receptorokkal rendelkeznek. Míg az SCC-25 $\alpha\beta6$ és $\alpha5\beta1$ fibronectin receptorokat expresszál, a CSCC7 felszínén elsősorban $\alpha6\beta4$ és kisebb mennyiségben $\alpha6\beta1$ receptor található. Ennek megfelelően kokultúrában fibroblasztjaik fibronectint illetve laminint termeltek. Még meg nem válaszolt kérdés, hogy milyen szignálok eredményezik a stróma és tumorsejt összehangolását? A CSCC7 felszínén kimutatott $\alpha6\beta4$ speciális integrin, szerepe túlmutat a sima receptor funkción. A $\beta4$ molekulának ugyanis szokatlanul hosszú intracelluláris doménje van. Az intracelluláris rész számos tirozin foszforilációs helyet tartalmaz és kettős tirozinkináz receptorként működik. Juxtamembrán szakaszával a Sarc család tirozinkinázaihoz kapcsolódik, ezáltal foszforilálódik az öt legfontosabb foszforilációs helye. Ez az SHC adaptoron keresztül aktiválja a RAS-ERK jelátvitelt. Emellett a molekulát a PKC szerinen foszforilálja. Mindkét foszforiláció hemidezmoszómák lebomlását és sejt migrációt eredményez [141]. Méhnyakrák modellünkben azt is láthattuk, hogy a NF és TF sejtek elsősorban fibronectin, vitronectin, és osteopontin receptorokat expresszálnak, mi több, az $\alpha\beta3$ integrin expressziója a tumorsejt direkt kölcsönhatására növekszik is. Jelenleg nem tudjuk pontosan értelmezni ezeket a változásokat, hiszen egyidejűleg a TF sejtekben a fibronectin szekréciója csökkent.

7. 6. A TGF- β 1 szerepe

A TGF- β 1 kettős szerepet játszik a daganatok létrejöttében. Korai stádiumban gátolja a tumorigenezist, míg a későbbi szakaszban stimulálja a

daganat növekedését [142, 143]. Kérdés, milyen módon befolyásolja a TGF- β 1 a két modellrendszerünk sejtjeit? A növekedési faktor szerepét a méhnyakrákok stróma képzésében leírták. A növekedési faktort eszerint a tumorsejtek termelik, és a termelés mértéke párhuzamos a tumoros stróma mennyiségével [144]. A leírtakkal összhangban a méhnyakrák modellünkben is csak a tumorsejtek termelték a növekedési faktort, de a NF sejtek fokozták a CSCC7 sejtek TGF- β 1 produkcióját. A fejnyaki modellben a fibroblasztok és a tumorsejtek egyaránt termeltek TGF- β 1-et. Az irodalmi adatok arra utalnak, hogy akár a fibroblaszt, akár a daganatsejt termeli a TGF- β 1-et, a növekedési faktor hatását csak a fibroblasztokon fejti ki. A fibroblasztok a TGF- β 1 hatására átprogramozzák anyagcseréjüket, amit ezután a katabolizmus és az oxidatív stressz jellemez. Ennek következtében tejsavat és egyéb olyan anyagcsere termékeket juttatnak a mátrixba, melyek fokozzák a tumorsejtek mitokondriális aktivitását és proliferációra készítik őket [145]. Ez a közelmúltban feltárt mechanizmus választ ad arra a kérdésre, miként változik át a TGF- β 1 sejtnövekedést gátló hatása növekedést stimulálóvá. Egyben magyarázatot nyújt arra is, hogyan fokozza a fibroblasztok kondicionált médiuma a tumor növekedést rendszerünkben. Nem kapunk viszont választ arra, miért csak az NF stimulálja a tumorsejtek TGF- β 1 termelését.

A növekedési faktor képes fokozni az integrin α 6 β 1 laminin receptor, valamint a laminin expresszióját is [146, 147]. Elképzelhető tehát, hogy hasonló hatást gyakorol a méhnyakrák modell sejtjeire is.

A látens TGF- β 1 aktiválására nemcsak a thrombospondin képes, hanem a myofibroblasztok kontrakciójukkal szintén aktiválják a molekulát. Ehhez a SMA összehúzódása mellett olyan integrinre van szükség, ami RGD szekvencia kötésére képes. Láthattuk, hogy fibroblasztjaink felszínén kimutatható az α v β 3 integrin, melyről bizonyították is, hogy képes résztvenni a TGF- β 1 aktiválásában. Elképzelhető, hogy a TF sejtekben fokozódó integrin expresszió szerepe a növekedési faktor aktiválása [148].

8. Következtetések

1. Primer kultúrában a tumorsejtek csak a fibroblasztok jelenlétében életképesek.
2. A bazális membránt áttörő invazív daganatsejtek további terjedéséhez elengedhetetlen a strómális elemekkel való fizikai kontaktus. A normál fibroblasztok és a tumorsejtek direkt kapcsolata jelentős aktív TGF- β 1, MMP-7 és TIMP-1 szekréciót eredményez.
3. A normál fibroblasztok által termelt faktorok fokozzák, a tumor-asszociált fibroblasztok nem befolyásolják a méhnyakrák sejtek proliferációját.
4. Az ép fibroblasztok a stróma fibrilláris elemeit és a mátrix degradáció szabályozó komponenseit temelik, melyek elengedhetetlenek a daganatsejtek lokális inváziójához.
5. A tumor-asszociált fibroblasztok az invazív tumorsejtek progresszióját és migrációját fokozott laminin-1 és perlekán, valamint csökkent kollagén IV termelésükkel segítik elő, miközben metalloproteázaik megbontják a bazális membrán szerkezetét, megemésztik az intersticiális stróma fibrilláris kollagénjeit. A leírtak a bazális membránfehérjék strómális lokalizációját eredményezik. Az elsősorban laminin kötő integrinokkal rendelkező tumorsejtek a strómában rendezetlen hálózatként megjelenő laminin-1 mentén hatékony migrációra képesek. Méhnyakrákban a tumorsejtek által termelt laminin-5 kirajzolja a daganatfészkek határait.
6. A tetraspanin által membránhoz horgonyzott és aktivált MMP-7 vagy MMP-9 lehasítja a CD44 extracelluláris fragmentjét, mely csökkenti a daganatsejtek adhézióját, és elősegíti terjedésüket.
7. Fejnyaki daganatokban a tumorsejtek által termelt citokinek, elsősorban az IL-1 β a fibroblasztok MMP-1 és -3, a TGF- β 1 pedig az MMP-2, TIMP-1 és TIMP-3 termelést szabályozzák.

8. A fibroblasztok elősegíthetik a tumorsejtek invázióját részben az MMP-k génexpressziójának parakrin szabályozása révén, részben az MMP-k termelésével, mely egyben egy válaszreakció a tumorsejtek által termelt citokinek jelenlétére fejnyaki daganatokban.
9. A strómális elemek extracelluláris mátrix komponenseinek termelése elengedhetetlen a daganatsejtek inváziójához és progressziójához a laphámdaganatok esetében.

9. ÖSSZEFOGLALÁS

A rosszindulatú daganat egy összetett, heterogén rendszer, melynek szövetté szerveződéséhez elengedhetetlen a daganatos stróma kialakítása. Így a daganatok valódi természetét csak akkor érthetjük meg, ha a tumorsejteket szöveti környezetükkel együtt vizsgáljuk. Az invazív karcinómák gyakori kísérője a kötőszövetes állomány felszaporodása, melyet részben az aktivált fibroblasztok, részben a daganatsejtek termelnek.

Kutatásunk méhnyakrák és fejnnyaki kokultúra modellrendszerek vizsgálatán keresztül próbálta feltárni a tumor-stróma interakcióban fontos szerepet játszó tényezőket. Tumor-asszociált és ép fibroblasztok daganatsejtekkel történő interakcióját követve megállapítottuk, hogy ezek eltérően reagálnak a daganatsejtek jelenlétére. Az ép fibroblasztok eredettől függetlenül inkább a fibrilláris stróma komponenseit, elsősorban fibronektint és I, III típusú kollagén szintetizáltak. A sejtek eltérő lokalizációjának szerepére utalt, hogy a fogból eredetű fibroblasztok által termelt fibronektin a fejnnyakról származó daganatsejtek integrin receptorán keresztül stimulálta utóbbiak MMP-9 termelését. Ugyanez a méhnyakrák sejtek esetén nem volt megfigyelhető, sőt ezek egyáltalán nem termeltek MMP-9-et. Az ép fibroblasztok által termelt faktorok serkentik a tumorsejtek proliferációját, a stróma fibrilláris komponenseinek termelésével megfelelő mikrokörnyezetet hoznak létre a daganatsejtek életben maradásához és inváziójához. A daganatsejtekkel való direkt kapcsolatuk a fokozott mátrixdegradáció és újonképződés új egyensúlyát eredményezik. A fenti események szabályozásában a daganatsejtek által termelt különböző citokinek és az aktiválódott TGF- β 1 játszanak kitüntetett szerepet.

A tumor-asszociált fibroblasztok jelentős mértékben fokozták a laminin-1 és a perlekán termelését, azonban csökkent a IV típusú kollagén szintézisük. Így a szekretált bazális membrán komponensek egyensúlya felborul, mely állapot akadályozza a bazális membrán struktúrába szerveződését. A túlsúlyban termelődő komponensek a fibrilláris strómában jelennek meg, ahol elősegítik a daganatsejtek hatékonyabb terjedését.

