

Az epidermális növekedési faktor receptor jelút és connexin 43 kommunikációs csatornák szerepe az óriássejtes csonttumor progressziójában

Doktori értekezés

Balla Péter

Semmelweis Egyetem
Patológiai Tudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Krenács Tibor, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Hivatalos bírálók: Dr. Tóth Erika, Ph.D., megbízott osztályvezető főorvos
Dr. Lotz Gábor, Ph.D., egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Sótonyi Péter, professzor emeritus,
MTA rendes tagja

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Réz Gábor, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Glasz Tibor, Ph.D., egyetemi docens

Budapest
2016

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	4
1. BEVEZETÉS.....	10
1.1. A GCTB klinikopatológiai jellemzői.....	10
1.2. A GCTB sejtes összetétele.....	11
1.3. Oszteoklaszt típusú óriássejtek keletkezése GCTB-ben.....	12
1.3.1. Az oszteoklasztogenezis kanonikus szabályozása	12
1.3.2. Nem-kanonikus oszteoklaszt képződés.....	13
1.4. A GCTB citogenetikai jellemzői	14
1.5. Patogenetikai faktorok	14
1.6. GCTB kezelésének lehetőségei.....	15
1.7. Epidermális növekedési faktor receptorcsalád (ErbB)	16
1.7.1. Az EGFR felépítése és működése	17
1.7.2. Az EGFR család ligandjai	18
1.7.3. EGFR által aktivált jelutak.....	19
1.7.3.1. MAPK (Ras/Raf/MEK/ERK) jelút.....	20
1.7.3.2. PI3-K/Akt jelút	20
1.7.3.3. PLC γ jelút.....	21
1.7.3.4. JAK/STAT jelút.....	22
1.7.4. EGFR jelút szerepe a csontszövetben	22
1.8. „Gap junction” (réskapcsolat) a sejtek között.....	23
1.8.1. A Cx43 fehérje szerkezete	24
1.8.2. A connexin csatornák felépítése.....	25
1.8.3. A Cx43 foszforilációs szabályozása.....	27
1.8.4. Cx43 szerepe a csontszövetben	28
2. CÉLKITŰZÉSEK.....	31
3. ANYAG ÉS MÓDSZER.....	32
3.1. Beteganyag.....	32
3.2. Szöveti multiblokkok (TMA) készítése	35
3.3. Immunhisztokémia és immuncitokémia	35
3.3.1. Immunhisztokémia TMA metszeteken	35
3.3.2. Immuncitokémia sejttenyészeteken	38
3.4. Sejttenyésztés.....	38

3.4.1. Sejttenyészetek előállítás és fenntartása	38
3.4.2. Perifériás vér mononukleáris sejtek (PBMC) szeparálása és oszteoklaszt differenciációs képesség <i>in vitro</i> vizsgálata	39
3.4.3. GCTB stromasejt proliferáció <i>in vitro</i> vizsgálata és a sejtviabilitás meghatározása	40
3.4.4. GCTB stromasejt differenciációs képesség <i>in vitro</i> vizsgálata	41
3.5. Fluoreszcens in situ hibridizáció (FISH)	41
3.5.1. FISH TMA metszeteken	41
3.5.2. FISH sejttenyészeteken	43
3.6. Nukleinsav izolálás	43
3.6.1. Teljes RNS izolálás	43
3.6.2. DNS izolálás.....	44
3.6.3. RNS és DNS koncentrációmérés	45
3.7. EGFR tirozin-kináz domén mutáció vizsgálata	45
3.7.1. Polimeráz láncreakció (PCR).....	45
3.7.2. Mutáció-dúsító PCR.....	47
3.7.3. A PCR termékek elválasztása, detektálása és tisztítása	48
3.7.4. Szekvenálás	49
3.8. Génexpresszió vizsgálat.....	50
3.8.1. Reverz transzkripció (RT).....	50
3.8.2. Valós idejű kvantitatív polimeráz láncreakció (RT-qPCR)	51
3.9. Fehérje izolálás és foszfatáz kezelés.....	52
3.10. Western Blot	53
3.11. Áramlási „flow” citometria.....	54
3.12. Digitális mikroszkópia, értékelés és képanalízis	55
3.13. Statisztikai értékelés.....	56
4. EREDMÉNYEK.....	58
4.1. EGFR szerepe óriássejtes csonttumorban.....	58
4.1.1. EGFR expressziója óriássejtes csonttumorban	58
4.1.2. Az EGFR expresszió klinikopatológiai korrelációja.....	61
4.1.3. Az EGFR fehérjét expresszáló sejtípus meghatározása	61
4.1.4. EGFR gén státusz meghatározása	62
4.1.5. Az EGFR gén tirozin-kináz domén 19-es és 21-es exonok mutáció vizsgálata	63

4.1.6. Az EGFR ligandok jelenlétének igazolása.....	64
4.1.7. Az EGFR expresszió és a TRAP-pozitív oszteoklasztok viszonya.....	65
4.1.8. EGF-kezelés hatása az oszteoklasztogenezisre	67
4.1.9. Az EGF-kezelés hatása a GCTB stromasejtek proliferációjára és differenciálódására	69
4.2. Cx43 expresszió és sejt-kommunikációs csatornák GCTB-ben	70
4.2.1. Cx43 kifejeződés klinikopatológiai korrelációja	70
4.2.2. A GCTB stromasejtek neoplasztikus természetének igazolása FISH módszerrel	74
4.2.3. Connexin43 fehérje expresszió GCTB stromasejtekben.....	75
4.2.4. Cx43, RANKL és OPG mRNS expresszió GCTB stromasejtekben.....	77
4.2.5. Cx43 foszforiláció vizsgálata GCTB stromasejtekben Western blot módszerrel	78
4.2.6. A Cx43 kommunikációs csatornák funkcionális vizsgálata áramlási citometriával.....	79
5. MEGBESZÉLÉS	81
5.1. EGFR szerepe GCTB-ben	81
5.2. Cx43 direkt sejt-sejt kommunikáció prognosztikus jelentősége a GCTB-ben	83
6. AZ ÉRTEKEZÉS EREDETI MEGFIGYELÉSEI	87
7. ÖSSZEFOGLALÓ	88
8. SUMMARY	89
9. IRODALOMJEGYZÉK	90
10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE	111
10.1. Az értekezés témájában megjelent közlemények	111
10.2. Az értekezés témájától eltérő témában megjelent közlemények	111
11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	113

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

1,25 (OH)₂ vitamin D3	1,25-dihidroxi-D3-vitamin – <i>1,25-dihydroxyvitamin D3</i>
ADAM	az integrin kapcsolatot gátló és metalloproteáz doménnel rendelkező enzimcsalád – <i>a disintegrin and metalloprotease</i>
ALP	alkalikus foszfatáz – <i>alkaline phosphatase</i>
AML	akut mieloid leukémia – <i>acute myeloid leukaemia</i>
AR	amfiregulin – <i>amphiregulin</i>
BMSC	csontvelői eredetű mezenhimális őssejt – <i>bone marrow mesenchymal stem cell</i>
BMSC	csontvelő eredetű mezenhimális őssejt – <i>bone marrow-derived mesenchymal stem cell</i>
BSA	marha szérum albumin – <i>bovine serum albumin</i>
BTC	betacellulín
cAMP	ciklikus adenzin monofoszfát – <i>cyclic adenosine monophosphate</i>
Cdc2	ciklin-dependens kináz 2 – <i>cyclin-dependent kinase 2</i>
CDK	ciklin-dependens kináz – <i>cyclin-dependent kinase</i>
c-fms	kolónia stimuláló faktor 1 receptor – <i>colony-stimulating factor-1 receptor</i>
CK1	kazein-kináz 1 – <i>casein kinase 1</i>
C_T	küszöbérték ciklus – <i>threshold cycle</i>
CTR	kalcitonin-receptor – <i>calcitonin receptor</i>
Cx	connexin
DAB	3,3'-diaminobenzidin – <i>3,3' diaminobenzidine</i>
DAG	1,2-diacil-glicerol – <i>1,2-diacyl-glycerol</i>
DAPI	4',6-diamidino-fenilindol – <i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>

DCN	dekorin – <i>decorin</i>
DC-STAMP	dendritikus-sejt-specifikus transzmembrán fehérje – <i>dendritic cell-specific transmembrane protein</i>
Dil	1,1'-dioktadecil-3,3,3'-tetra-metilin-dodikarbocianin – <i>1,1'-dioctadecyl-3,3,3'-tetra-methylin-dodicarbocyanine</i>
DNS	dezoxiribonukleinsav – <i>deoxyribonucleic acid</i>
EGF	epidermális növekedési faktor – <i>epidermal growth factor</i>
EGFR	epidermális növekedési faktor receptor – <i>epidermal growth factor receptor</i>
EPR	epiregulin
ER	endoplazmatikus retikulum – <i>endoplasmatic reticulum</i>
ErbB	epidermális növekedési faktor receptorcsalád – <i>epidermal growth factor receptor family</i>
FBS	magzati szarvasmarha savó – <i>fetal bovine serum</i>
FGF2	fibroblaszt növekedési factor 2 – <i>fibroblast growth factor 2</i>
Gab1	Grb2-asszociált kötőfehérje 1 – <i>Grb2 associated binder 1</i>
GCTB	óriássejtes csonttumor – <i>giant cell tumor of bone</i>
GDP	guanozin difoszfát – <i>guanosine diphosphate</i>
GEF	guanin nukleotid cserélő faktor – <i>guanine nucleotide exchange factor</i>
GJ	réskapcsolat – <i>gap junction</i>
Grb2	növekedési faktor receptor kötő fehérje 2 – <i>growth factor receptor-bound protein 2</i>
GSK-3β	glikogén szintáz kináz-3 béta – <i>glycogen synthase kinase-3 beta</i>
GTP	guanozin trifoszfát – <i>guanosine triphosphate</i>
H₂O₂	hidrogén-peroxid – <i>hydrogen peroxide</i>

HB-EGF	heparint kötő EGF-szerű növekedési faktor – <i>heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor</i>
HDFa	felnőtt humán dermális fibroblaszt – <i>Human Dermal Fibroblasts-Adult</i>
HGF	hepatocita növekedési faktor – <i>hepatocyte growth factor</i>
HIF	hipoxia indukálta faktor – <i>hypoxia inducible factor</i>
HRP	torma-peroxidáz – <i>horseradish peroxidase</i>
HSC	hematopoetikus őssejt – <i>hematopoietic stem cell</i>
hTERT	humán telomer reverz transzkriptáz – <i>human telomerase reverse transcriptase</i>
IL	interleukin
IP3	inozitol 1,2,3-trifoszfát – <i>inositol 1,4,5-trisphosphate</i>
JAK	Janus kináz – <i>Janus kinase</i>
JNK	c-Jun NH ₂ -terminális protein kináz – <i>c-Jun N-terminal kinase</i>
kalcein AM	kalcein acetoximetil-észter – <i>calcein acetoxymethyl ester</i>
LOH	heterozigóta állapot elvesztése – <i>loss of heterozygosity</i>
LUM	lumikán – <i>lumican</i>
MAPK	mitogén-aktivált protein kináz – <i>mitogen-activated protein kinases</i>
MAPKK	MAP-kináz-kináz – <i>MAP kinase-kinase</i>
MAPKKK	MAP-kináz-kináz-kináz – <i>MAP kinase-kinase-kinase</i>
MCP-1	monocita kemoattraktáns protein-1 – <i>monocyte chemoattractant protein-1</i>
M-CSF	makrofág kolónia-stimuláló faktor – <i>macrophage colony-stimulating factor</i>
MMP	mátrix metalloproteináz – <i>matrix metalloproteinase</i>
mRNA	hírvivő ribonukleinsav – <i>messenger ribonucleic acid</i>