10. SUMMARY

Malignant tumours are complex, heterogeneous systems, in the tissue organization of which the formation of a malignant stroma is necessary. Thus, the real nature of cancer can only be understood when tumour cells are examined together with their tissue environment. Invasive carcinomas are often accompanied by excessive parenchyma produced by both the activated fibroblasts and the tumour cells themselves.

In our study we investigated the nature of tumour-stroma interaction in cervical- and head and neck carcinomas using *in vitro* co-culture model systems. We observed that tumour-associated and normal fibroblasts reacted differently to the presence of carcinoma cells. Regardless of tissue origin, normal fibroblasts synthesized primarily fibrillar components of the stroma i.e. fibronectin, type I, and type III collagens. However, while fibronectin produced by dental pulp fibroblasts stimulated MMP-9 production from head and neck carcinoma cells through integrin receptors on the latter, no such effect could be observed in cervical cancer cells.

Secretion of normal fibroblasts stimulated proliferation of tumour cells, and by producing fibrillar stromal components they contributed to a microenvironment optimal for tumour cells to survive and invade. Direct contact with normal fibroblasts resulted in a novel equilibrium between an intensified matrix degradation and renewal. These events were predominantly regulated by cytokines and TGF- β 1 produced by tumour cells.

Tumour-associated fibroblasts significantly promoted production of various basal membrane components including laminin-1 and perlecan. Since, in parallel, the expression of type IV collagen decreased, the molecular composition of basal membrane secreted by fibroblasts became distorted. In its altered new state the basal membrane failed to structurally organise, and the excess of fibrillar stroma promoted scattering of tumour cells. The increased expression of laminin-1 and perlecan, and decreased production of type IV collagen by activated myofibroblast cells further facilitated spreading of tumour cells.

11. IRODALOMJEGYZÉK

1. Park, C. C., Bissell, M. J. & Barcellos-Hoff, M. H. (2000) The influence of the microenvironment on the malignant phenotype, *Mol Med Today*. 6, 324-9.
2. Allen, M. & Louise Jones, J. (2011) Jekyll and Hyde: the role of the microenvironment on the progression of cancer, *J Pathol*. 223, 162-76.
3. Balkwill, F. & Mantovani, A. (2001) Inflammation and cancer: back to Virchow?, *Lancet*. 357, 539-45.
4. Bissell, M. J., Hall, H. G. & Parry, G. (1982) How does the extracellular matrix direct gene expression?, *J Theor Biol*. 99, 31-68.
5. Curado, M. P. & Hashibe, M. (2009) Recent changes in the epidemiology of head and neck cancer, *Curr Opin Oncol*. 21, 194-200.
6. Hecht, S. S. (2003) Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer, *Nat Rev Cancer*. 3, 733-44.
7. White, R. A., Malkoski, S. P. & Wang, X. J. (2010) TGFbeta signaling in head and neck squamous cell carcinoma, *Oncogene*. 29, 5437-46.
8. Michaud, D. S., Langevin, S. M., Eliot, M., Nelson, H. H., Pawlita, M., McClean, M. D. & Kelsey, K. T. (2014) High-risk HPV types and head and neck cancer, *Int J Cancer*.
9. Koopman, L. A., Szuhai, K., van Eendenburg, J. D., Bezrookove, V., Kenter, G. G., Schuurin, E., Tanke, H. & Fleuren, G. J. (1999) Recurrent integration of human papillomaviruses 16, 45, and 67 near translocation breakpoints in new cervical cancer cell lines, *Cancer Res*. 59, 5615-24.
10. Pirog, E. C., Lloveras, B., Molijn, A., Tous, S., Guimera, N., Alejo, M., Clavero, O., Klaustermeier, J., Jenkins, D., Quint, W. G., Xavier Bosch, F., Alemany, L., de Sanjose, S. & on behalf of the, R. I. S. H. P. V. T. T. s. g. (2014) HPV prevalence and genotypes in different histological subtypes of

- cervical adenocarcinoma, a worldwide analysis of 760 cases, *Mod Pathol.* 27, 1559-67.
11. Liotta, L. A. & Kohn, E. C. (2001) The microenvironment of the tumour-host interface, *Nature.* 411, 375-9.
 12. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. (2000) The hallmarks of cancer, *Cell.* 100, 57-70.
 13. Heino, J. & Kapyla, J. (2009) Cellular receptors of extracellular matrix molecules, *Curr Pharm Des.* 15, 1309-17.
 14. Kalluri, R. & Zeisberg, M. (2006) Fibroblasts in cancer, *Nat Rev Cancer.* 6, 392-401.
 15. Chang, H. Y., Chi, J. T., Dudoit, S., Bondre, C., van de Rijn, M., Botstein, D. & Brown, P. O. (2002) Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99, 12877-82.
 16. Bissell, M. J. & Hines, W. C. (2011) Why don't we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression, *Nat Med.* 17, 320-9.
 17. Yang, N., Mosher, R., Seo, S., Beebe, D. & Friedl, A. (2011) Syndecan-1 in breast cancer stroma fibroblasts regulates extracellular matrix fiber organization and carcinoma cell motility, *Am J Pathol.* 178, 325-35.
 18. Tomasek, J. J., Gabbiani, G., Hinz, B., Chaponnier, C. & Brown, R. A. (2002) Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling, *Nature reviews Mol Cell Biol.* 3, 349-63.
 19. Boudreau, N. & Bissell, M. J. (1998) Extracellular matrix signaling: integration of form and function in normal and malignant cells, *Curr Opin Cell Biol.* 10, 640-6.
 20. Niu, G. & Chen, X. (2011) Why integrin as a primary target for imaging and therapy, *Theranostics.* 1, 30-47.

21. Humphries, J. D., Byron, A. & Humphries, M. J. (2006) Integrin ligands at a glance, *J Cell Sci.* 119, 3901-3.
22. Hynes, R. O. (2002) Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines, *Cell.* 110, 673-87.
23. Liapis, H., Flath, A. & Kitazawa, S. (1996) Integrin alpha V beta 3 expression by bone-residing breast cancer metastases, *Am J Surg Pathol.* 5, 127-35.
24. Scheffer, K. D., Gawlitza, A., Spoden, G. A., Zhang, X. A., Lambert, C., Berditchevski, F. & Florin, L. (2013) Tetraspanin CD151 mediates papillomavirus type 16 endocytosis, *J Virol.* 87, 3435-46.
25. Adams, J. C. & Lawler, J. (1993) Diverse mechanisms for cell attachment to platelet thrombospondin, *J Cell Sci.* 104 (Pt 4), 1061-71.
26. Staniszewska, I., Zaveri, S., Del Valle, L., Oliva, I., Rothman, V. L., Croul, S. E., Roberts, D. D., Mosher, D. F., Tuszynski, G. P. & Marcinkiewicz, C. (2007) Interaction of alpha9beta1 integrin with thrombospondin-1 promotes angiogenesis, *Cir Res.* 100, 1308-16.
27. John, A. S., Rothman, V. L. & Tuszynski, G. P. (2010) Thrombospondin-1 (TSP-1) Stimulates Expression of Integrin alpha6 in Human Breast Carcinoma Cells: A Downstream Modulator of TSP-1-Induced Cellular Adhesion, *J Oncol.* 2010, 645376.
28. Lawler, J. (2002) Thrombospondin-1 as an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth, *J Cell Mol Med.* 6, 1-12.
29. Pankov, R. & Yamada, K. M. (2002) Fibronectin at a glance, *J Cell Sci.* 115, 3861-3.
30. Ffrench-Constant, C., Van de Water, L., Dvorak, H. F. & Hynes, R. O. (1989) Reappearance of an embryonic pattern of fibronectin splicing during wound healing in the adult rat, *J Cell Biol.* 109, 903-14.

31. Cheng, Y. S., Champlaud, M. F., Burgeson, R. E., Marinkovich, M. P. & Yurchenco, P. D. (1997) Self-assembly of laminin isoforms, *J Biol Chem.* 272, 31525-32.
32. Goel, H. L., Li, J., Kogan, S. & Languino, L. R. (2008) Integrins in prostate cancer progression, *Endocr Relat Cancer.* 15, 657-64.
33. Cress, A. E., Rabinovitz, I., Zhu, W. & Nagle, R. B. (1995) The alpha 6 beta 1 and alpha 6 beta 4 integrins in human prostate cancer progression, *Cancer Metastasis Rev.* 14, 219-28.
34. Bonkhoff, H., Stein, U. & Remberger, K. (1993) Differential expression of alpha 6 and alpha 2 very late antigen integrins in the normal, hyperplastic, and neoplastic prostate: simultaneous demonstration of cell surface receptors and their extracellular ligands, *Hum Pathol.* 24, 243-8.
35. Knox, J. D., Cress, A. E., Clark, V., Manriquez, L., Affinito, K. S., Dalkin, B. L. & Nagle, R. B. (1994) Differential expression of extracellular matrix molecules and the alpha 6-integrins in the normal and neoplastic prostate, *Am J Pathol.* 145, 167-74.
36. Isaac, J., Tarapore, P., Zhang, X., Lam, Y. W. & Ho, S. M. (2012) Site-specific S-nitrosylation of integrin alpha6 increases the extent of prostate cancer cell migration by enhancing integrin beta1 association and weakening adherence to laminin-1, *Biochemistry.* 51, 9689-97.
37. Kuo, K. T., Liang, C. W., Hsiao, C. H., Lin, C. H., Chen, C. A., Sheu, B. C. & Lin, M. C. (2006) Downregulation of BRG-1 repressed expression of CD44s in cervical neuroendocrine carcinoma and adenocarcinoma, *Mod Pathol.* 19, 1570-7.
38. Bartolazzi, A., Peach, R., Aruffo, A. & Stamenkovic, I. (1994) Interaction between CD44 and hyaluronate is directly implicated in the regulation of tumor development, *J Exp Med.* 180, 53-66.

39. Peterson, R. M., Yu, Q., Stamenkovic, I. & Toole, B. P. (2000) Perturbation of hyaluronan interactions by soluble CD44 inhibits growth of murine mammary carcinoma cells in ascites, *Am J Pathol.* 156, 2159-67.
40. Karvinen, S., Kosma, V. M., Tammi, M. I. & Tammi, R. (2003) Hyaluronan, CD44 and versican in epidermal keratinocyte tumours, *Br J Dermatol.* 148, 86-94.
41. Hartmann-Petersen, S., Tammi, R. H., Tammi, M. I. & Kosma, V. M. (2009) Depletion of cell surface CD44 in nonmelanoma skin tumours is associated with increased expression of matrix metalloproteinase 7, *Br J Dermatol.* 160, 1251-7.
42. Dasari, S., Shouri, R. N., Rajendra, W. & Valluru, L. (2014) Effect of concurrent radiochemotherapy and chemotherapy on serum proteins for prospective predictors of patients with HPV induced cervical cancer, *Biomed Pharmacother.* 68, 315-20.
43. Radisky, E. S. & Radisky, D. C. (2007) Stromal induction of breast cancer: inflammation and invasion, *Rev Endocr Metab Disord.* 8, 279-87.
44. Casey, T. M., Eneman, J., Crocker, A., White, J., Tessitore, J., Stanley, M., Harlow, S., Bunn, J. Y., Weaver, D., Muss, H. & Plaut, K. (2008) Cancer associated fibroblasts stimulated by transforming growth factor beta1 (TGF-beta 1) increase invasion rate of tumor cells: a population study, *Breast Cancer Res Treat.* 110, 39-49.
45. Sasano, H. & Suzuki, T. (2005) Pathological evaluation of angiogenesis in human tumor, *Biomed Pharmacother.* 59 Suppl 2, S334-6.
46. Ostman, A. & Augsten, M. (2009) Cancer-associated fibroblasts and tumor growth--bystanders turning into key players, *Curr Opin Genet Dev.* 19, 67-73.
47. Kojima, Y., Acar, A., Eaton, E. N., Mellody, K. T., Scheel, C., Ben-Porath, I., Onder, T. T., Wang, Z. C., Richardson, A. L., Weinberg, R. A. & Orimo, A.

- (2010) Autocrine TGF-beta and stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) signaling drives the evolution of tumor-promoting mammary stromal myofibroblasts, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107, 20009-14.
48. Olumi, A. F., Grossfeld, G. D., Hayward, S. W., Carroll, P. R., Tlsty, T. D. & Cunha, G. R. (1999) Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium, *Cancer Res.* 59, 5002-11.
49. Orimo, A. & Weinberg, R. A. (2006) Stromal fibroblasts in cancer: a novel tumor-promoting cell type, *Cell Cycle.* 5, 1597-601.
50. Orimo, A., Gupta, P. B., SgROI, D. C., Arenzana-Seisdedos, F., Delaunay, T., Naeem, R., Carey, V. J., Richardson, A. L. & Weinberg, R. A. (2005) Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion, *Cell.* 121, 335-48.
51. Elenbaas, B. & Weinberg, R. A. (2001) Heterotypic signaling between epithelial tumor cells and fibroblasts in carcinoma formation, *Exp Cell Res.* 264, 169-84.
52. Forsberg, K., Valyi-Nagy, I., Heldin, C. H., Herlyn, M. & Westermark, B. (1993) Platelet-derived growth factor (PDGF) in oncogenesis: development of a vascular connective tissue stroma in xenotransplanted human melanoma producing PDGF-BB, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90, 393-7.
53. Xu, J., Lamouille, S. & Derynck, R. (2009) TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition, *Cell Res.* 19, 156-72.
54. Thiery, J. P. (2002) Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression, *Nat Rev Cancer.* 2, 442-54.
55. Yingling, J. M., Blanchard, K. L. & Sawyer, J. S. (2004) Development of TGF-beta signalling inhibitors for cancer therapy, *Nat Rev Drug Discov.* 3, 1011-22.

56. Siegel, P. M. & Massague, J. (2003) Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer, *Nat Rev Cancer*. 3, 807-21.
57. Dumont, N. & Arteaga, C. L. (2003) Targeting the TGF beta signaling network in human neoplasia, *Cancer cell*. 3, 531-6.
58. Gorsch, S. M., Memoli, V. A., Stukel, T. A., Gold, L. I. & Arrick, B. A. (1992) Immunohistochemical staining for transforming growth factor beta 1 associates with disease progression in human breast cancer, *Cancer Res*. 52, 6949-52.
59. Hayashi, H. & Sakai, T. (2012) Biological Significance of Local TGF-beta Activation in Liver Diseases, *Front Physiol*. 3, 12.
60. Kopfstein, L. & Christofori, G. (2006) Metastasis: cell-autonomous mechanisms versus contributions by the tumor microenvironment, *Cell Mol Life Sci*. 63, 449-68.
61. St John, M. A., Dohadwala, M., Luo, J., Wang, G., Lee, G., Shih, H., Heinrich, E., Krysan, K., Walser, T., Hazra, S., Zhu, L., Lai, C., Abemayor, E., Fishbein, M., Elashoff, D. A., Sharma, S. & Dubinett, S. M. (2009) Proinflammatory mediators upregulate snail in head and neck squamous cell carcinoma, *Clin Cancer Res*. 15, 6018-27.
62. Miyazawa, K., Mori, A. & Okudaira, H. (1998) Regulation of interleukin-1beta-induced interleukin-6 gene expression in human fibroblast-like synoviocytes by glucocorticoids, *J Biochem*. 124, 1130-7.
63. Bhowmick, N. A. & Moses, H. L. (2005) Tumor-stroma interactions, *Curr Opin Genet Dev*. 15, 97-101.
64. Higashikawa, K., Yoneda, S., Taki, M., Shigeishi, H., Ono, S., Tobiume, K. & Kamata, N. (2008) Gene expression profiling to identify genes associated with high-invasiveness in human squamous cell carcinoma with epithelial-to-mesenchymal transition, *Cancer letters*. 264, 256-64.

65. Paterlini-Brechot, P. & Benali, N. L. (2007) Circulating tumor cells (CTC) detection: clinical impact and future directions, *Cancer Lett.* 253, 180-204.
66. Kennedy, A. L., McBryan, T., Enders, G. H., Johnson, F. B., Zhang, R. & Adams, P. D. (2010) Senescent mouse cells fail to overtly regulate the HIRA histone chaperone and do not form robust senescence associated heterochromatin foci, *Cell division.* 5, 16.
67. Hoot, K. E., Lighthall, J., Han, G., Lu, S. L., Li, A., Ju, W., Kulesz-Martin, M., Bottinger, E. & Wang, X. J. (2008) Keratinocyte-specific Smad2 ablation results in increased epithelial-mesenchymal transition during skin cancer formation and progression, *J Clin Invest.* 118, 2722-32.
68. Casarsa, C., Bassani, N., Ambrogi, F., Zabucchi, G., Boracchi, P., Biganzoli, E. & Coradini, D. (2011) Epithelial-to-mesenchymal transition, cell polarity and stemness-associated features in malignant pleural mesothelioma, *Cancer Lett.* 302, 136-43.
69. Dudas, J., Bitsche, M., Schartinger, V., Falkeis, C., Sprinzl, G. M. & Riechelmann, H. (2011) Fibroblasts produce brain-derived neurotrophic factor and induce mesenchymal transition of oral tumor cells, *Oral Oncol.* 47, 98-103.
70. Kopantzev, E. P., Vayshlya, N. A., Kopantseva, M. R., Egorov, V. I., Pikunov, M., Zinovyeva, M. V., Vinogradova, T. V., Zborovskaya, I. B. & Sverdlov, E. D. (2010) Cellular and molecular phenotypes of proliferating stromal cells from human carcinomas, *Br J Cancer.* 102, 1533-40.
71. Vered, M., Dayan, D., Yahalom, R., Dobriyan, A., Barshack, I., Bello, I. O., Kantola, S. & Salo, T. (2010) Cancer-associated fibroblasts and epithelial-mesenchymal transition in metastatic oral tongue squamous cell carcinoma, *Int J Cancer.* 127, 1356-62.
72. Murphy, G. & Nagase, H. (2008) Progress in matrix metalloproteinase research, *Mol Aspects Med.* 29, 290-308.