MSC	mezenhimális őssejt – <i>mesenchymal stem cell</i>
NRG	neuregulin
NSCLC	nem-kissejtes tüdőrák – <i>non-small cell lung cancer</i>
OCL	oszteokalcin – <i>osteocalcin</i>
ODDD	okulodentodigitális diszplázia – <i>oculodentodigital dysplasia</i>
OPG	oszteoprotegerin – <i>osteoprotegerin</i>
OPN	oszteopontin – <i>osteopontin</i>
Osx	oszterix – <i>osterix</i>
PAI-1	urokináz típusú plazminogén aktivátor inhibitor 1 – <i>urokinase-type plasminogen activator inhibitor 1</i>
PBMC	perifériás vér mononukleáris sejt – <i>peripheral blood mononuclear cell</i>
PBS	foszfát-pufferelt sóoldat – <i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	polimeráz láncreakció – <i>polymerase chain reaction</i>
PDK-1	foszfatidil inozitol dependens kináz-1 – <i>phosphoinositide-dependent protein kinase</i>
PFS	progressziómentes túlélés – <i>progression-free survival</i>
PGE2	prostaglandin E2 – <i>prostaglandin E2</i>
PH	pleksztrin homológ – <i>pleckstrin homology</i>
PI3-K	foszfatidil inozitol 3-kináz – <i>phosphatidylinositol 3-kinase</i>
PIP2	foszfatidil-inozitol 4,5-bifoszfátot – <i>phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate</i>
PIP3	foszfatidil-inozitol 3,4,5-trifoszfáttá – <i>phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate</i>
PKA	protein-kináz A – <i>protein kinase A</i>
PKC	protein-kináz C – <i>protein kinase C</i>

PLCγ	foszfolipáz C gamma – <i>phospholipase C gamma</i>
PMMA	polimetil-metakrilát – <i>polymethyl methacrylate</i>
PTEN	foszfatáz- és tenzin-homológ – <i>phosphatase and tensin homolog</i>
PTH	paratireoid hormon – <i>parathyroid hormone</i>
RANKL	nukleáris faktor kappa-B-receptor-aktivátor ligand – <i>receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand</i>
RNS	ribonukleinsav – <i>ribonucleic acid</i>
RT	reverz transzkripció – <i>reverse transcription</i>
RTK	receptor tirozin kináz – <i>receptor tyrosine kinase</i>
RT-qPCR	Kvantitatív valós-idejű polimeráz láncreakció – <i>quantitative real time polymerase chain reaction</i>
S	szerin – <i>serine</i>
SD	szórás – <i>standard deviation</i>
SDF-1	stroma eredetű faktor-1 – <i>stromal cell-derived factor-1</i>
SDS	nátrium-dodecil-szulfát – <i>sodium dodecyl sulfate</i>
SH	Src homológ – <i>Src homology</i>
SOS	son of sevenless guanine nucleotide-exchange factor
SSC	nátrium-citrát puffer – <i>saline-sodium citrate</i>
STAT	szignál transzducer és transzkripció aktivátor – <i>signal transducer and activator of transcription</i>
T	treonin – <i>threonine</i>
TAS	telomer asszociáció – <i>telomeric associations</i>
TBS	Tris-pufferelt sóoldat – <i>Tris-buffered saline</i>
TE	Tris-EDTA

TGFα	transzformáló növekedési faktor alfa – <i>transforming growth factor alpha</i>
TMA	szöveti multiblokk – <i>tissue microarray</i>
TN-C	tenaszcin-C – <i>tenascin-C</i>
TRAP	tartarát-rezisztens savanyú foszfatáz – <i>tartrate-resistant acid phosphatase</i>
u-PA	urokináz típusú plazminogén aktivátor – <i>urokinase-type plasminogen activator</i>
u-PAR	urokináz típusú plazminogén aktivátor receptor – <i>urokinase-type plasminogen activator receptor</i>
VEGF	vaszkuláris endoteliális növekedési faktor – <i>vascular endothelial growth factor</i>
VNR	vitronektin receptor – <i>vitronectin receptor</i>
WHO	Egészségügyi Világszervezet – <i>World Health Organisation,</i>
Y	tirozin – <i>tyrosine</i>
ZO	zonula okkludens – <i>zonula occludens</i>
α-MEM	alfa-minimum esszenciális tápoldat – <i>alpha-minimum essential medium</i>
α-SMA	alfa-simaizom aktin – <i>alpha-smooth muscle actin</i>

1. BEVEZETÉS

1.1. A GCTB klinikopatológiai jellemzői

Az óriássejtes csonttumor (GCTB), az Egészségügyi Világszervezet (WHO) osztályozása szerint intermedier malignitású, helyileg agresszív növekedésű oszteolítikus daganat. A benignus csonttumороk mintegy 20%-át, a primer csonttumороk 5%-át teszi ki [1]. Ismeretlen okok miatt a GCTB-k előfordulása magasabb a Távol-Keleten, Kínában és Dél-Indiában, ahol a primer csonttumороk ~20%-át teszi ki [2]. Az esetek 70%-a 20-40 éves korban alakul ki és enyhe női nem predominanciát (1,5:1) mutat [3].

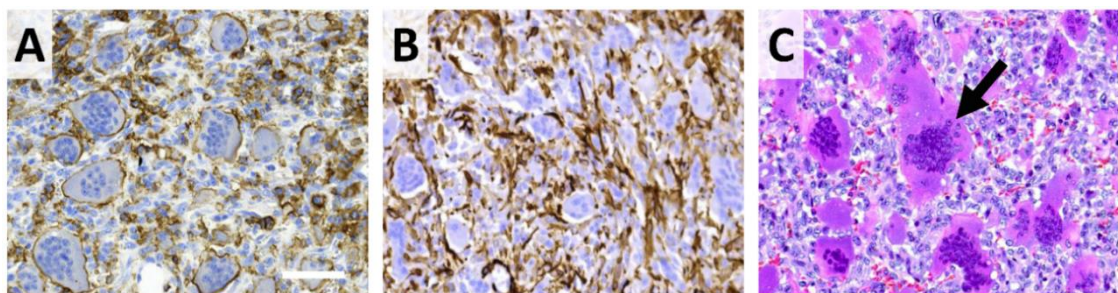
A GCTB leggyakrabban a hosszú csöves csontok epifizeális régiójában alakul ki és a femur disztális, a tibia proximális, a rádusz disztális, a humerusz proximális végét és a szakrumot érinti [4], de éretlen csontozatú fiatal betegekben a metafízis régióban is kialakulhat [5]. Az esetek közel 50%-ában a térd környékéről indul ki [6]. A daganat a gerincen is megjelenhet, a csigolyatesteket érintve [7]. Ritkán, de a lapos csontokban, például a szkapulában, a szternumban és a patellában is előfordulhat [8].

Irodalmi adatok alapján a GCTB az esetek 80%-ában benignus lefolyású, 12-27%-ban lokálisan kiújulhat (recidivál), kevesebb mint 1%-ban hajlamos malignus transzformációra, míg 1-4%-ban jóindulatú szövettani kép mellett áttétet ad a tüdőbe [9]. A daganatot először 1818-ban Cooper és Travers írták le [10]. Az óriássejtes tumor elnevezést 1912-ben Bloodgood alkotta meg, majd 1940-ben Jaffe és munkatársai definiálták önálló klinikai, radiológiai és patológiai jellemzők alapján és különítették el a többi, óriássejtet tartalmazó daganattól [11,12]. A stromális sejtek fokozott megjelenése alapján Jaffe és munkatársai benignus, agresszív és malignus, míg Dahlin csupán benignus és malignus csoportokat különített el. Enneking és Campanacci hasonló osztályozási rendszert dolgoztak ki a daganat klinikai, radiológiai és szövettani tulajdonságai alapján. A Campanacci-féle, radiológiai megjelenés alapján meghatározott szövettani grádusok (Grade 1, 2, 3) megegyeznek az Enneking-féle sebészi stádiumokkal (Stage 1, 2, 3), amelyek alapján az óriássejtes csonttumороk látens, aktív és agresszív csoportokba sorolhatóak. A látens stádium rendszerint nem okoz klinikai tünetet és a csont kortikális régióját nem érinti. Az aktív stádiumban a csont kortikális régiója elvékonyodik, ami a csont deformációját okozhatja. Az agresszív stádium esetén a tumor

a csont kortikális régióját áttöri és a lágyrészekbe is beterjed. A GCTB esetek csak 10-15%-a sorolható a látens stádiumba [3].

1.2. A GCTB sejtes összetétele

Az óriássejtes csonttumor egy heterogén tumor, amelyet három fő sejtípus alkot (1. ábra A-C). A mononukleáris sejtek lehetnek CD68- és CD163-pozitív ovális monociták/makrofágok vagy CD68-negatív, orsó alakú, neoplasztikusnak tartott stromasejtek, amelyek a daganat proliferatív komponensét alkotják [13,14]. A GCTB stromasejtek az alkalikus foszfatáz (ALP) enzim, csont oszteopontin (OPN), I-es típusú kollagén, oszteokalcin (OCL), Runx2 és oszterix (Osx) transzkripciós faktorok alapján oszteoblaszt fenotípust mutatnak [15,16]. Ezen kívül a stromasejtek a CD73, CD105 és CD166 mezenhimális őssejt (MSC)-specifikus markereket is kifejezik [17]. Gyakran a stromasejtek miofibroblaszt jelleget vesznek fel és alfa-simaizom aktint (α -SMA) is expresszálnak [18]. A neoplasztikusnak tartott stromasejtek termelik a makrofág kolónia-stimuláló faktort (M-CSF), az oszteoklasztogenikus nukleáris faktor kappa-B-receptor-aktivátor ligandot (RANKL) és az utóbbi semlegesítőjét, az oszteoprotegerint (OPG) [19]. A harmadik sejtípust a CD68-pozitív multinukleáris oszteoklaszt típusú óriássejtek alkotják, amelyek akár 100 sejtmagot is tartalmazhatnak. Ezek a monocita/makrofág vonal elemeiből keletkeznek és tartarát-rezisztens savanyú foszfatáz (TRAP), valamint kalcitonin-receptor (CTR) expressziót mutatnak [20].



1. ábra. Az óriássejtes csonttumor (GCTB) fő sejtípusai. A monocita/makrofágok és a fúziójukkal létrejövő óriássejtek CD68 sejtmembrán festődése (A). A neoplasztikus stromasejt populáció alfa-simaizom aktin (α -SMA) citoplazma festődése (B). Az osteolízisért felelős multinukleáris oszteoklaszt típusú óriássejtek hematoxillin-eozin (HE) sejtmag és citoplazma festődése (nyíl) (C). 3,3'-diaminobenzidin (DAB) immunperoxidáz reakció (A, B). Digitális mikroszkópia, méretskála: 70 μ m (A, B) és 50 μ m (C).

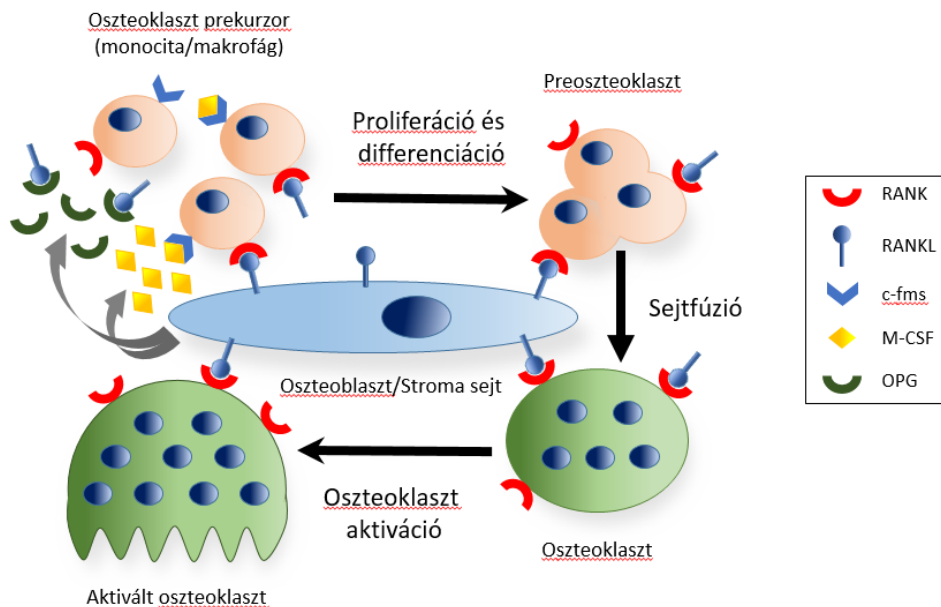
1.3. Oszteoklaszt típusú óriássejtek keletkezése GCTB-ben

A csont egy dinamikus szövet, amely az élet során folyamatos átépülésen („remodeling”) megy át. Az oszteoblasztok szolúbilis növekedési faktorok hatására oszteocitákká differenciálódnak, kollagént termelnek és katalizálják abban a kalcium hidroxapatit lerakódását, ezzel biztosítva a csontok megfelelő rugalmasságát és szilárdságát [21]. Fiziológias körülmények között a csontépülés és -lebontás egyensúlyát a csontlebontó oszteoklasztok és a csontépítő oszteoblasztok szabályozott aktivitása tartja fent. Patológias körülmények között az egyensúly felborul és a csontlebontás irányába tolódhat el az oszteoklasztok fokozott keletkezése és aktivitása miatt, ami csontszövet vesztéshez, oszteoporózishoz vezet [22]. Az oszteoklasztok a perifériás vérben keringő multipotens hematopoetikus őssejtből (HSC) származó monocita előalakokból, illetve a tumor mononukleáris komponensét alkotó makrofágokból keletkeznek [23]. Ezek az oszteoblasztok és a csontvelői stromasejtek által termelt citokinek és növekedési faktorok hatására a csontszövetbe vándorolnak, ahol oszteoklasztokká differenciálódnak [24]. Irodalmi adatok azt mutatják, hogy a GCTB-t alkotó óriássejtek érett oszteoklasztok, amelyek aktivitása a csontok reszorpcióját okozza [25].