73. Sato, T., Ota, T., Watanabe, M., Imada, K., Nomizu, M. & Ito, A. (2009) Identification of an active site of EMMPRIN for the augmentation of matrix metalloproteinase-1 and -3 expression in a co-culture of human uterine cervical carcinoma cells and fibroblasts, *Gynecol Oncol.* 114, 337-42.
74. Egeblad, M. & Werb, Z. (2002) New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression, *Nat Rev Cancer.* 2, 161-74.
75. Stetler-Stevenson, W. G., Aznavoorian, S. & Liotta, L. A. (1993) Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis, *Annu Rev Cell Biol.* 9, 541-73.
76. Seiki, M. (1999) Membrane-type matrix metalloproteinases, *APMIS.* 107, 137-43.
77. Westermarck, J. & Kahari, V. M. (1999) Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion, *FASEB J.* 13, 781-92.
78. Kurschat, P., Wickenhauser, C., Groth, W., Krieg, T. & Mauch, C. (2002) Identification of activated matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) as the main gelatinolytic enzyme in malignant melanoma by in situ zymography, *J Pathol.* 197, 179-87.
79. Kato, N. & Motoyama, T. (2009) Relation between laminin-5 gamma 2 chain and cell surface metalloproteinase MT1-MMP in clear cell carcinoma of the ovary, *Int J Gynecol Pathol.* 28, 49-54.
80. Giannelli, G. & Antonaci, S. (2000) Biological and clinical relevance of Laminin-5 in cancer, *Clin Exp Metastasis.* 18, 439-43.
81. Atkinson, J. J., Toennies, H. M., Holmbeck, K. & Senior, R. M. (2007) Membrane type 1 matrix metalloproteinase is necessary for distal airway epithelial repair and keratinocyte growth factor receptor expression after acute injury, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 293, L600-10.
82. Gray, S. T., Wilkins, R. J. & Yun, K. (1992) Interstitial collagenase gene expression in oral squamous cell carcinoma, *Am J Pathol.* 141, 301-6.

83. Fingleton, B. M., Heppner Goss, K. J., Crawford, H. C. & Matrisian, L. M. (1999) Matrilysin in early stage intestinal tumorigenesis, *APMIS*. 107, 102-10.
84. Coussens, L. M. & Werb, Z. (1996) Matrix metalloproteinases and the development of cancer, *Chem Biol*. 3, 895-904.
85. Murray, G. I., Duncan, M. E., O'Neil, P., Melvin, W. T. & Fothergill, J. E. (1996) Matrix metalloproteinase-1 is associated with poor prognosis in colorectal cancer, *Nat Med*. 2, 461-2.
86. Sato, T., Sakai, T., Noguchi, Y., Takita, M., Hirakawa, S. & Ito, A. (2004) Tumor-stromal cell contact promotes invasion of human uterine cervical carcinoma cells by augmenting the expression and activation of stromal matrix metalloproteinases, *Gynecol Oncol*. 92, 47-56.
87. Parkin, D. M., Bray, F., Ferlay, J. & Pisani, P. (2005) Global cancer statistics, 2002, *CA Cancer J Clin*. 55, 74-108.
88. Edwards, B. K., Ward, E., Kohler, B. A., Ehemann, C., Zaubler, A. G., Anderson, R. N., Jemal, A., Schymura, M. J., Lansdorp-Vogelaar, I., Seeff, L. C., van Ballegooijen, M., Goede, S. L. & Ries, L. A. (2010) Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2006, featuring colorectal cancer trends and impact of interventions (risk factors, screening, and treatment) to reduce future rates, *Cancer*. 116, 544-73.
89. Ferlay, J., Shin, H. R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C. & Parkin, D. M. (2010) Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008, *Int J Cancer*. 127, 2893-917.
90. Loeffler, M., Kruger, J. A., Niethammer, A. G. & Reisfeld, R. A. (2006) Targeting tumor-associated fibroblasts improves cancer chemotherapy by increasing intratumoral drug uptake, *J Clin Invest*. 116, 1955-62.

91. Wang, X. M., Yu, D. M., McCaughan, G. W. & Gorrell, M. D. (2005) Fibroblast activation protein increases apoptosis, cell adhesion, and migration by the LX-2 human stellate cell line, *Hepatology*. 42, 935-45.
92. Hazelbag, S., Fleuren, G. J., Baelde, J. J., Schuurin, E., Kenter, G. G. & Gorter, A. (2001) Cytokine profile of cervical cancer cells, *Gynecol Oncol*. 83, 235-43.
93. Yang, C. M., Luo, S. F., Hsieh, H. L., Chi, P. L., Lin, C. C., Wu, C. C. & Hsiao, L. D. (2010) Interleukin-1beta induces ICAM-1 expression enhancing leukocyte adhesion in human rheumatoid arthritis synovial fibroblasts: involvement of ERK, JNK, AP-1, and NF-kappaB, *J Cell Physiol*. 224, 516-26.
94. Cao, X. C., Zhang, W. R., Cao, W. F., Liu, B. W., Zhang, F., Zhao, H. M., Meng, R., Zhang, L., Niu, R. F., Hao, X. S. & Zhang, B. (2013) Aquaporin3 is required for FGF-2-induced migration of human breast cancers, *PLoS One*. 8, e56735.
95. Sun, Z. J., Chen, G., Zhang, W., Hu, X., Liu, Y., Zhou, Q., Zhu, L. X. & Zhao, Y. F. (2011) Curcumin dually inhibits both mammalian target of rapamycin and nuclear factor-kappaB pathways through a crossed phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/IkappaB kinase complex signaling axis in adenoid cystic carcinoma, *Mol Pharmacol*. 79, 106-18.
96. Fule, T., Csapo, Z., Mathe, M., Tatrai, P., Laszlo, V., Papp, Z. & Kovalszky, I. (2006) Prognostic significance of high-risk HPV status in advanced cervical cancers and pelvic lymph nodes, *Gynecol Oncol*. 100, 570-8.
97. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem*. 72, 248-54.

98. Stamenkovic, I. & Yu, Q. (2009) Shedding light on proteolytic cleavage of CD44: the responsible sheddase and functional significance of shedding, *J Inv Dermat.* 129, 1321-4.
99. Dodge, G. R. & Jimenez, S. A. (2003) Glucosamine sulfate modulates the levels of aggrecan and matrix metalloproteinase-3 synthesized by cultured human osteoarthritis articular chondrocytes, *Osteoarthritis Cartilage.* 11, 424-32.
100. Sagi, B., Maraghechi, P., Urban, V. S., Hegyi, B., Szigeti, A., Fajka-Boja, R., Kudlik, G., Nemet, K., Monostori, E., Gocza, E. & Uher, F. (2012) Positional identity of murine mesenchymal stem cells resident in different organs is determined in the postsegmentation mesoderm, *Stem Cells Dev.* 21, 814-28.
101. Yamaguchi, Y., Itami, S., Tarutani, M., Hosokawa, K., Miura, H. & Yoshikawa, K. (1999) Regulation of keratin 9 in nonpalmoplantar keratinocytes by palmoplantar fibroblasts through epithelial-mesenchymal interactions, *J Inv Dermat.* 112, 483-8.
102. Abban, C. Y. & Meneses, P. I. (2010) Usage of heparan sulfate, integrins, and FAK in HPV16 infection, *Virology.* 403, 1-16.
103. Aksoy, P., Abban, C. Y., Kiyashka, E., Qiang, W. & Meneses, P. I. (2014) HPV16 infection of HaCaTs is dependent on beta4 integrin, and alpha6 integrin processing, *Virology.* 449, 45-52.
104. Gubanova, E., Brown, B., Ivanov, S. V., Helleday, T., Mills, G. B., Yarbrough, W. G. & Issaeva, N. (2012) Downregulation of SMG-1 in HPV-positive head and neck squamous cell carcinoma due to promoter hypermethylation correlates with improved survival, *Clin Cancer Res.* 18, 1257-67.
105. Reddout, N., Christensen, T., Bunnell, A., Jensen, D., Johnson, D., O'Malley, S. & Kingsley, K. (2007) High risk HPV types 18 and 16 are

- potent modulators of oral squamous cell carcinoma phenotypes in vitro, *Infect Agent Cancer*. 2, 21.
106. Horejs, C. M., Serio, A., Purvis, A., Gormley, A. J., Bertazzo, S., Poliniewicz, A., Wang, A. J., DiMaggio, P., Hohenester, E. & Stevens, M. M. (2014) Biologically-active laminin-111 fragment that modulates the epithelial-to-mesenchymal transition in embryonic stem cells, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 111, 5908-13.
 107. Kikkawa, Y., Hozumi, K., Katagiri, F., Nomizu, M., Kleinman, H. K. & Koblinski, J. E. (2013) Laminin-111-derived peptides and cancer, *Cell Adh Migr*. 7, 150-256.
 108. Amano, S., Akutsu, N., Ogura, Y. & Nishiyama, T. (2004) Increase of laminin 5 synthesis in human keratinocytes by acute wound fluid, inflammatory cytokines and growth factors, and lysophospholipids, *Br J Dermat*. 151, 961-70.
 109. S., G. G. A. (2001) Biological and clinical relevance of Laminin-5 in cancer, *Clin Exp Metastasis*. 18, 439-443.
 110. Skyldberg, B., Salo, S., Eriksson, E., Aspenblad, U., Moberger, B., Tryggvason, K. & Auer, G. (1999) Laminin-5 as a marker of invasiveness in cervical lesions, *J Natl Cancer Inst*. 91, 1882-7.
 111. Imura, J., Uchida, Y., Nomoto, K., Ichikawa, K., Tomita, S., Iijima, T. & Fujimori, T. (2012) Laminin-5 is a biomarker of invasiveness in cervical adenocarcinoma, *Diagn Pathol*. 7, 105.
 112. Mathiak, M., Yenisey, C., Grant, D. S., Sharma, B. & Iozzo, R. V. (1997) A role for perlecan in the suppression of growth and invasion in fibrosarcoma cells, *Cancer Res*. 57, 2130-6.
 113. Sharma, B., Handler, M., Eichstetter, I., Whitelock, J. M., Nugent, M. A. & Iozzo, R. V. (1998) Antisense targeting of perlecan blocks tumor growth and angiogenesis in vivo, *J Clin Invest*. 102, 1599-608.

114. Adatia, R., Albini, A., Carlone, S., Giunciuglio, D., Benelli, R., Santi, L. & Noonan, D. M. (1997) Suppression of invasive behavior of melanoma cells by stable expression of anti-sense perlecan cDNA, *Ann Oncol.* 8, 1257-61.
115. Jiang, X., Mulhaupt, H., Chan, E., Schaefer, L., Schaefer, R. M. & Couchman, J. R. (2004) Essential contribution of tumor-derived perlecan to epidermal tumor growth and angiogenesis, *J Hist Cytochem.* 52, 1575-90.
116. Zeisberg, M. & Neilson, E. G. (2009) Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions, *J Clin Invest.* 119, 1429-37.
117. Thomas, G. T., Lewis, M. P. & Speight, P. M. (1999) Matrix metalloproteinases and oral cancer, *Oral Oncol.* 35, 227-33.
118. Barkan, D., Green, J. E. & Chambers, A. F. (2010) Extracellular matrix: a gatekeeper in the transition from dormancy to metastatic growth, *Eur J Cancer.* 46, 1181-8.
119. Tijink, B. M., Neri, D., Leemans, C. R., Budde, M., Dinkelborg, L. M., Stigter-van Walsum, M., Zardi, L. & van Dongen, G. A. (2006) Radioimmunotherapy of head and neck cancer xenografts using ¹³¹I-labeled antibody L19-SIP for selective targeting of tumor vasculature, *J Nucl Med.* 47, 1127-35.
120. Honma, K., Miyata, T. & Ochiya, T. (2007) Type I collagen gene suppresses tumor growth and invasion of malignant human glioma cells, *Cancer Cell Int.* 7, 12.
121. Shields, M. A., Dangi-Garimella, S., Krantz, S. B., Bentrem, D. J. & Munshi, H. G. (2011) Pancreatic cancer cells respond to type I collagen by inducing snail expression to promote membrane type 1 matrix metalloproteinase-dependent collagen invasion, *J Biol Chem.* 286, 10495-504.
122. Samuel, M. S., Lopez, J. I., McGhee, E. J., Croft, D. R., Strachan, D., Timpson, P., Munro, J., Schroder, E., Zhou, J., Brunton, V. G., Barker, N.,

- Clevers, H., Sansom, O. J., Anderson, K. I., Weaver, V. M. & Olson, M. F. (2011) Actomyosin-mediated cellular tension drives increased tissue stiffness and beta-catenin activation to induce epidermal hyperplasia and tumor growth, *Cancer Cell*. 19, 776-91.
123. Kruttsch, H. C., Choe, B. J., Sipes, J. M., Guo, N. & Roberts, D. D. (1999) Identification of an alpha(3)beta(1) integrin recognition sequence in thrombospondin-1, *J Biol Chem*. 274, 24080-6.
124. Qian, X. & Tuszynski, G. P. (1996) Expression of thrombospondin-1 in cancer: a role in tumor progression, *Exp Biol Med*. 212, 199-207.
125. Sid, B., Sartelet, H., Bellon, G., El Btaouri, H., Rath, G., Delorme, N., Haye, B. & Martiny, L. (2004) Thrombospondin 1: a multifunctional protein implicated in the regulation of tumor growth, *Crit Rev Oncol Hematol*. 49, 245-58.
126. Sweetwyne, M. T. & Murphy-Ullrich, J. E. (2012) Thrombospondin1 in tissue repair and fibrosis: TGF-beta-dependent and independent mechanisms, *Matrix Biol*. 31, 178-86.
127. Brown, L. F., Guidi, A. J., Schnitt, S. J., Van De Water, L., Iruela-Arispe, M. L., Yeo, T. K., Tognazzi, K. & Dvorak, H. F. (1999) Vascular stroma formation in carcinoma in situ, invasive carcinoma, and metastatic carcinoma of the breast, *Clin Cancer Res*. 5, 1041-56.
128. Albo, D., Arnoletti, J. P., Castiglioni, A., Granick, M. S., Solomon, M. P., Rothman, V. L. & Tuszynski, G. P. (1994) Thrombospondin (TSP) and transforming growth factor beta 1 (TGF-beta) promote human A549 lung carcinoma cell plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) production and stimulate tumor cell attachment in vitro, *Biochem Biophys Res Commun*. 203, 857-65.

129. Kaewprag, J., Umnajvjit, W., Ngamkham, J. & Ponglikitmongkol, M. (2013) HPV16 oncoproteins promote cervical cancer invasiveness by upregulating specific matrix metalloproteinases, *PLoS One*. 8, e71611.
130. Chetty, C., Vanamala, S. K., Gondi, C. S., Dinh, D. H., Gujrati, M. & Rao, J. S. (2012) MMP-9 induces CD44 cleavage and CD44 mediated cell migration in glioblastoma xenograft cells, *Cell Sign.* 24, 549-59.
131. Zoller, M. (2009) Tetraspanins: push and pull in suppressing and promoting metastasis, *Nature reviews Cancer*. 9, 40-55.
132. Grindel, B. J., Martinez, J. R., Pennington, C. L., Muldoon, M., Stave, J., Chung, L. W. & Farach-Carson, M. C. (2014) Matrilysin/matrix metalloproteinase-7(MMP7) cleavage of perlecan/HSPG2 creates a molecular switch to alter prostate cancer cell behavior, *Matrix Biol.*
133. Ito, T. K., Ishii, G., Chiba, H. & Ochiai, A. (2007) The VEGF angiogenic switch of fibroblasts is regulated by MMP-7 from cancer cells, *Oncogene*. 26, 7194-203.
134. Oblander, S. A., Zhou, Z., Galvez, B. G., Starcher, B., Shannon, J. M., Durbeej, M., Arroyo, A. G., Tryggvason, K. & Apte, S. S. (2005) Distinctive functions of membrane type 1 matrix-metalloprotease (MT1-MMP or MMP-14) in lung and submandibular gland development are independent of its role in pro-MMP-2 activation, *Dev Biol*. 277, 255-69.
135. Zinzindohoue, F., Lecomte, T., Ferraz, J. M., Houllier, A. M., Cugnenc, P. H., Berger, A., Blons, H. & Laurent-Puig, P. (2005) Prognostic significance of MMP-1 and MMP-3 functional promoter polymorphisms in colorectal cancer, *Clin Cancer Res*. 11, 594-9.
136. Ruokolainen, H., Paakko, P. & Turpeenniemi-Hujanen, T. (2005) Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 is prognostic in head and neck squamous cell carcinoma: comparison of the circulating and tissue immunoreactive protein, *Clin Cancer Res*. 11, 3257-64.

137. Braundmeier, A. G. & Nowak, R. A. (2006) Cytokines regulate matrix metalloproteinases in human uterine endometrial fibroblast cells through a mechanism that does not involve increases in extracellular matrix metalloproteinase inducer, *Am J Reprod Immunol.* 56, 201-14.
138. Sterk, L. M., Geuijen, C. A., Oomen, L. C., Calafat, J., Janssen, H. & Sonnenberg, A. (2000) The tetraspan molecule CD151, a novel constituent of hemidesmosomes, associates with the integrin alpha6beta4 and may regulate the spatial organization of hemidesmosomes, *J Cell Biol.* 149, 969-82.
139. Penas, P. F., Garcia-Diez, A., Sanchez-Madrid, F. & Yanez-Mo, M. (2000) Tetraspanins are localized at motility-related structures and involved in normal human keratinocyte wound healing migration, *J Invest Dermatol.* 114, 1126-35.
140. Hasegawa, M., Furuya, M., Kasuya, Y., Nishiyama, M., Sugiura, T., Nikaido, T., Momota, Y., Ichinose, M. & Kimura, S. (2007) CD151 dynamics in carcinoma-stroma interaction: integrin expression, adhesion strength and proteolytic activity, *Lab Invest.* 87, 882-92.
141. Giancotti, F. G. (2007) Targeting integrin beta4 for cancer and anti-angiogenic therapy, *Trends Pharmacol Sci.* 28, 506-11.
142. Datto, M. B., Li, Y., Panus, J. F., Howe, D. J., Xiong, Y. & Wang, X. F. (1995) Transforming growth factor beta induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent mechanism, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92, 5545-9.
143. Padua, D. & Massague, J. (2009) Roles of TGFbeta in metastasis, *Cell Res.* 19, 89-102.
144. Hazelbag, S., Gorter, A., Kenter, G. G., van den Broek, L. & Fleuren, G. (2002) Transforming growth factor-beta1 induces tumor stroma and reduces tumor infiltrate in cervical cancer, *Hum Pathol.* 33, 1193-9.

145. Guido, C., Whitaker-Menezes, D., Capparelli, C., Balliet, R., Lin, Z., Pestell, R. G., Howell, A., Aquila, S., Ando, S., Martinez-Outschoorn, U., Sotgia, F. & Lisanti, M. P. (2012) Metabolic reprogramming of cancer-associated fibroblasts by TGF-beta drives tumor growth: connecting TGF-beta signaling with "Warburg-like" cancer metabolism and L-lactate production, *Cell Cycle*. 11, 3019-35.
146. Kumar, N. M., Sigurdson, S. L., Sheppard, D. & Lwebuga-Mukasa, J. S. (1995) Differential modulation of integrin receptors and extracellular matrix laminin by transforming growth factor-beta 1 in rat alveolar epithelial cells, *Exp Cell Res*. 221, 385-94.
147. Jiang, Y., Cheng, D. W., Crook, E. D. & Singh, L. P. (2005) Transforming growth factor-beta1 regulation of laminin gamma1 and fibronectin expression and survival of mouse mesangial cells, *Mol Cell Biochem*. 278, 165-75.
148. Wipff, P. J., Rifkin, D. B., Meister, J. J. & Hinz, B. (2007) Myofibroblast contraction activates latent TGF-beta1 from the extracellular matrix, *J Cell Biol*. 179, 1311-23.

12. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

Az értekezés témájában megjelent saját közlemények:

1. **Fullár A**, Dudás J, Oláh L, Hollósi P, Papp Z, Sobel G, Karászi K, Paku S, Baghy K, Kovalszky I
Remodeling of extracellular matrix by normal and tumor-associated fibroblasts promotes cervical cancer progression.
BMC Cancer 15: Paper 256. (2015)
IF: 3,319
2. Dudás J*, **Fullár A***, Romani A, Pritz C, Kovalszky I, Schartinger VH, Sprinzl GM, Riechelmann H
Curcumin targets fibroblast-tumor cell interactions in oral squamous cell carcinoma.
Experimental Cell Research 319:(6) pp. 800-809. (2013)
IF: 3,372
*: Társ elsőszerzők
3. **Fullár A**, Kovalszky I, Bitsche M, Romani A, Schartinger VH, Sprinzl GM, Riechelmann H, Dudás J
Tumor cells and carcinoma-associated fibroblasts interaction regulates matrix metalloproteinases and their inhibitors in oral squamous cell carcinoma.
Experimental Cell Research 318:(13) pp. 1517-1527. (2012)
IF: 3,557
4. Dudás J, **Fullár A**, Bitsche M, Schartinger VH, Kovalszky I, Sprinzl GM, Riechelmann H
Tumor-produced, active Interleukin-1 β regulates gene expression in carcinoma-associated fibroblasts.
Experimental Cell Research 317:(15) pp. 2222-2229. (2011)
IF: 3,580

Az értekezés témájától független saját közlemények:

1. Dudás J, Bocsi J, **Fullár A**, Baghy K, Füle T, Kudaibergenova S, Kovalszky I
Heparin and Liver Sulfate Can Resuce Hepatoma Cells from Topotecan
Action.
Biomed Research International 2014: Paper 765794. 8 p. (2014)
IF: 2,706
2. **Fullár A***, Baghy K*, Deák F, Péterfia B, Zsák Y, Tátrai P, Schaff Zs, Dudás
J, Kiss I, Kovalszky I
Lack of matrilin-2 favors liver tumor development via Erk1/2 and GSK-3 β
pathways in vivo.
PLOS One 9:(4) Paper e93469. 11 p. (2014)
IF: 3,534
*: Társ elsőszerzők
3. Horváth Zs, Kovalszky I, **Fullár A**, Kiss K, Schaff Zs, Iozzo RV, Baghy K
Decorin deficiency promotes hepatic carcinogenesis.
Matrix Biology 35: pp. 194-205. (2014)
IF: 3,648
4. **Fullár Alexandra**, Baghy Kornélia, Deák Ferenc, Kiss Ibolya, Kovalszky
Ilona Hepatocarcinogenesis matrilin-2 hiányos egerekben.
Orvosképzés 87:(1) pp. 9-20. (2012)
5. Péterfia B, Füle T, Baghy K, Szabadkai K, **Fullár A**, Dobos K, Zong F, Dobra
K, Hollósi P, Jeney A, Paku S, Kovalszky I
Syndecan-1 enhances proliferation, migration and metastasis of HT-1080 cells
in cooperation with syndecan-2.
PLOS One 7:(6) Paper e39474. 13 p. (2012)
IF: 3,730
6. Baghy K, Dezső K, László V, **Fullár A**, Péterfia B, Paku S, Nagy P, Schaff Zs,
Iozzo R, Kovalszky I:
Ablation of the decorin gene enhances experimental hepatic fibrosis and
impairs hepatic healing in mice.
Laboratory Investigation 91: pp. 439-451. (2011)
IF: 3,641

13. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Kovalszky Ilonának, aki lehetőséget adott, hogy felügyelete alatt diákkörösként, majd Ph.D. hallgatóként elsajátítsam a kutatómunka minden fortéját; valamint önzetlen szakmai és emberi segítséget nyújtott munkámhoz a hosszú évek során.

Köszönetet mondok Dr. Dudás Józsefnek, aki rengeteg tudást és tapasztalatot adott át nekem külföldi tanulmányútjaim során; konzulensként, mentorként és barátként segítette és támogatta mindvégig munkámat.

Köszönetet mondok Prof. Dr. Kopper Lászlónak és Prof. Dr. Matolcsy Andrásnak, hogy PhD tanulmányaimat a Semmelweis Egyetem I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet Molekuláris diagnosztika laboratóriumában végezhettem.

Köszönöm Prof. Herbert Riechelmannak, az innsbrucki Orvosi Egyetem Fül-Orr-Gége Klinika vezetőjének, és az Onkológia-Molekuláris Biológia laboratórium munkatársainak, hogy 1 éven keresztül lehetővé tették, hogy munkám jelentős részét intézetükben végezhessem el.

Szeretném megköszönni Dr. Jeney András professzornak, hogy a téma iránti lelkes érdeklődésével és támogatásával buzdított az utóbbi évek során. Külön köszönettel tartozom Dr. Paku Sándornak, aki nagy segítségemre volt az immunitokémiai és migrációs vizsgálatok kivitelezésénél.

Hálával tartozom közvetlen munkatársaimnak a munkámhoz nyújtott sok segítségért: Dr. Hollósi Péternek, Dr. Baghy Kornéliának, Dr. Péterfia Bálintnak, dr. Kiss Katalinnak, Papp Gergőnek, Dr. Füle Tibornak, Dr. Tátrai Péternek, Oláh Lászlónénak, Karászi Katalinnak, Csorba Gézőnének.

Köszönettel tartozom a Semmelweis Egyetem I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet minden dolgozójának, akik munkám elvégzéséhez segítő, baráti légkört teremtettek.

Végül hálás vagyok barátomnak, családomnak és jóbarátaimnak, akik kitarítottak mellettem és támogattak a Ph.D. munkával töltött évek alatt.

14. FÜGGELÉK

1. táblázat. A kísérletekhez használt ellenanyagok és hígításaik.

Elsődleges antitestek	Faj	Gyártó*	Cat. No.	Hígítás IHC/ IF	Hígítás WB/DB
JLA20 β -Actin	Egér IgM	Developmental Studies Hybridoma Bank	JLA20	-	1:100
β -Actin	Nyúl poliklonális IgG	Cell Signaling	4967	-	1:1000
Laminin	Nyúl poliklonális IgG	Dako	Z0097	1:200	-
Laminin α 1 (H-300)	Nyúl poliklonális IgG	Santa Cruz	sc-5582	-	1:200
Laminin β 1 (H-300)	Nyúl poliklonális IgG	Santa Cruz	sc-5583	1:50	1:200
Laminin 5	Nyúl poliklonális IgG	Abcam	Ab14509	1:100	-
Laminin-5 (P3E4)	Egér monoklonális IgG1	Santa Cruz	sc-13587	1:50	1:200
Fibronectin	Nyúl poliklonális IgG	Dako	A0245	1:100	-
Fibronectin (IST-9)	Egér monoklonális IgG1	Santa Cruz	sc-59826	1:40	1:500
Thrombospondin 1 (A6.1)	Egér monoklonális IgG1	Santa Cruz	sc-59887	-	1:250
Perlecan	Egér monoklonális IgG1	Zymed	13-4400	-	1:500
Collagen I	Nyúl poliklonális IgG	Abcam	ab34710	-	1:1000
Collagen III	Nyúl poliklonális IgG	Abcam	Ab7778	-	1:1000
Anti-Human Collagen IV	Egér monoklonális IgG1	DakoCytomation	M 0785	-	1:200
α -Smooth Muscle Actin	Egér monoklonális IgG2a	Sigma	A2547	-	1:1000
MMP-2	Nyúl poliklonális IgG	Cell Signaling	4022	-	1:1000
Anti-Human MMP-7	Egér monoklonális IgG _{1K}	Chemicon	MAB3315	-	1:500
MMP-9	Nyúl poliklonális IgG	Diagnostic BioSystems	RP 066	1:100	-
TIMP1 (D10E6)	Nyúl monoklonális IgG	Cell Signaling	8946	-	1:1000