1.3.1. Az oszteoklasztogenezis kanonikus szabályozása

Az oszteoklaszt keletkezéséért felelős két fő citokint az oszteoblasztok, illetve a stromasejtek termelik. Az oszteoblasztokban az 1,25-dihidroxi-D3-vitamin [1,25 (OH)₂ vitamin D3], a paratireoid hormon (PTH) és a citokinek közül az interleukin-6 (IL-6) fokozzák a RANKL termelődését. Az oszteoblasztok és a stromasejtek által termelt M-CSF az oszteoklaszt előalakok felszínén kifejeződő receptorához, a kolónia stimuláló faktor 1 receptorhoz (c-fms) kötődik, ezzel serkentve az oszteoklaszt előalakok proliferációját. A RANKL szintén az oszteoklaszt előalakok felszínén megjelenő receptorához, a RANK-hoz kötődik és a sejtek differenciálódásán keresztül az érett oszteoklasztok kialakulását eredményezi [26]. A multinukleáris oszteoklasztok a preoszteoklasztok fúziója során keletkeznek, amihez szükséges és elengedhetetlen a dendritikus sejt-specifikus transzmembrán fehérje (DC-STAMP) jelenléte [27]. A GCTB-ben a stromasejtek által termelt kemokinek közül a monocita kemoattraktáns protein-1 (MCP-1) és a stroma eredetű faktor-1 (SDF-1) serkentik a véráramban keringő

CD14-pozitív monociták érfalon át történő kilépését és bejutását a tumor környezetébe. [24]. A stromasejtek és az oszteoblasztok képesek szabályozni az oszteoklasztogenezis folyamatát a szolúbilis OPG termelődésén keresztül, amely a RANKL megkötésével gátolja a RANKL-RANK aktivációt, ezen keresztül gátolva az oszteoklasztok fejlődését és működését (**2. ábra**) [28].



2. ábra. Az oszteoklasztogenezis kanonikus útvonalon történő szabályozásának sematikus összefoglalása. (Forrás: Gori és mtsi, 2000 [28] nyomán saját szerkeztés)

1.3.2. Nem-kanonikus oszteoklaszt képződés

Az oszteoklasztok keletkezése a hagyományos RANKL és M-CSF által vezérelt kanonikus útvonal mellett alternatív, nem-kanonikus útvonalakon, egyéb citokinek és növekedési faktorok révén is megvalósulhat. A perifériás vérkeringésben cirkuláló oszteoklaszt-prekursorok oszteoklasztokká való differenciálódását a M-CSF és a RANKL-ot helyettesítő LIGHT, TNF α , TGF β , IL-6, IL-8, IL-11 vagy a RANKL és a M-CSF-et helyettesítő hepatocita növekedési faktor (HGF) és vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF) is kiválthatja. A nem-kanonikus úton létrejövő oszteoklasztok kisebbek és kevesebb sejtmaggal rendelkeznek, mint a kanonikus úton létrejövő oszteoklasztok. A nem-kanonikus út szerepe a fiziológias oszteoklasztogenezisben bizonytalan, viszont annál inkább nélkülözhetetlen lehet a gyulladással járó patológias csontreszorpció kialakulásában, ahol nagy számban keletkeznek releváns citokinek és

növekedési faktorok [29]. A mikrokörnyezeti hipoxia indirekt módon támogatja az oszteoklasztogenezist a hipoxia indukálta faktor (HIF) által szabályozott autokrin és parakrin VEGF szekrécióján keresztül [30].

1.4. A GCTB citogenetikai jellemzői

A citogenetikai eltérések közül a telomer asszociációk (TAS) vagy telomerikus fúziók előfordulása gyakori, amely a mononukleáris stromasejtek 85%-ában előfordulhat. Az eddig leírt TAS által leggyakrabban érintett telomerek a 22p, 13p, 15p, 21p, 14p, 19q, 1q, 12p, 11p, és 20q lokalizációban fordulnak elő. A TAS, mint klonális jelenség, köztes lépés lehet a további genetikai instabilitás kialakulásában [31]. A humán telomer reverz transzkriptáz (hTERT) enzim expresszióját kimutatták stromasejtekben, de ez nem mutatott összefüggést sem a telomer hosszal, sem a TAS gyakorisággal [32]. A GCTB neoplasztikus stromasejtek kromoszómáinak strukturális eltérései mellett azok számbeli klonális eléréseit is leírták, melyek leginkább poliszómia vagy egyedi, sejtszintű kiegyensúlyozott aneuszómia formájában jelentkeztek [33]. Bennük a kromoszóma instabilitás kialakulásáért felelős centroszóma amplifikációt is igazolták, ami azonban nem mutatott szignifikáns összefüggést a kromoszómák számbeli eltéréseivel szemben. Ez a megfigyelés arra utal, hogy a kromoszómális instabilitás háttere mögött más alternatív mechanizmusok állhatnak [34].

1.5. Patogenetikai faktorok

Irodalmi adatok számos olyan faktort említenek, amelyek szerepe bizonyított a GCTB progressziójában. A csontlebontást serkentő citokinek közül az IL-6 és a metasztázis során az extracelluláris mátrix lebontásáért felelős urokináz típusú plazminogén aktivátor (u-PA), annak receptora (u-PAR) és inhibitora (PAI-1) fokozott expressziót mutatott rekurrens és metasztatikus GCTB-ben a primer tumor formákhoz képest [35]. A sejtciklus szabályozó p53, p27, ciklin D1 fehérjéről és a c-myc onkogénről szintén leírták, hogy szerepük lehet a GCTB patogenezisében. Szoros korrelációt írtak le a metasztázis előfordulása és a c-myc transzkripció faktor túltermelődése között, mind az oszteoklaszt típusú óriássejtekben, mind a mononukleáris sejtekben [36]. A mononukleáris stromasejtekben leírták az NME2 és a c-jun fehérjék

fokozott termelődését és foszforiláció általi aktiválódását [37]. A p53 tumorszupresszor gén mutációja vagy a heterozigóta állapot elvesztése (LOH) összefüggést mutatott a daganat rekurenciájával és a malignus transzformáció kialakulásával [38,39]. A sejtciklus G1/S fázisátmenetet elősegítő ciklin D1 fehérje túltermelődését főleg a daganat oszteoklaszt típusú óriássejtjeinek magjában figyelték meg, egy időben a p21 ciklin függő kináz inhibitor fehérje túltermelődésével, amely a ciklin-dependens kináz 4/6 (CDK4/6) gátlásán keresztül a ciklin D1 akkumulációját eredményezi [40]. A RANKL és a VEGF jelenléte támogatja a hipoxia kondicionált médium által előidézett oszteoklasztogenezist, azt sugallva, hogy a lokális hipoxia indirekt módon befolyásolja az oszteoklasztogenezist, a HIF által szabályozott autokrin vagy parakrin VEGF fehérje termelődésén keresztül [30]. A mátrix metalloproteináz-9 (MMP-9) az extracelluláris mátrix proteolízisén keresztül, a mátrixhoz kötött VEGF felszabadulását elősegítve együttesen az oszteoklasztok keletkezését és az angiogenezist serkentik. A VEGF és az MMP-9 mRNA expressziós szintje összefüggést mutatott a csontlebontással és a lokális rekurencia kialakulásával [41]. Microarray és génexpressziós vizsgálatok igazolták, hogy néhány extracelluláris mátrixot alkotó fehérjét kódoló gén összefüggésbe hozható a rosszabb prognózissal. A tenascin-C (TN-C) fehérjét kódoló TNC gén fokozott átírása és a fehérje túltermelődése növeli a metasztázis és a lokális kiújulás lehetőségét [42]. A lumikán (LUM) és a dekorin (DCN) expresszió csökkenését figyelték meg a metasztatikus GCTB-k esetében, ami inkább tumor specificitást mutatott, mint lokalizáció specificitást [43]. A hiszton H3.3 fehérjét kódoló H3F3A gén szomatikus mutációja a GCTB stromasejtek 92%-ában jelen van [44]. A mikro-RNS-ek szerepét is felvetették, ahol a miR-136 alacsony szintje a metasztatikus GCTB esetekben fordított korrelációt mutatott az NFIB gén expressziójával, így mint prognosztikus marker előrejelezheti a daganat biológiai viselkedését [45]. A neoplasztikus stromasejtekben a HIF-1 α által indukált miR-210 termelődése indirekt módon a proliferáció szabályozásán keresztül a hipoxiához való adaptációban játszik szerepet [46].

1.6. GCTB kezelésének lehetőségei

A GCTB kezelése elsősorban sebészi beavatkozással, a tumor kikaparásával (küret) történik, ami gyakran lokális adjuváns kezeléssel társul. Ennek során a keletkezett

üregét hidrogén-peroxiddal (H_2O_2), folyékony nitrogénnel, fenollal, illetve alkohollal öblögetik, elpusztítva az esetleg visszamaradt daganatsejteket [47]. A kezelést követően kialakult üregét polimetil-metakrilát (PMMA) alapú csontcementtel töltik ki, ahol a műgyanta polimerizálódása során felszabaduló hő okozta lokális termokoaguláció pusztítja el a megmaradt tumorsejteket [48]. A sebészi kezelés és az adjuváns terápia együttes alkalmazása csökkenti a recidíva kialakulását, ami nagymértékben befolyásolja a végtag és a környező ízületi funkciók megőrzését. Az agresszív grade 3-as daganatoknál, ahol a daganat a csontot áttörve a lágyrészekbe is behatol, az „en-bloc” rezekciót alkalmazzák, ami gyakran az ízületi funkció elvesztésével jár [49]. Néhány esetben a daganat a csípő területén vagy a csigolyatestben alakul ki, így sebészi beavatkozással nehezen hozzáférhető vagy nem távolítható el. Ilyen esetekben gyakran alkalmazott módszer a sugárterápia (radioterápia), amelynek során a későbbi malignus transzformáció kockázatának csökkentése céljából megavolt energiájú, ionizáló sugárzást alkalmaznak [50].

A biszfoszfonátokat széles körben alkalmazzák malignus és benignus folyamatok által okozott csontlebontás megelőzésére és gátlására. A biszfoszfonátok az oszteoklasztokban blokkolják a mevalonát bioszintézisben kulcsszerepet játszó farnezil-difoszfát-szintáz, így gátolják az oszteoklasztok keletkezését és reszorpciós aktivitását, illetve fokozzák az oszteoklasztok apoptózisát [51]. A denosumab egy humanizált monoklonális antitest (IgG_2), amely az oszteoblasztok és a csontvelői stromasejtek által termelt szolúbilis vagy membrán kötött RANKL-hoz kötődve gátolja az oszteoklasztogenezist, ezáltal csökkentve a patológiás oszteolízist [52].