Elsődleges antitestek	Faj	Gyártó*	Cat. No.	Hígítás IHC/ IF	Hígítás WB/DB
TIMP3 (D74B10)	Nyúl monoklonális IgG	Cell Signaling	5673	-	1:1000
Integrin α 4	Nyúl poliklonális IgG	Cell Signaling	4600	-	1:1000
Integrin α 5	Nyúl poliklonális IgG	Cell Signaling	4705	-	1:1000
Integrin α 6	Nyúl poliklonális IgG	Cell Signaling	3750	-	1:750
Integrin α V	Nyúl poliklonális IgG	Cell Signaling	4711	-	1:1000
Integrin β 1	Nyúl poliklonális IgG	Cell Signaling	4706	-	1:1000
Integrin β 3	Nyúl poliklonális IgG	Cell Signaling	4702	-	1:100
Integrin β 4	Nyúl poliklonális IgG	Cell Signaling	4707	-	1:1000
Integrin β 5	Nyúl poliklonális IgG	Cell Signaling	4708	1:100	-
CD44	Egér monoklonális IgG2a	Antibodies online	ABIN96695	1:100	1:500
CD151 (PETA-3)	Egér monoklonális IgG2b	Novocastra™ Leica Biosystems	NCL-CD151	1:50	-
Ets-1 (C-20)	Nyúl poliklonális IgG	Santa Cruz	sc-350	1:50	-
IL-1 beta	Nyúl poliklonális IgG	Thermo Scientific Pierce Products	PA1-28380	-	1:200
Másodlagos antitestek	Faj	Gyártó*	Cat. No.	Hígítás IHC/IF	Hígítás WB/DB
Anti-egér IgM/Biotinilált	Nyúl poliklonális	Jackson Immunoresearch	115-067-020	-	1:1000
Anti-egér Ig/HRP	Kecske poliklonális	DakoCytomation	P0447	-	1:2000
Anti-nyúl Ig/HRP	Kecske poliklonális	DakoCytomation	P0448	-	1:2000
Alexa Fluor® 647 anti-egér IgG (H+L)	Szamár poliklonális	Invitrogen	A31571	1:200	-
Alexa Fluor® 488 anti-egér IgG (H+L)	Szamár poliklonális	Invitrogen	A21202	1:200	-
Alexa Fluor® 647 anti-nyúl IgG (H+L)	Kecske poliklonális	Invitrogen	A21244	1:200	-
Alexa Fluor® 568 anti-nyúl IgG (H+L)	Kecske poliklonális	Invitrogene	A11011	1:200	-
* Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa city, Iowa, USA; Cell Signaling Technology, Danvers, MA; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA; Zymed Laboratories Inc., South San Francisco, CA, USA; Abcam plc, Cambridge, UK; Chemicon International Inc., Temecula, CA, USA; Diagnostic BioSystems, Pleasanton, CA, USA; Antibodies-online Inc., Atlanta, GA, USA; Leica Biosystems Newcastle Ltd, Newcastle, UK; Thermo Scientific Pierce Biotechnology, Rockford, USA; Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., London, UK; Invitrogen by Life Technologies, Carlsbad, California, USA;					

2. táblázat. Vizsgált primerek szekvencia listája.

Primerpár neve	Primer szekvencia (5'- 3' orientáció) F: forward primer, R: reverse primer	Méret (bp)	Hő (°C)	NCBI referencia szekvencia
<i>ACTB</i>	F: CTACGTCGCCCTGGACTTCGAGC R: GATGGAGCCGCCGATCCACACGG	385	60	NM_001101.3
<i>FN</i>	F: GGTGACACTTATGAGCGTCCTAAA R: AACATGTAACCACCAGTCTCATGTG	170	61	NM_11092
<i>THBS1</i>	F: TGCTCCAATGCCACAGTTCC R: CTGCTGAATTCCATTGCCACA	132	57	NM_003246.2
<i>TNC</i>	F: TGCCATTACAGGAGGTACA R: CACTTTCCTCAAAGCCCTTC	132	57	NM_002160.2
<i>MMP-1</i>	F: GGGAGATCATCGGGACAACCTC R: GGGCCTGGTTGAAAAGCAT	72	60	NM_001145938.1
<i>MMP-2</i>	F: TGATCTTGACCAGAATACCATCGA R: GGCTTGCGAGGGAAGAAGTT	90	60	NM_001127891.1
<i>MMP-3</i>	F: TGGCATTCACTCCCTCTATGG R: AGGACAAAGCAGGATCACAGTT	116	60	NM_002422.3
<i>MMP-7</i>	F: GTGGTCACCTACAGGATCGTA R: CTGAAGTTTCTATTTCTTTCTTGA	492	60	NM_002423.3
<i>MMP-9</i>	F: GTGCTGGGCTGCTGCTTTGCTG R: GTCGCCCTCAAAGGTTTGAAT	303	60	NM_004994.2
<i>MMP-13</i>	F: AGTGGTAAGAATAGTAGATGTG R: GGCCGATCATATATTCAATAAGT	553	54	NM_002427.3
<i>MT1-MMP</i>	F: CGCTACGCCATCCAGGGTCTCAAA R: CGGTCATCATCGGGCAGCACAAAA	497	55	NM_004995.2
<i>TIMP-1</i>	F: CTTCTGGCATCCTGTTGTTG R: AGAAGGCCGTCTGTGGGT	84	60	NM_003254.2
<i>TIMP-2</i>	F: GCGGTCAGTGAGAAGGAAGTGG R: GGAGATGTAGCACGGGATCATGG	357	60	NM_003255.4
<i>TIMP-3</i>	F: CCAGGACGCCTTCTGCAAC R: CCTCCTTTACCAGCTTCTTCCC	71	60	NM_000362.4
<i>ITGA1</i>	F: CCAAACATGTCTTCCACCG R: CTGCTGCTGGCTCCTCAC	102	60	NM_181501.1
<i>ITGA3</i>	F: GGCCTGCCAAGCTAATGAGA R: GAGCAGCTCCATCCTCTGGTT	76	59	NM_002204.2
<i>ITGA4</i>	F: TGGCTGTCTGGAAAAGTGTGA R: AGACGTGCGAACAGCTCC	110	57	NM_000885.4
<i>ITGA5</i>	F: TGCCTCCCTCACCATCTTC R: TGCTTCTGCCAGTCCAGC	171	58	NM_002205.2
<i>ITGA6</i>	F: GCTGGTTATAATCCTTCAATATCAATTGT R: TTGGGCTCAGAACCTTGGTTT	113	60	NM_000210.2
<i>ITGAV</i>	F: TCCAAACCACTGATGGGACT R: GTGACTGGTCTTCTACCCGC	110	60	NM_002210
<i>ITGB1</i>	F: CAAAGGAACAGCAGAGAAGC R: ATTGAGTAAGACAGGTCCATAAGG	168	57	NM_033668.2

Primerpár neve	Primer szekvencia (5' - 3' orientáció) F: forward primer, R: reverse primer	Méret (bp)	Hő (°C)	NCBI referencia szekvencia
<i>ITGB3</i>	F: TCATCAGAGCACCAGGCA R: TCTGGGCGACTGTGCTG	136	56	NM_000212.2
<i>ITGB5</i>	F: TGTAACCTGCATGGCACTTG R: CCTTTCTGTGAGTGCGACAA	106	57	NM_002213.3
<i>ITGB6</i>	F: CTGGAGAATGTTCCGGAGT R: TCGCTGTAACCCAAGAACAA	104	60	NM_000888.3
<i>TGF-β1</i>	F: GAGCCCTGGACACCAACTAT R: GACCTTGCTGTACTIONGCGTGT	326	60	NM_000660.4
<i>TGFBR1</i>	F: GAGCCCATCTGTACACAAAGT R: GCTGCTCCTCCTCGTGCT	127	60	NM_004612.2
<i>TGFBR2</i>	F: GGAAACTTGACTGCACCGTT R: CTGCACATCGTCCTGTGG	110	60	NM_003242
<i>LTBP-1</i>	F: GGCAGCTAAAGACCAGTGTGAA R: TTCCTGCACTGCCCATGA	75	56	NM_10108
<i>TIEG</i>	F: CTCTGCAGTTTTGTTCCAGG R: GTGCCTCTCTCCAGCAGACT	92	60	NM_005655
<i>CD44</i>	F: TGCCGCTTTGCAGGTGTAT R: GGCTCCGTCCGAGAGA	66	49	NM_001202557.1
<i>IL-1β</i>	F: CAAGGGCTTCAGGCAGGCCG R: TGAGTCCCGGAGCGTGCAGT	214	60	NM_000576.2
<i>IL-1βR</i>	F: TTTAAGCAGAACTACCCGTTGCAG R: TCACGATGAGCCTATCTTTGACTCC	169	60	NM_000877.2

3. táblázat. Beteg adatok a TMA vizsgálathoz.

Beteg	Életkor	FIGO stádium	Szövettan	HPV státusz
1	37	II/A	Adenosquamous carcinoma	-
2	51	I/B	Squamous cell carcinoma	-
3	42	II/A	Squamous cell carcinoma	-
4	48	II/B	Squamous cell carcinoma	HPV18
5	39	II/B	Squamous cell carcinoma	HPV 16, 18
6	41	II/A	Squamous cell carcinoma	HPV16
7	38	II/B	Squamous cell carcinoma	HPV16
8	59	II/B	Squamous cell carcinoma	HPV16
9	39	II/B	Squamous cell carcinoma	HPV16
10	39	I/B	Squamous cell carcinoma	HPV16
11	71	II/A	Clear cell carcinoma	HPV16
12	51	II/A	Squamous cell carcinoma	HPV16
13	44	II/B	Squamous cell carcinoma	HPV16
14	42	II/A	Squamous cell carcinoma	HPV16
15	45	II/B	Squamous cell carcinoma	HPV16
16	32	I/B	Squamous cell carcinoma	HPV16
17	55	II/B	Squamous cell carcinoma	-
18	56	II/B	Squamous cell carcinoma	HPV16
19	57	II/B	Squamous cell carcinoma	HPV16
20	44	II/B	Squamous cell carcinoma	HPV16
21	35	I/B	Squamous cell carcinoma	HPV16
22	66	II/B	Squamous cell carcinoma	HPV16
23	57	II/A	Squamous cell carcinoma	HPV16
24	38	II/B	Squamous cell carcinoma	HPV16
25	40	II/B	Squamous cell carcinoma	HPV16
26	52	II/B	Squamous cell carcinoma	HPV16
27	62	II/B	Squamous cell carcinoma	HPV16
28	57	II/B	Squamous cell carcinoma	HPV16
29	54	II/B	Squamous cell carcinoma	HPV16

4. táblázat *ACTB*-ra normalizált mRNA expressziós eredmények.