1.7. Epidermális növekedési faktor receptorcsalád (ErbB)

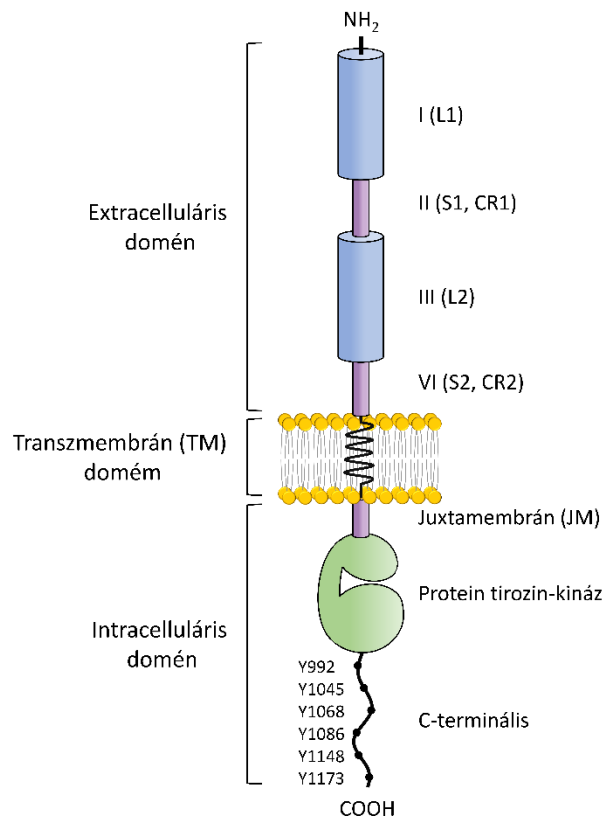
Az I-es típusú transzmembrán receptor tirozin-kinázok (RTK) közé sorolható ErbB receptor családnak négy ismert tagja van, amelyek az epidermális növekedési faktor receptor ErbB1 (EGFR, HER1), az ErbB2 (HER2/Neu), az ErbB3 (HER3) és az ErbB4 (HER4) [53]. Az ErbB receptorcsalád fontos szerepet játszik a többsejtű szervezetek fejlődésében, mert a receptor által közvetített jelútvonalak szabályozzák a sejtek proliferációját, túlélését, differenciációját és migrációját [54].

1.7.1. Az EGFR felépítése és működése

Az EGFR gén a 7-es kromoszómán 7p11.2 lokalizációban található. A közel 193 kb genomialis DNS szakaszt elfoglaló gén 28 exont és 27 intront tartalmaz [55]. Az EGFR fehérje egy 170 kDa molekulásúlyú transzmembrán glikoprotein, amelyet 1186 aminosavból álló polipeptidlánc alkot [56]. A többi tirozin kinázhoz hasonlóan az EGFR is három fő doménből épül fel: egy extracelluláris ligand-kötő, egy transzmembrán és egy intracelluláris doménből áll, amelyek közül az utóbbit egy konzervált katalitikus aktivitással rendelkező protein tirozin-kináz domén és egy C-terminális szabályozó régió alkot (3. ábra) [57].

Az ErbB család tagjai 40-50%-os szerkezeti homológiát mutatnak az extracelluláris domén és 60-80%-os homológiát az intracelluláris domén alapján [58]. Az extracelluláris domén 4 aldoménből épül fel: I (L1),

II (S1, CR1), III (L2) és IV (S2, CR2). Az I-es és III-as aldomének leucin gazdag régiók, amelyek a ligand-kötő helyeket alkotják, míg a II-es és IV-es aldomének cisztein-gazdag homológ régiók [54]. A II-es aldomén tartalmazza a dimerizációs hurkot, így az intermolekuláris kapcsolat kialakításában játszik szerepet [59]. A hidrofób transzmembrán domén (TM) fontos szerkezeti eleme a GXXXG motívum, amelynek szerepe van a homo- vagy heterodimer konformáció kialakításában, ezáltal a receptor aktivációjában. [60]. A TM domén membránközeli juxtamembrán (JM) régiója szabályozó funkciót lát el, szerepet játszik a receptor kifejeződés szabályozásában, ligandfüggő internalizációjában, a receptor bazolaterális eloszlásában és más fehérjékkel (eps8 és kalmodulin) való asszociációban [61,62]. A katalitikus aktivitásért felelős



3. ábra. Az EGFR felépítésének sematikus szerkezete. (Forrás: Bazley és mtsi, 2005 [57] nyomán saját szerkesztés)

protein-tirozin-kináz aldomén aminosav szekvenciája nagyfokú hasonlóságot mutat a családok között, mivel közös (primordiális) génből származnak [63]. A protein tirozin-kináz aldomént két globuláris, egy nagyobb N-terminális és egy kisebb C-terminális lebeny alkotja, amelyeket a kapocsrégió köt össze. A két lebeny közötti rész az ATP-kötő zseb, amit négy szerkezeti elem alakít ki [64]. Ezek közül a katalitikus lebeny konzervált aminosav szekvenciáját a HRDLAARN motívum alkotja. Az ebben levő aszpartát felelős az ATP-ről a szubsztrát tirozinjaira történő foszfát transzferért. A HER3-ban az aszpartát helyett aszparagin van, ami kináz-inaktivitáshoz vezet [65]. A C-terminális szabályozó régiója tartalmazza a foszforilációs helyeket, amiket 6 darab egymást követő tirozin (Y992, Y1045, Y1068, Y1086, Y1148, Y1173) képez [66].

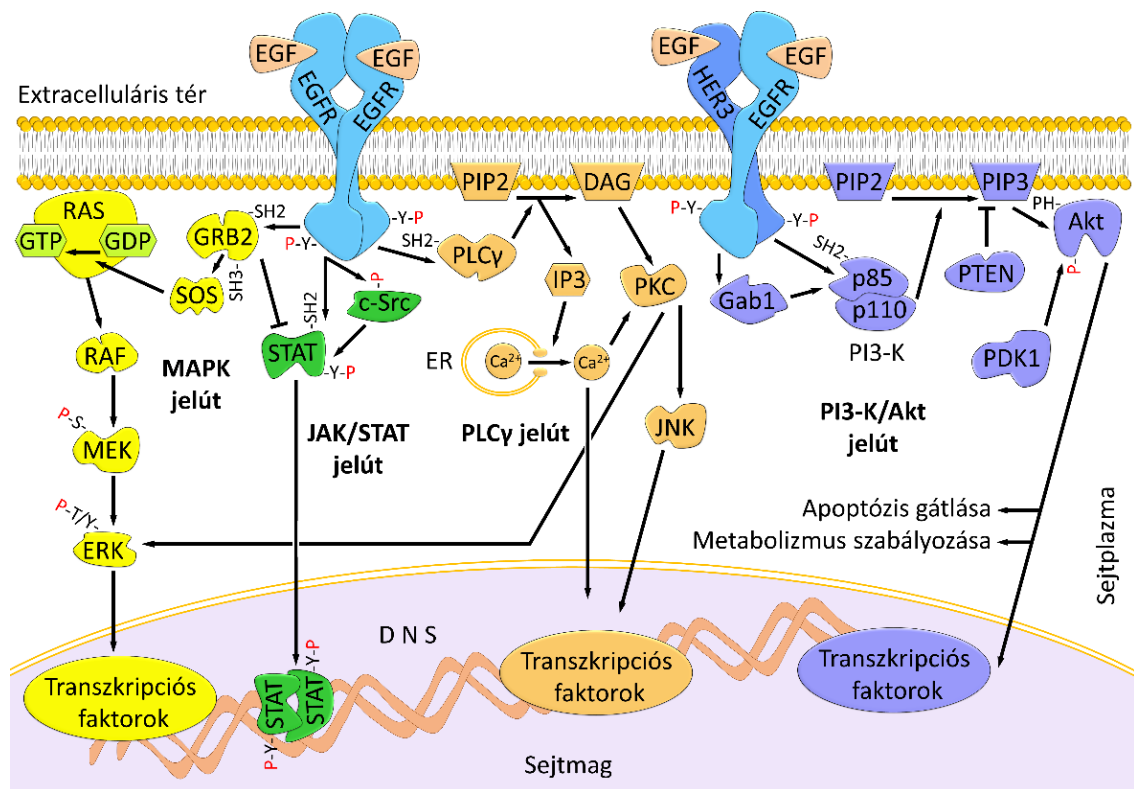
Az EGFR homodimert, vagy az ErbB család többi tagjával heteodimert képez. Az ErbB család kedvelt dimerizációs partnere az ErbB2, amelynek EGFR, illetve ErbB3 receptorral alkotott heterodimerje erős szignalizációs aktivitást mutat [67]. Az ErbB család tagjain kívül az EGFR képes kapcsolatba lépni és heterodimert képezni más tirozin-kináz membránreceptorokkal és integrinokkal [68,69].

1.7.2. Az EGFR család ligandjai

Az EGF családba tartozó növekedési faktorok membrán-kötött formában keletkeznek, amelyek hasítását, így a szolúbilis forma felszabadulását, az integrin kapcsolatot gátló és metalloproteáz doménnel rendelkező (ADAM) enzimesalád tagjai katalizálják [70]. Az ErbB receptorhoz kötődő EGF-szerű domének nagy homológiát mutatnak [71]. Az EGFR család 11 ligandját azonosították emlősökben, amelyek receptor-affinitásuk alapján három csoportba sorolhatók [63]. Az epidermális növekedési faktor (EGF), a transzformáló növekedési faktor alfa ($TGF\alpha$) és az amfiregulin (AR) kizárólag az ErbB1 receptorhoz kötődnek. A betacellulin (BTC), a heparint kötő EGF-szerű növekedési faktor (HB-EGF) és az epiregulin (EPR) az ErbB1-hez és az ErbB4-hez egyaránt kötődnek. A harmadik csoportba sorolható neuregulinok (NRG) vagy heregulinok és a tomoregulin az ErbB3 és ErbB4 természetes ligandjai. Az NRG-1 és az NRG-2 az ErbB3 és ErbB4-hez kötődhetnek, míg az NRG-3 és NRG-4 csak az ErbB4-hez. Az ErbB2 természetes ligandja nem ismert [72]. Ugyanahhoz az ErbB receptorhoz kötődő eltérő ligandok eltérő biológiai folyamatokat képesek aktiválni *in vitro* és *in vivo* viszonyok között is [73].

1.7.3. EGFR által aktivált jelutak

A ligand receptorhoz való kötődését követő konformációváltozás a receptor dimerizációját, majd az egymás közelébe kerülő tirozin-kináz aldomének tirozin oldallánainak auto- és transz-foszforilációját eredményezi a C-terminális szabályozórészen [74]. A foszforilált tirozin oldalláncokhoz adapter molekulák és citoplazmatikus tirozin kinázok kapcsolódhatnak, amelyek „downstream” jelátviteli útvonalakat aktiválnak, így a mitogén-aktivált protein kináz (MAPK), a foszfatidil inozitol 3-kináz (PI3-K), a foszfolipáz C gamma (PLC γ), illetve a Janus kináz/szignál transzducer és transzkripció aktivátor (JAK/STAT) szignalizációs útvonalakat (4. ábra) [75].