Gének	Norm. exp. NF	Norm. exp. NF/CSCC7	Norm. exp. TF	Norm. exp. TF/CSCC7
<i>CD44</i>	$6.63 \times 10^{-2} \pm 1.17 \times 10^{-2}$	$5.83 \times 10^{-2} \pm 6.41 \times 10^{-3}$	$6.64 \times 10^{-2} \pm 8.71 \times 10^{-3}$	$4.60 \times 10^{-2} \pm 6.42 \times 10^{-3}$
<i>FN1</i>	$4.02 \times 10^{-1} \pm 5.15 \times 10^{-2}$	$5.05 \times 10^{-1} \pm 3.04 \times 10^{-2}$	$2.42 \times 10^{-1} \pm 3.78 \times 10^{-2}$	$2.58 \times 10^{-1} \pm 2.42 \times 10^{-2}$
<i>ITGA3</i>	$9.85 \times 10^{-2} \pm 9.41 \times 10^{-3}$	$8.42 \times 10^{-2} \pm 1.48 \times 10^{-2}$	$5.24 \times 10^{-2} \pm 1.40 \times 10^{-2}$	$4.05 \times 10^{-2} \pm 5.10 \times 10^{-3}$
<i>ITGA4</i>	$2.35 \times 10^{-2} \pm 6.23 \times 10^{-3}$	$1.84 \times 10^{-2} \pm 3.91 \times 10^{-3}$	$2.87 \times 10^{-2} \pm 6.44 \times 10^{-3}$	$2.16 \times 10^{-2} \pm 3.62 \times 10^{-3}$
<i>ITGA5</i>	$3.42 \times 10^{-2} \pm 2.80 \times 10^{-3}$	$4.20 \times 10^{-2} \pm 3.42 \times 10^{-3}$	$2.78 \times 10^{-2} \pm 2.31 \times 10^{-3}$	$2.84 \times 10^{-2} \pm 3.22 \times 10^{-3}$
<i>ITGB1</i>	$6.02 \times 10^{-1} \pm 8.53 \times 10^{-2}$	$6.52 \times 10^{-1} \pm 4.81 \times 10^{-2}$	$8.16 \times 10^{-1} \pm 5.51 \times 10^{-2}$	$6.05 \times 10^{-1} \pm 5.15 \times 10^{-2}$
<i>ITGB3</i>	$2.62 \times 10^{-3} \pm 0.31 \times 10^{-3}$	$4.00 \times 10^{-3} \pm 0.33 \times 10^{-3}$	$3.50 \times 10^{-3} \pm 0.21 \times 10^{-3}$	$3.71 \times 10^{-3} \pm 0.11 \times 10^{-3}$
<i>ITGB5</i>	$2.59 \times 10^{-2} \pm 4.71 \times 10^{-3}$	$3.42 \times 10^{-2} \pm 1.00 \times 10^{-2}$	$2.88 \times 10^{-2} \pm 3.70 \times 10^{-3}$	$3.07 \times 10^{-2} \pm 2.91 \times 10^{-3}$
<i>MMP1</i>	$1.56 \times 10^{-1} \pm 1.12 \times 10^{-2}$	$6.47 \times 10^{-2} \pm 2.24 \times 10^{-2}$	$1.35 \times 10^{-1} \pm 1.83 \times 10^{-2}$	$5.30 \times 10^{-2} \pm 1.80 \times 10^{-2}$
<i>MMP2</i>	$1.86 \times 10^{-1} \pm 1.16 \times 10^{-2}$	$2.51 \times 10^{-1} \pm 1.37 \times 10^{-2}$	$1.67 \times 10^{-1} \pm 1.61 \times 10^{-2}$	$1.68 \times 10^{-1} \pm 6.63 \times 10^{-3}$
<i>MMP3</i>	$6.62 \times 10^{-2} \pm 1.28 \times 10^{-2}$	$4.92 \times 10^{-2} \pm 1.24 \times 10^{-2}$	$3.81 \times 10^{-2} \pm 4.44 \times 10^{-3}$	$3.97 \times 10^{-2} \pm 6.10 \times 10^{-3}$
<i>MMP14</i>	$4.11 \times 10^{-3} \pm 0.80 \times 10^{-3}$	$6.12 \times 10^{-3} \pm 0.83 \times 10^{-3}$	$0.42 \times 10^{-3} \pm 0.10 \times 10^{-3}$	$0.31 \times 10^{-3} \pm 0.311 \times 10^{-3}$
<i>TGFB1</i>	$2.17 \times 10^{-1} \pm 2.65 \times 10^{-2}$	$2.27 \times 10^{-1} \pm 2.50 \times 10^{-2}$	$1.78 \times 10^{-1} \pm 5.81 \times 10^{-3}$	$1.65 \times 10^{-1} \pm 1.41 \times 10^{-2}$
<i>THBS1</i>	$2.38 \times 10^{-1} \pm 4.99 \times 10^{-2}$	$4.55 \times 10^{-1} \pm 6.48 \times 10^{-2}$	$7.23 \times 10^{-1} \pm 6.45 \times 10^{-2}$	$8.78 \times 10^{-1} \pm 5.19 \times 10^{-2}$
<i>TIMP1</i>	$4.25 \times 10^{-1} \pm 7.89 \times 10^{-2}$	$4.89 \times 10^{-1} \pm 8.35 \times 10^{-2}$	$4.16 \times 10^{-1} \pm 6.67 \times 10^{-2}$	$2.42 \times 10^{-1} \pm 2.88 \times 10^{-2}$
<i>TIMP2</i>	$1.69 \times 10^{-1} \pm 2.23 \times 10^{-2}$	$1.86 \times 10^{-1} \pm 1.23 \times 10^{-2}$	$1.92 \times 10^{-1} \pm 1.04 \times 10^{-2}$	$2.12 \times 10^{-1} \pm 4.81 \times 10^{-3}$
<i>TIMP3</i>	$1.69 \times 10^{-1} \pm 2.23 \times 10^{-2}$	$1.69 \times 10^{-1} \pm 2.23 \times 10^{-2}$	$7.32 \times 10^{-3} \pm 0.30 \times 10^{-3}$	$5.62 \times 10^{-3} \pm 0.54 \times 10^{-3}$
<i>TNC</i>	$1.43 \times 10^{-2} \pm 1.91 \times 10^{-3}$	$1.08 \times 10^{-2} \pm 1.93 \times 10^{-3}$	$4.71 \times 10^{-3} \pm 1.63 \times 10^{-3}$	$4.50 \times 10^{-3} \pm 1.22 \times 10^{-3}$
Gének	Norm. exp. CSCC7	Norm. exp. NF/CSCC7	Norm. exp. TF/CSCC7	
<i>CD44</i>	$2.10 \times 10^{-2} \pm 1.51 \times 10^{-3}$	$2.43 \times 10^{-2} \pm 3.32 \times 10^{-3}$	$2.05 \times 10^{-2} \pm 1.53 \times 10^{-3}$	
<i>ITGA3</i>	$4.04 \times 10^{-1} \pm 7.39 \times 10^{-2}$	$1.82 \pm 6.06 \times 10^{-1}$	$2.57 \pm 8.77 \times 10^{-1}$	
<i>ITGA6</i>	$2.35 \times 10^{-1} \pm 3.00 \times 10^{-2}$	$4.37 \times 10^{-1} \pm 4.86 \times 10^{-2}$	$3.30 \times 10^{-1} \pm 1.52 \times 10^{-2}$	
<i>ITGB1</i>	$2.57 \times 10^{-1} \pm 1.94 \times 10^{-2}$	$2.80 \times 10^{-1} \pm 2.00 \times 10^{-2}$	$3.20 \times 10^{-1} \pm 2.39 \times 10^{-2}$	
<i>ITGB3</i>	$2.11 \times 10^{-3} \pm 0.30 \times 10^{-3}$	$2.72 \times 10^{-3} \pm 0.44 \times 10^{-3}$	$2.00 \times 10^{-3} \pm 0.21 \times 10^{-3}$	
<i>ITGB5</i>	$1.59 \times 10^{-2} \pm 1.51 \times 10^{-3}$	$2.24 \times 10^{-2} \pm 3.51 \times 10^{-3}$	$2.27 \times 10^{-2} \pm 3.80 \times 10^{-3}$	
<i>MMP7</i>	$0.22 \times 10^{-3} \pm 0.01 \times 10^{-3}$	$2.02 \times 10^{-3} \pm 0.21 \times 10^{-3}$	$0.61 \times 10^{-3} \pm 0.23 \times 10^{-3}$	
<i>TGFB1</i>	$5.30 \times 10^{-1} \pm 2.81 \times 10^{-2}$	$5.32 \times 10^{-1} \pm 4.52 \times 10^{-2}$	$4.69 \times 10^{-1} \pm 3.28 \times 10^{-2}$	
<i>THBS1</i>	$9.51 \times 10^{-3} \pm 0.60 \times 10^{-3}$	$1.13 \times 10^{-2} \pm 0.72 \times 10^{-3}$	$9.83 \times 10^{-3} \pm 0.80 \times 10^{-3}$	
<i>TIMP1</i>	$1.04 \times 10^{-1} \pm 9.32 \times 10^{-3}$	$1.28 \times 10^{-1} \pm 1.40 \times 10^{-2}$	$1.11 \times 10^{-1} \pm 6.62 \times 10^{-3}$	
<i>TIMP2</i>	$1.37 \times 10^{-2} \pm 1.51 \times 10^{-3}$	$2.33 \times 10^{-2} \pm 4.13 \times 10^{-3}$	$1.88 \times 10^{-2} \pm 2.22 \times 10^{-3}$	