4. ábra. Az EGFR által aktivált főbb jelútvonalak ábrázolása. (Forrás: Scaltriti és mtsi, 2006 [75] nyomán saját szerkesztés)

1.7.3.1. MAPK (Ras/Raf/MEK/ERK) jelút

A MAPK kaskád evolúciósan konzervált elemei számos biológiai folyamatot szabályoznak, többek között a sejtnövekedést és a differenciációt [76]. Az EGFR aktiválását követően a citoplazmatikus növekedési faktor receptor kötő fehérje 2 (Grb2) adapter-fehérje transzlokálódik a plazmamembránhoz és az Src homológ 2 (SH2) doménen keresztül kapcsolódik a receptor C-terminális szabályozó régiójában található foszforilált Y1068 és Y1086 oldalláncaihoz [77]. A Grb2 adapter fehérje két SH3 doménen keresztül megköti a „son of sevenless” (SOS) cserélő fehérjét a citoplazmából, ezáltal a sejtmembrán belső felületéhez horgonyzott kis G fehérjecsald egyik tagja, a Ras fehérje közelébe kerül [78]. A SOS egy Ras-specifikus guanin nukleotid cserélő faktor (GEF), amely elősegíti a Ras felszínéről a guanozin difoszfát (GDP) leválását és egy újabb guanozin trifoszfát (GTP) bekötődését, ami a Ras aktivációját eredményezi [79]. A GTP kötött aktív Ras további effektor molekulákat aktivál, amelyek egymást foszforiláló protein kinázokból álló láncolatot alkotnak. Ezek elemei a Raf (MAPKKK vagy MAP-kináz-kináz-kináz), a MEK (MAPKK vagy MAP-kináz-kináz) és az ERK (MAPK). Az aktív Raf foszforilálja a MEK kettős specificitású kinázt az aktivációs hurok szerin-218 (S218) és S222 oldalláncain, ami a MEK aktivációját eredményezi [80]. A Raf a MEK izoformák közül a MEK1-et és MEK2-öt foszforilálja. A MEK az ERK1 és ERK2 kinázokat az aktivációs hurok treonin-183 (T183) és Y185 oldalláncain foszforilálja és ezáltal aktiválja azokat [81]. Az ERK1 és ERK2 a sejtmagba transzlokálódnak, ahol transzkripciós faktorok foszforilációján keresztül fokozzák a sejtproliferációhoz kapcsolódó gének átírását [82].

1.7.3.2. PI3-K/Akt jelút

A PI3-K/Akt jelút szintén szerepet játszik a sejtproliferációban, az apoptózis gátlásán keresztül a túlélésben, invázióban és a migrációban. Három PI3-K osztályt különböztetünk meg az alegység-szerkezet és a szubsztrát-specificitás alapján, amelyek közül az Ia osztályt aktiválják a RTK-ok [83]. A PI3-K szerkezetét tekintve két SH2 domént tartalmazó p85 szabályozó alegységből és egy p110 katalitikus alegységből épül fel. A p85 szabályozó alegység SH2 doménjei az EGFR-HER3 heterodimerhez kötődnek, a HER3 tirozin-kináz doménjén keresztül. A HER3 tirozin-kináz doménje 6 darab Y-X-

X-M motívumot tartalmaz, amelynek tirozinjai, foszforilációt követően, kötőhelyként szolgálnak a p85-ös szabályozó alegység számára [84]. Ezek a motívumok az EGFR és a HER2 C-terminálisain található kináz doménből hiányoznak, ezért ezekhez direkt módon nem képes kötődni a PI3-K p85-ös szabályozó alegysége [85]. Az EGFR a Grb2-asszociált kötőfehérje 1 (Gab1) kötődését követően indirekt módon képes megkötni a PI3-K p85 szabályozó alegységét [86]. Az aktív PI3-K a plazmamembránban található foszfatidil-inozitol-4,5-bifoszfátot (PIP2) foszforiláció során alakítja foszfatidil-inozitol 3,4,5-trifoszfáttá (PIP3). A keletkező PIP3 foszfolipidhez a pleksztrin homológ (PH) domént tartalmazó fehérjék kapcsolódnak. Egyik ilyen fehérje a szerin/treonin-kináz Akt, amely a citoplazmából a sejtmembránba transzlokálódik, ahol a foszfatidil-inozitol-dependens kináz-1 (PDK 1) foszforilálja a katalitikus kináz domén részét. Az aktivált Akt gátolja az apoptózist, szabályozza a génátírást és a metabolikus folyamatokat, így fontos szerepet tölt be a sejtek túlélésének szabályozásában [87]. A PI3-K/Akt jelutat negatívan szabályozza a foszfatáz- és tenzin- homológ (PTEN) fehérje, amelynek a PIP3 defoszforilációjában van szerepe [88].

1.7.3.3. PLC γ jelút

Az EGFR aktivációját követően a citoplazmatikus inaktív PLC γ az SH2 doménjén keresztül kötődik a receptor C-terminális szabályozó régiójában található foszforilált Y992 és Y1173 oldalláncjaihoz, majd ezt követően az EGFR tirozin-kináz aldoménje foszforilálja a Y771, Y783 és Y1254 oldalláncokat és ezáltal aktiválja a PLC γ -t [89]. Az aktivált PLC γ a sejtmembránban található PIP2 fehérjét hidrolizálja, ami során két másodlagos hírvivő molekula, az inozitol-1,2,3-trifoszfát (IP3) és a 1,2-diacil-glicerol (DAG) keletkezik [90]. A szolúbilis IP3 az endoplazmatikus retikulum (ER) membránján található receptorához kötődve, annak nyitásától intracelluláris Ca^{2+} felszabadulást eredményez. A plazmamembránban maradó DAG és a Ca^{2+} együtt a protein-kináz C (PKC) enzimet aktiválják [91]. Az aktív PKC többek között a MAPK és a c-Jun NH2-terminális protein kináz (JNK) aktivációját katalizálja [62].

1.7.3.4. JAK/STAT jelút

A citokin receptorok mellett más növekedési faktor receptorokon keresztül is lehetséges a JAK/STAT útvonal aktiválása [92]. A STAT család (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b, STAT6) fehérjéi közül a STAT 1, 3, 5a, 5b vesz részt az EGFR jelátvitelben [62]. A ligand-kötött EGFR direkt módon aktiválja a STAT fehérjéket, a receptor foszforilált tirozin oldalláncaihoz kötődve, valamint a tirozin oldalláncok foszforilációján keresztül. A STAT indirekt módon is aktiválódhat, az EGFR által foszforilált és aktivált nem receptor tirozin-kináz c-Src fehérjén keresztül [93]. A STAT fehérje, foszforilációja után, homo- vagy heterodimert képez, majd a sejtmagba transzlokálódik, ahol a DNS-hez kötődve a sejt túlélésében és proliferációjában szerepet játszó gének átírását szabályozza [94]. A MAPK jelút negatív és pozitív módon szabályozhatja a STAT által indukált jelátvitelt. Negatív szabályozás során a Grb2 adapter fehérje nagyobb affinitással, kompetitíven kötődik az EGFR C-terminális szabályozó régiójában található foszforilált Y1068 és Y1086 oldalláncaihoz, ezzel gátolja a STAT3 kötődést és az aktivációt. Pozitív szabályozás esetén a STAT3 C-terminális régiójának közelében található S273 oldallánc foszforilációja történik, ami a fehérje transzkripciós aktivitását fokozza [95].

1.7.4. EGFR jelút szerepe a csontszövetben

A csontok lebontása, felépítése és megújulása számos hormon, növekedési és transzkripciós faktor által szabályozott folyamat. Az EGFR aktivált jelutak elsősorban a csont felépülését szabályozó folyamatban vesznek részt [96]. Az EGFR ligandok és az EGFR receptor által közvetített jelátvitel aktiválása fokozza az oszteoblasztok proliferációját és gátolja az oszteoblaszt differenciációt. Az EGFR a differenciálatlan oszteoprogenitor sejtekben csökkenti a korai csont-markerek expresszióját, valamint a Runx2 és az Osx transzkripciós fehérjék sejten belüli mennyiségét, ezáltal fenntartva az oszteoprogenitor sejtek differenciálatlan állapotát [97]. Az EGFR hiányos egerekben az oszteoblasztok proliferációja lelassul és a csontképződés az oszteocita differenciáció irányába tolódik el [98]. Az EGFR szerepét a csontvelő eredetű mezenhimális őssejtekben (BMSC) is leírták. Az EGF által serkentett sejtproliferáció és migráció az ERK és a PLC γ fehérjék foszforilációján keresztül valósul meg [99]. Az oszteoblasztokban és a

csontvelői stromasejtekben az EGF-EGFR kapcsolat serkenti a RANKL expresszióját és gátolja az OPG fehérje termelését, fokozva az oszteoklasztok keletkezését [100]. Az alacsony extracelluláris Ca^{2+} szint által kiváltott PHT szekréció az oszteoblasztokban fokozza az AR expressziót, ami az EGFR-en keresztül az Akt-ot és az ERK-et foszforilálja, és aktiválja a c-jun és c-fos fehérjék expresszióját. Ennek következtében fokozódik az oszteoblaszt proliferáció és differenciáció, valamint a csontmineralizáció [101].

Az EGFR jelűtnak fontos szabályozó szerepe van a daganatok csontba történő áttétképzésében és a csont lebontásának szabályozásában. A prosztatata daganat által expresszált u-PA és receptora, az u-PAR, valamint az MMP-9 fokozzák a sejtek invázióképességét és a csontáttét kialakulását. Az EGFR tirozin-kináz gátló gefitinib kezelés hatására az u-PA és az MMP-9 expressziója csökken, ami a prosztatata karcinómasejtek invázióját mérsékli [102]. Az MMP-1 és az ADAMTS1 expresszió a metasztatikus daganatokban az EGF-szerű ektodomén ligandok oldható formában történő felszabadulását eredményezi. Ezek a szolúbilis EGF-szerű ligandok autokrin módon az EGFR jelúton keresztül fokozzák a tumorsejtek proliferációját, illetve parakrin módon gátolják az oszteoblasztok OPG termelését, ezáltal fokozva az oszteoklasztogenezist és a csont lebontását [103].

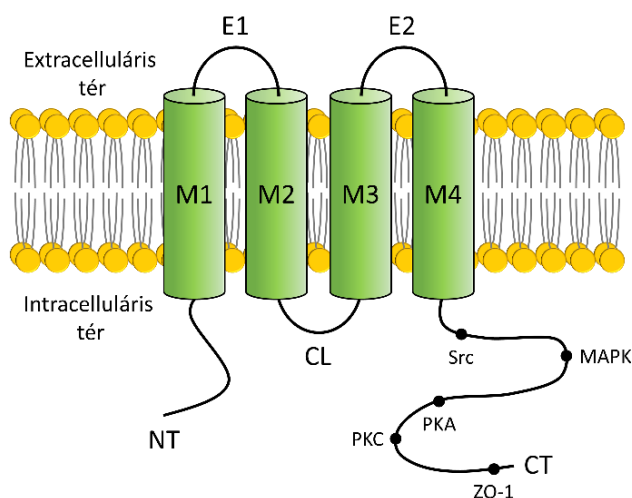
1.8. „Gap junction” (réskapcsolat) a sejtek között

A direkt sejt-sejt kommunikáció connexin (Cx) és réskapcsolat (gap junction-GJ) membráncsatornákon keresztül valósul meg, amelyeken ionok (K^+ , Ca^{2+}) és 1,8 kDa-nál kisebb méretű molekulák, így metabolitok (glükóz) és másodlagos hírvivők (IP3, cAMP, cGMP) közlekednek a sejtek között az extracelluláris tér kizárásával. A GJ csatornák fontos szerepet játszanak a szöveti homeosztázis fenntartásában és alapvető élettani funkciókat látnak el. Részt vesznek az embriogenezis, a sejtnövekedés és differenciálódás szabályozásában, valamint az akciós potenciálok sejtek közötti közvetlen terjedésének közvetítésében. Emellett az avaszkuláris szövetekben a tápanyagok közvetítésében is részt vesznek [104–106].

1.8.1. A Cx43 fehérje szerkezete

A humán szövetekben 21 connexin (Cx) fehérjét kódoló gént azonosítottak. Minden Cx fehérje izotípus sejt- vagy szövet-specifikus expressziót mutat, és a legtöbb sejt és szövet egynél több Cx izotípust expresszál [107]. A Cx izotípusok közül a Cx43 a legősibb és a legelterjedtebb [108]. A 382 aminosavból álló transzmembrán Cx43 fehérjét kódoló humán gap junction alfa 1 (GJA1) gén a 6-os kromoszóma 6q22-q23 régiójában található, egyszerű felépítésű, a nem kódoló 1-es exonból és a kódoló 2-es exonból áll, amelyeket egy intron választ el [107,109].

A Cx család tagjai felépítésükben nagy hasonlóságot mutatnak. Minden Cx izotípust négy hidrofób transzmembrán domén (M1-M4), két hidrofil extracelluláris hurok (E1 és E2), egy intracelluláris hidrofil citoplazmatikus hurok (CL), a C-terminális (CT) és az N-terminális (NT) domén alkotja (**5. ábra**). Az E1 az M1 és az M2 doméneket, az E2 az M3 és az M4 doméneket, míg a CL hurok az M2 és az M3 doméneket köti össze [110].



5. ábra. A connexin (Cx) transzmembrán fehérje sematikus ábrázolása. (Forrás: Harris, 2001 [110] nyomán saját szerkesztés)

Az extracelluláris és az intracelluláris domének a Cx izotípusokban közel 40%-os szekvencia hasonlóságot mutatnak [110]. A négy transzmembrán domén, a két extracelluláris hurok és az NT domén konzervált struktúrák. A legvariábilisabb a CT domén, amely a Cx izotípusokban eltérő hosszúságú, és azok eltérő molekulatömegéért

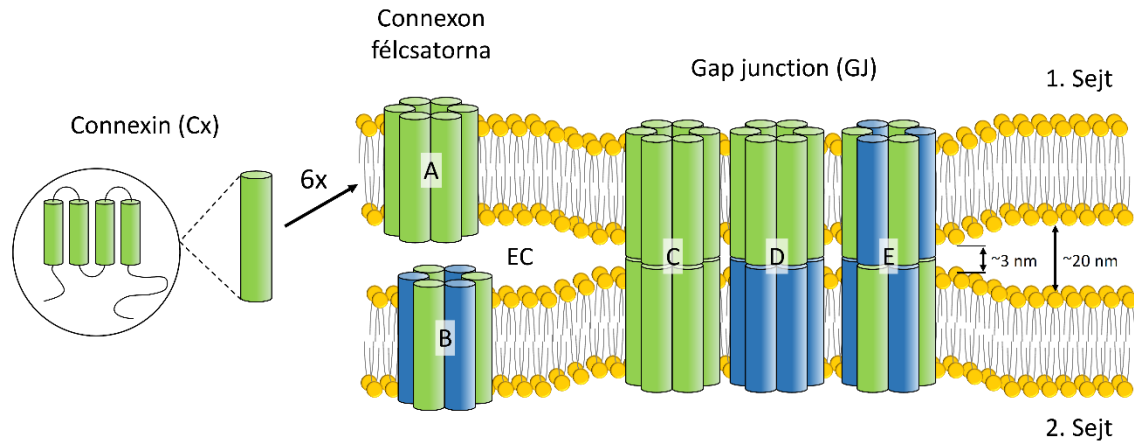
is felelős [111]. A két extracelluláris huroknak (E1-E2) fontos szerepe van a Cx monomerekből felépülő félcsatornák (connexonok) kapcsolódása során. Mindkét extracelluláris hurok három ciszteint tartalmaz, a C-X₆-C-X₃-C (E1 esetében), illetve a C-X₅-C-X₅-C (E2 esetében) konzervált motívumokban. Az egyetlen kivétel a Cx31, amely csak a C-X₅-C-X₅-C motívumot tartalmazza az E2 hurokban. A két extracelluláris hurok ellentétes ciszteinjai diszulfid-hidakat képeznek, amelyek elengedhetetlenek a két connexon kapcsolódása során [112].

A CT domén számos szerin/treonin és tirozin foszforilációs helyet tartalmaz, amelyek kinázok (MAPK, PKA, PKC, Akt Src) foszforilációs célpontjai lehetnek. Ezen helyek foszforilációja a GJ csatorna összeszerelődését, membránba való kihelyeződését és internalizációját, a csatorna nyitását és zárását keresztül az áteresztő képességét szabályozzák [113]. A CT domén más fehérjék kötőhelyeit is tartalmazza, például a szoros kapcsolat (tight junction) fehérjék [zonula okkludens-1 (ZO-1) és ZO-2]), a citoskeletális fehérjék (α - és β -tubulin) és egyéb szabályozó fehérjék (MANGUK, CIP85, caceolin-1) kötőhelyeit, amelyek a GJ csatorna méretét és stabilitását, az intracelluláris kommunikáció közvetítését, a Cx transzportját és internalizációját befolyásolják [114].

A connexinek klasszikus elnevezése a Cx polipeptidlánc molekulatömege (kDa) alapján történik, így a 43 kDa-os Cx fehérje a connexin 43 (Cx43). Egy másik elnevezés a szekvencia hasonlóság és CT hurok hosszúság alapján sorolja alcsoportokba a (α , β , γ , δ és ϵ) connexineket, ahol a görög betűket követő számok az alcsoportokba tartozó Cx izotípusok felfedezésének sorrendjére utalnak. Így az α csoportban elsőként azonosított Cx43 a GJ α 1 vagy GJA1 elnevezést kapta [115].

1.8.2. A connexin csatornák felépítése

Hat Cx fehérje oligomerizálódik és képez egy félcsatornát vagy connexont. A szomszédos sejtek 2 connexonja kapcsolódik GJ csatornává, ahol a két sejtmembrán közötti távolság 2-3 nm-re csökken (**6. ábra**). A csatornák a sejtmembránban több száz vagy ezer csatornából álló, geometriailag rendezett aggregátumokba (plakkok) csoportosulnak, és vagy GJ csatornaként vagy félcsatornaként („hemichannel”) működnek [114,116].



6. ábra. A gap junction (GJ) csatorna felépítése. Homomer connexon (A), heteromer connexon (B), homotípusos GJ (C) és heterotípusos GJ (D, E). EC: extracelluláris tér. (Forrás: Laird, 2006 [114] nyomán saját szerkesztés)

A félcsatornák azonos vagy eltérő Cx izotípusokból is felépülhetnek, így homomer vagy heteromer connexonokat képeznek. Ha a réskapcsolatot két azonos connexon izotípus alkotja, akkor homotípusos, ha két különböző, akkor heterotípusos GJ csatornáról beszélünk (**6. ábra**) [112]. Ha egy félcsatorna két kompatibilis Cx izoformából áll, heteromer connexon jön létre (**6. ábra**). A kompatibilitás kialakulásáért a második extracelluláris hurok (E2) a felelős [117]. Számos heteromer connexont igazoltak, például a májban Cx26-Cx32, a szemlencsében Cx45-Cx50, a kohleában Cx26-Cx30, a szívizomban Cx43-Cx45 található meg [114]. Azonban nem minden Cx izotípus kompatibilis, így például a Cx43 nem képes oligomerizálódni a Cx26 izotípussal [118].

A Cx csatornák átteresztőképessége molekulaméret és töltésalapú szelekciót mutat. A Cx43 csatornákon keresztül <1,8 kDa molekulatömegű, negatív töltésű molekulák diffúziója történik, míg a Cx45 fehérjéből felépülő csatornák <0,3 kDa molekulatömegű, pozitív töltésű molekulák diffúzióját teszi lehetővé [119].

A gerinctelen állatokban a GJ csatorna funkciót az innexinek látják el, amelyek szerkezeti hasonlóságot mutatnak a Cx fehérjékkel, szekvencia homológiát azonban nem mutatnak [120]. A gerincesekben az innexinokkal a pannexinek mutatnak szekvencia hasonlóságot, de ezek csak félcsatornákat képeznek [121].

1.8.3. A Cx43 foszforilációs szabályozása

Elektroforetikus mobilitása alapján a Cx43 több izoformáját azonosították SDS/PAGE módszerrel, ilyenek a gyors mobilitású, nem foszforilált P0 és NP izoformák vagy a lassan migráló P1 és P2 izoformák. A migrációs különbségért a szerin oldalláncok foszforilációja felelős. Az újonnan szintetizálódó Cx43 először a P0 izoformát, majd az érés során a P1 és a P2 izoformákat mutatja [122]. Az S365 oldallánc foszforilációja fontos a P1 izoforma kialakulásában. Ez az izoforma elsősorban a sejtmembránban és a GJ plakkokban fordul elő [123]. A további S325, S328 és S330 oldalláncok foszforilációja a P2 izoformává történő átalakulást jelzik, amely izoforma kizárólag a GJ csatornában található meg [124].

A Cx43 fehérje C-terminális szabályozó régiója 21 foszforilációs helyet tartalmaz, amelyek számos kináz célpontjai, foszforilációjuk szabályozza a Cx43 monomer transzportot, a GJ összeszerelődést és a plakkok nagyságát [125]. A GJ kommunikációt a Cx43 foszforilációján keresztül a kazein-kináz 1 (CK1), a protein-kináz A (PKA) és az Akt általában pozitívan, míg a PKC, a MAPK, az Src és a ciklin-dependens kináz 2 (Cdc2) negatív módon szabályozzák [126]. Az Akt-kináz a Cx43 C-terminális régiójában levő S373 oldalláncot foszforilálja, ami elősegíti a 14-3-3 fehérje kötődését és a Cx43 alegység transzportját az ER-ből a Golgi régióba, ahol megtörténik a connexonokká való oligomerizáció és a plazmamembránba irányuló transzport [127]. Az Akt által foszforilált S373 oldallánc fontos a GJ membráncsatorna stabilitásának fenntartásában és a GJ plakkok méretének szabályozásában, ami a Cx43 és a ZO-1 interakció gátlásán keresztül valósul meg [128,129]. A ciklikus adenzin monofoszfát (cAMP) által aktivált PKA az S364 és S365 oldalláncokat képes foszforilálni, ami a Cx43 fehérje sejtmembránba történő vándorlásának szabályozása és a GJ csatorna összeszerelődése szempontjából fontos. Az S365 oldallánc "gatekeeper" funkciót is betölt, így ennek foszforilációja a GJ csatorna szerkezetében konformációváltozást idéz elő, ami megakadályozza az S368 oldallánc PKC általi foszforilációját és a csatorna zárását [123,130]. A plazmamembránba vándorolt connexonok új GJ csatornákká rendeződése és a már meglévő plakkokhoz kapcsolódása a CK1 által foszforilált S325, S328 és S330 oldalláncokon keresztül valósul meg [131]. A mitózis alatt aktiválódó Cdc2 a Cx43 csatornák S255 és S262 oldalláncait foszforilálja, ami a GJ csatornák internalizációját és a sejtek közötti kommunikáció megszüntetését eredményezi [132]. Az aktivált PKC a Cx43 fehérjét az S368 oldalláncon

foszforilálja, ami a csatorna konduktanciájának és szelektív áteresztőképességének csökkenését eredményezi [133]. Az S255, S279 és S282 oldalláncok MAPK általi foszforilációja a GJ membráncsatorna zárását eredményezi, amelynek következtében a sejtek közötti kommunikáció megszűnik, a csatorna internalizációja és klatrin-mediált endocitózison keresztüli degradációja fokozódik [134,135]. A v-Src kináz először SH3 doménjén keresztül kötődik a Cx43 fehérje C-terminális doménjéhez, foszforilálva a Y265 oldalláncot, majd az SH2 doménjén keresztül foszforilálja a Y247 oldalláncot, ami a csatorna zárásához vezet [136].

1.8.4. Cx43 szerepe a csontszövetben

A Cx43 fehérje és az általa kialakított GJ membráncsatorna fontos szerepe bizonyított a csontfejlődés során, az oszteoblaszt proliferáció és differenciáció szabályozásában. Ugyancsak támogatja az oszteociták adaptációját a mechanikai terhelés és a szolúbilis növekedés faktorok által kiváltott hatásokra, illetve elősegíti az oszteociták túlélését az apoptózis gátlásán keresztül [137,138].

A csontokban és a csontszövetek alkotó sejtekben a GJ csatornákat főképp a Cx43 fehérje alkotja, de ugyanitt megtalálhatók még a Cx37, Cx45 és Cx46 fehérjék is. Ezek közül a Cx46 nem transzportálódik a sejtmembránba, hanem a transz-Golgi régióban marad, így nem vesz részt a sejtek közötti kommunikáció összehangolásában [139]. A Cx43 fehérjét kódoló GJA1 gén missense mutációja súlyos szisztémás csontfejlődési rendelleniséget, az okulodentodigitális diszpláziát (ODDD) okozza. Eddig legalább 24 különálló mutációt azonosítottak a GJA1 génben, ami az ODDD kialakulásához vezethet. Ez az autoszómális domináns betegség a kraniofaciális régió malformációját, a láb és kéz ujjainak a deformitását (szindaktilia), valamint a szemgolyó (mikroftalmia) és a fogak (mikrodontia) rendellenességeit okozza.[140,141]. Egér oszteogenikus sejtekben a GJA1 gén abláció vagy az ODDD-szerű mutáció hipomineralizációt és a csontszövet-osszifikáció elmaradását eredményezi, az oszteoblasztok funkciózavara, a lecsökkent OPG termelés és a megnövekedett oszteolitikus aktivitás miatt [137].

A Cx43 fehérje szerepét az oszteolízis során *in vitro* és *in vivo* kísérletekkel is igazolták. A Cx43 hiányos oszteocita MLO-4 sejtvonal megnövekedett RANKL/OPG arányt mutat, ami fokozott oszteoklasztogenezist eredményez. Ezzel megegyezően a Cx43-hiányos egerekben növekszik a TRAP-pozitív oszteoklasztok száma és fokozódik

a csont lebontása [142]. Egy másik kísérletben megfigyelték, hogy a Cx43-hiányos oszteoblaszt sejteket az oszteoklaszt prekursor sejtekkel kokultúrában tenyésztve, az OPG csökkenése révén az oszteoklasztok száma megnövekszik, ami az oszteolízis fokozódását idézi elő [137].

Az oszteoblasztok *in vitro* differenciálódása során a Cx43 fehérje expresszió növekszik, akárcsak a GJ membráncsatornák száma [143]. A Cx43 az ERK aktivitásán keresztül szabályozza az oszteogenikus gének átírását. A Cx43-hiányos egér oszteoblasztok redukált differenciációt és mineralizációs potenciált mutatnak a BSP/OPN, az OCL és az I-es típusú kollagén expressziójának csökkenésén keresztül [144]. A fibroblaszt növekedési faktor 2 (FGF2) a Cx43 fehérjén keresztül képes oszteoblaszt differenciációt kiváltani. A FGF2 hatására a Cx43 CT doménje interakcióba lép a PKC fehérjével, ami az ERK aktivációján keresztül fokozza a Runx2 aktivitását és az oszteokalcin gén átírását [145]. A Cx43 funkció elvesztése az oszteoblasztokban az ERK aktiváció csendesítését eredményezi [146]. Az anabolikus hatású PTH a csontsűrűséget növeli a CREB és Runx2 transzkripciós faktorok aktiválása és az oszteoblasztok proliferációját szabályozó gének átírása révén, illetve gátolja az oszteoblasztok apoptózisát az antiapoptotikus BAD fehérje foszforilációján keresztül [147]. A Cx43 deficiens egerekben sem a csont képzés, sem az oszteoblasztok száma nem növekszik PTH kezelés hatására [148].

A Cx43 a csontokat érő mechanikai stresszhez való adaptációban és a mechanikai terhelésre bekövetkező válaszreakció sejtek közötti továbbításában játszik szerepet. A mechanikai terhelés az oszteoblasztokban és a velük kapcsolt oszteocitákban szinkronizált Ca^{2+} hullámot indít el a GJ csatornákon keresztül. Az ATP kiáramlása és purinerg receptorhoz való kötődése a sejtekben aktiválja a PKC fehérjét, amely az IP3 másodlagos hírvivő keletkezésén keresztül az intracelluláris raktárakból Ca^{2+} kiáramlást eredményez [149]. A folyadékáramlás által kiváltott stressz a Cx43 félcsatornák nyitását és a prosztaglandin E2 (PGE2) kiáramlását idézi elő az oszteocita sejtekben. A PGE2 a prosztaglandin E2 receptoron (PE2) keresztül autokrin vagy parakrin módon képes szabályozni a Cx43 fehérje expressziót és a GJ csatorna kialakulását a szomszédos oszteocita sejtek között [150]. Az alacsony denzitású oszteocita MLO-Y4 sejtvonal kevés GJ csatornát képez, ami megnövekedett PGE2 kiáramlást eredményez a GJ csatornákat képző magas denzitású sejt kultúrákhoz képest. Ez a megfigyelés arra utal, hogy a

félcsatorna szerepe fontos a mechanikai szignálok közvetítésében a PGE2 kiáramlásán keresztül [151]. A PGE2 a PE2 receptorhoz kötődve a cAMP intracelluláris szintjének növekedését eredményezi. Ezen kívül a PKA vagy az AKT/PI3-K jelút aktivációján keresztül a glikogén szintáz kináz-3 β (GSK-3 β) fehérjét inaktíválja, aminek következtében szabályozza a β -katenin fehérje sejtmagba való transzlokációját és a Cx43 gén transzkripcióját [152].

A Cx43 félcsatorna az oszteociták apoptózisának szabályozásában is szerepet játszik. A biszfoszfonát, alendronát-kezelés a Cx43 félcsatorna konformációváltozását és átmeneti nyitását eredményezi. Ez a változás lehetővé teszi a Cx43 és az Src interakcióját, ami az utóbbi foszforilációját okozza. A foszforilált Src a citoplazmában levő ERK1/2 fehérjéket aktiválja [153]. A foszforilált ERK1/2 szubsztrátját, a p90^{RSK} kinázt aktiválja, amely a BAD és a C/EBP β proapoptotikus fehérjék foszforilációján keresztül gátolja az oszteoblasztok és oszteociták apoptózisát [154].

A Cx43 fehérje által felépített GJ csatornák jelenléte elengedhetetlen a csont felületén levő oszteoblasztok és a merev csontmátrixban elhelyezkedő oszteociták közötti tápanyag transzportban [155].

2. CÉLKITŰZÉSEK

A kontrollált oszteoklasztogenezist elsősorban az oszteoblasztok által termelt citokinek szabályozzák. Óriássejtes csonttumorban az oszteoblaszt eredetű stromasejtek neoplasztikus természetét kromoszómális instabilitásuk, telomer asszociációk és gyakori hiszton H3F3A mutációjuk bizonyítja, ami deregulált, fokozott oszteoklasztogenezist eredményez. Vizsgáltuk a normál csontképződésben fontos szerepet játszó EGFR jelút, valamint a Cx43 sejtmembrán-csatornákon megvalósuló direkt sejt-sejt kommunikáció szerepét az óriássejtes csonttumor kialakulásában és progressziójában.

Munkám célkitűzései ennek megfelelően tanulmányozni a GCTB-ben:

1. Az EGFR fehérje expresszió és a tumor recidívakészségének, valamint az agresszivitásának viszonyát.
2. Az EGFR fehérje megnövekedett termelődése háttérben igazolható-e az EGFR gén amplifikációja, illetve az EGFR gén tirozin kináz domének mutációja.
3. Az EGF hatását a GCTB stromasejtek proliferációjára, differenciálódására, illetve az oszteoklasztogenezisre és az oszteoblasztok aktivitására.
4. A Cx43 fehérje expresszió, a tumor agresszivitás és a progressziómentes túlélés (PFS) kapcsolatát.
5. Tenyésztett GCTB stromasejtekben a Cx43 mRNS és fehérje szintű expresszióját, a csatornák szubcelluláris lokalizációját és a csatornafunkciókat, kontroll csontvelői stromasejtekhez, illetve fibroblaszt sejtvonalhoz viszonyítva.

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. Beteganyag

Vizsgálatainkhoz az EuroBonet, EU FP6-os konzorcium keretében összesen 267 beteg (EGFR tanulmányban: 118 SE és 149 IOR; illetve a Cx43 tanulmányban: 123 IOR) formalinban rögzített, paraffinba ágyazott GCTB mintáját vizsgáltuk, amelyeket 1977 és 2005 között a Semmelweis Egyetem Ortopédiai Klinikán (SE, Budapest, Magyarország), illetve 1994 és 2005 között a Rizzoli Ortopédiai Intézetben (Istituto Ortopedico Rizzoli - IOR, Bologna, Olaszország) diagnosztizáltak és gyűjtöttek. A vizsgált esetek klinikopatológiai adatait, mind az EGFR-re, mind a Cx43-ra vonatkoztatva az **1. táblázat** tartalmazza. A Cx43 expresszió vizsgálati anyagának klinikai követési adatait a **2. táblázat** foglalja össze.

1. táblázat. A GCTB esetek klinikopatológiai adatai

	SE	IOR	Összes
Esetszám	118	149	267
Mintaszám	167	203	370
TMA core minta szám (2 mm)	210 (3 x 70)	310 (3 x 80 + 1 x 70)	520 (4 x 70 + 3 x 80)
Primer nem rekurrens	77 (A5/Ag2/La2)	82 (A17/Ag14/La33)	169 (A22/Ag16/La35)
Primer rekurrens	32 (A9/Ag7/La6)	30 (A5/Ag5/La3)	62 (A14/Ag12/La9)
1. recidíva	30 (A8/Ag2/La1)	39 (A6/Ag8/La8)	69 (A14/Ag10/La9)
2. recidíva	11 (A5/La1)	9 (A1/Ag1/La1)	20 (A6/Ag1/La2)
3. recidíva	3 (A1/La1)	4 (A2/La1)	7 (A1/Ag3/La1)
4. recidíva	1 (Ag1)	-	1 (Ag1) (A57/Ag43/La56)
Tüdő bólus (metasztázis)	-	16 (1 csontvelő)	17
GCTB/GC szarkóma (malignus)	3	4	7/26
GC szarkóma (malignus)	11	8	19/26
Lokalizáció Femur	L30 R26 (56)	L13 R36 (49)	105
Tibia	L21 R23 (44)	L27 R21 (48)	92
Rádus	L14 R24 (38)	L9 R3 (12)	50
Pelvisz/szakrum	6	27	33
Egyéb	23	50	73
Összes	167	186 (metasztázis kivételével)	353
Átlag életkor	35,4 (12-71) SD 13,3	34,4 (5-76) SD 15,04	34,8 (5-76) SD 14,4
Nem (nő/férfi)	98/69	109/94	207/163
Átlag követési idő (hónap)	136 (10-528)	73,3 (26-528)	107,4 (10-528)
Elsődleges kezelés	küret + lokális adjuváns (fenol) és autológ csont graft vagy csontcement	küret + lokális adjuváns (fenol) és metil metakrilát vagy csont örlemény; Radioterápia (szakrum): 30-56 Gy	
Teljes rekurrencia	25% (SEM-en kezelt)	26,1% (IOR-ban kezelt)	
Teljes túlélés	108/118 (91,5%) Dead: 10 (85%) CNED: (46,6%); NED2: (38,1%); AWD: (6,8%)	140/149 (94%) Dead: 9 (6,0%); CNED: 83 (55,7%); NED2: 52 (34,9%); AWD: 5 (3,4%)	

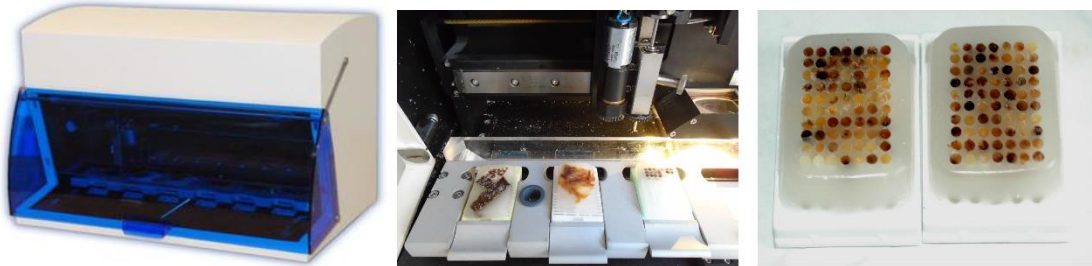
SE: Semmelweis Egyetem, Budapest; **IOR:** Rizzoli Ortopédiai Intézet, Bologna, Olaszország; **GCTB:** óriássejtes csonttumor; **GC:** óriássejt; **L:** bal; **R:** jobb; **A:** aktív; **Ag:** agresszív; **La:** látens; **CNED:** folyamatos betegség mentes; **NED₂:** betegségmentes rekurrencia után (lokális vagy metastázis); **AWD:** stabil, áttéti daganattal él.

2. táblázat. A GCTB esetek klinikai lefolyása (IOR esetek)

Progresszió típusa	Klinikai lefolyás	Betegek száma (%) alcsopontonként	Lokalizáció
Áttéti daganattal él	Csont metasztázis	1 (0,8)	
	Tüdő metasztázis	3 (2,4)	
Folyamatosan betegségmentes	Primer tumor	69 (56,1)	
	Recidív tumor betegségmentes klinikai lefolyással	24 (19,5)	
A tumorról kapcsolatos halál	Első recidíva; komplikáció a műtét napján	1 (0,8)	szakrum
	Primer tumor; majd malignus szarkóma, utána 3 egymást követő tüdő áttét	1 (0,8)	proximális humerusz (jobboldali)
	Első recidíva; majd újabb recidíva, malignus szarkóma, majd ennek helyi recidívája	1 (0,8)	szakrum
	Primer tumor; majd recidíva, majd malignus szarkóma, végül 2 egymást követő recidíva	1 (0,8)	szakrum
	Primer tumor; majd malignus szarkóma és tüdő áttét	1 (0,8)	humerusz (baloldali)
	Első recidíva; majd 2 egymást követő recidíva, majd malignus szarkóma, majd ennek recidívája	1 (0,8)	femur (jobboldali)
	Primer tumor; majd recidíva, majd „stroke” okozta halál	1 (0,8)	
	Primer tumor; majd recidíva, majd „stroke” okozta halál	1 (0,8)	
Lokális recidíva, vagy áttét a betegség során	Egy recidíva a követésig	12 (9,6)	
	Két recidíva a követésig (4 primer tumor; egy első recidíva és egy 3. recidíva)	6 (4,9)	
	Primer tumor, majd egy tüdő áttét, utána egy helyi recidíva a követésig	1 (0,8)	
Összesen		123	

3.2. Szöveti multiblokkok (TMA) készítése

Az archivált szövetblokkokból duplikátum mintákat gyűjtve számítógép-vezérelt, automatizált TMA Master (3DHISTECH Ltd., Budapest, Magyarország) készülékkel szöveti multiblokkokat (TMA) készítettünk (7. ábra).



7. ábra. Számítógép-vezérelt félautomata szöveti multiblokk (TMA) készítő berendezés és két elkészült TMA blokk.

A GCTB donor blokkok hematoxin-eozin (HE) festett metszetei alapján oszteoklasztokban gazdag reprezentatív 2 mm átmérőjű szövethengereket emeltünk ki és helyeztünk 70 mintás recipiens paraffin blokkokba. A mintákból így 4 darab 70 mintát (IOR), illetve 3 darab 80 mintát (SE) tartalmazó TMA blokk készült, amelyekből rotációs mikrotommal 3-4 μm vastag metszeteket készítettünk adhéziós tárgylemezekre (SuperFrost Ultra Plus, Menzel-Gläser, Braunschweig, Németország).

3.3. Immunhisztokémia és immuncitokémia

3.3.1. Immunhisztokémia TMA metszeten

A TMA blokkokból készült metszeteket 2 x 3 percig xilolban deparaffináltuk, majd 2 x 3 perces 96%-os etanolos kezelés után rehidráltuk. Az endogén peroxidáz aktivitást 20 percig 0,5%-os (v/v) H_2O_2 metanol oldattal blokkoltuk. Fluoreszcens detektálásnál ezt a lépést kihagytuk. Az antigénfeltárást pH 9,0-es, 0,1 M Tris és 0,01 M EDTA (Tris-EDTA) pufferek keverékében vagy pH 6,1-es TRS oldatban (Target Retrieval Solution; Dako, Glostrup, Dánia) mikrohullámú sütőben (Whirlpool, TJ366, Benton Harbor, MI, USA) 800 W teljesítmény mellett, 40 percig végeztük. A metszeteket 5 percig Tris-pufferelt sóoldat (TBS), 0,05%-os (v/v) Tween20 detergenst tartalmazó (TBST) oldatával mostuk. A nem-specifikus protein-kötőhelyeket 5%-os (w/v) marha

szérum-albumin (bovine serum albumin, BSA; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) TBST pufferrel (BSA-TBST) 20 percig blokkoltuk, majd a metszeteket 1% (w/v) BSA-TBST-ben hígított primer antitestekkel egy éjszakán át inkubáltuk. Az immunkötések kimutatásához NovoLink detektálórendszert használtunk (Novocastra, Leica Biosystems, Wetzlar, Németország). A post-primer reagenssel 30 percig, majd a torna-peroxidáz (HRP) enzimmel konjugált anti-nyúl/egér IgG polimerrel (Novolink polimer) 30 percig inkubáltuk a metszeteket, végül a HRP enzimaktivitást 3,3'-diaminobenzidin (DAB) és H₂O₂ kromogén-szubsztrát kit-el (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) tettük láthatóvá. A kettős immunfestés során azonos állatfajú, egér primer antitesteket kombináltunk. A DAB reakciót követően a lemezeket TBST-ben hígított α -SMA vagy CD163 primer antitestekkel inkubáltuk 60 percig. Ezt követően a metszeteket 60 percig alkalikus foszfatáz (ALP) enzimmel konjugált ló anti-egér IgG (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) másodlagos antitest 1:300 hígítású keverékével inkubáltuk. Az ALP enzimreakciót Permanent Red kromogén-szubsztrát detektáló kit (Dako) segítségével hívtuk elő. A sejtmagokat hematoxilinnel festettük, majd a metszeteket Faramount (Dako) vizes fedőanyaggal fedtük. A kettős immunfluoreszcens jelöléshez a primer antitestek után a metszeteket 90 percig sötétben Alexa Fluor 546 piros színű fluorokrómmal konjugált kecske anti-nyúl IgG (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) és Alexa Fluor 488 zöld színű fluorokrómmal konjugált kecske anti-egér IgG (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) másodlagos antitestek 1:200 hígítású keverékével inkubáltuk. A sejtmagokat TBS-ben oldott Hoescht (1:1000, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) reagenssel kékre festettük, majd fluoreszcens fedőanyaggal (Dako) fedtük, és 4 °C-on egy éjszakán át száradni hagytuk. Az inkubálásokat nedves kamrában szobahőmérsékleten végeztük, a lépések között a metszeteket 3 x 3 percig TBST pufferrel mostuk. Negatív kontrollként a primer antitestek egér, illetve nyúl normál szérummal 1:100-as hígításban történő helyettesítése szolgált. A primer antitestek specifikációját és immunhisztó- és immuncitokémiai alkalmazásuk körülményeit az **3. táblázat** foglalja össze.

3. táblázat. Az értekezésben használt immunreagensok és alkalmazásuk körülményei

Antigén specifitás	Faj és antites klón (Cat. No)	Gyártó	Hígítás		Antigén feltárás IHC	Detektálás	
			IHC/ICC	WB		IHC/ICC	WB
EGFR	Egér monoklonális 3C6	Ventana- Roche	1:1 (RTU)	-	TRS	DAB	-
EGFR	Egér monoklonális 2-18C9	Dako	FDA kit	-	TRS	DAB	-
pEGFR (pY1173)	Nyúl monoklonális E124	Epitomics	1:100	-	TRS	DAB	-
pEGFR (pY1068)	Nyúl monoklonális Y38	Epitomics	1:200	-	TRS	DAB	-
EGF	Egér monoklonális EGF-10	Abcam	1:100	-	TRS	DAB	-
TGFα	Nyúl poliklonális (Rb-9241)	LabVision- Thermo	1:100	-	TRS	DAB	-
α-SMA	Egér monoklonális 1A4	Dako	1:1 (RTU)	-	TE	Permanent red	-
CD11c	Egér monoklonális 5D11	NovoCastr -Leica	1:200	-	TRS	DAB	-
CD163	Egér monoklonális 10D6	LabVision- Thermo	1:100	-	TE	Permanent red	-
TRAP	Egér monoklonális 26E5	LabVision- Thermo	1:300	-	TRS	DAB	-
VNR	Egér monoklonális 23C6	Serotec	1:400	-	-	DAB	-
Vimentin	Egér monoklonális V9	Dako	1:2 (RTU)	-	-	IF	-
Cx43	Nyúl poliklonális (3512)	Cell Signaling	1:100	1:100	TE	DAB/IF	ECL
β-aktin	Nyúl monoklonális 13E5 (4970)	Cell Signaling	-	1:2000	-	-	ECL

IHC: immunhisztokémia; **ICC:** immuncitokémia; **WB:** Western blot; **RTU:** szobahőmérséklet; **TRS:** Target Retrieval Solution; **TE:** Tris-EDTA; **DAB:** diamino benzidin; **IF:** immunfluoreszcens; **ECL:** kemilumineszcens.

3.3.2. Immuncitokémia sejttenyészeteken

Az immuncitokémiai vizsgálatokhoz 24 lyukú sejttenyésztő edénybe helyezett 12 mm átmérőjű steril üveg fedőlemezekre 3×10^4 sejtet növesztettünk. A médium eltávolítása és TBS-es mosás után a sejteket jéghideg 4%-os paraformaldehiddel (PFA) 10 percig szobahőmérsékleten rögzítettük, majd 2 x 5 percig TBS-sel végzett mosás után 10 percig szobahőmérsékleten permeabilizáltuk 0,1%-os (v/v) Triton X-100-TBS oldatban. A nem-specifikus fehérjekötő helyeket 30 percig nedves kamrában szobahőmérsékleten 5%-os (w/v) BSA-TBST oldattal blokkoltuk. Ezt követően a sejteket 1%-os (w/v) BSA-TBST oldatban hígított elsődleges ellenanyaggal egy éjszakán át nedves kamrában 4 °C-on inkubáltuk. Másnap 2 x 5 perces TBST mosás után az immunhisztokémia (3.3.1) fejezetben a kettős immunfluoreszcens jelölés során leírt módszert alkalmaztuk. Az immuncitokémia során használt ellenanyagok és hígításaik a **3. táblázatban** láthatók.

3.4. Sejttenyésztés

3.4.1. Sejttenyészetek előállítása és fenntartása

A Semmelweis Egyetem Ortopédiai klinikáról gyűjtött műtéti GCTB és normál csontvelő mintákból stromasejteket izoláltunk és sejttenyészeteket hoztunk létre. A mintákat steril Petri-csészében steril foszfát-pufferelt sóoldattal (PBS) átmostuk, majd 100 U/ml penicillinnel (Sigma-Aldrich) és 10 µg/ml sztreptomicinnel (Sigma-Aldrich) kiegészített alfa-minimum esszenciális tápfolyadékban (α -MEM; Lonza, Basel, Svájc) steril ollóval és szikével 2 mm nagyságú darabokra vágtuk. A szövetdarabokat 30-60 percig, enyhe rázatás mellett 15 ml-es centrifugacsőben emésztettük 0,7 mg/ml kollagenáz I-et (Sigma-Aldrich), 0,5 mg/ml deoxiribonukleázt (Sigma-Aldrich) és 0,04 mg/ml hialurodinázt (Sigma-Aldrich) tartalmazó α -MEM sejttenyésztő oldatban 37 °C-on, 5%-os CO₂ szint mellett, nedves termosztátban. A szöveti lizátumokat 100 µm pórusú szűrőn (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) átszűrtük és 10 percig 270 x g-vel centrifugáltuk. A leülepedett sejtek 20% (v/v) magzati szarvasmarha savót (FBS; Sigma-Aldrich), 10 mM L-glutamint (Gibco, Thermo Fisher Scientific), 100 U/ml penicillint és 10 µg/ml sztreptomicint tartalmazó α -MEM tápfolyadékban reszuszpendáltuk, A

sejtszuspenziókat 25 cm² alapterületű sejttenyésztő edényekben (Corning Inc., Corning, NY, USA) 37 °C-on, 5%-os CO₂ szint mellett, nedves termosztátban inkubáltunk. Másnap a nem adherens sejteket a tápfolyadék cseréjével eltávolítottuk. A tápfolyadékot 2-3 naponta frissre cseréltük. A sejteket 90%-os konfluencia szintig tenyésztettük, majd 0,01% (w/v) tripszin és 0,05% (w/v) EDTA (tripszin-EDTA; Gibco, Thermo Fisher Scientific) hozzáadásával passzáltuk. Néhány passzázs után a multinukleáris óriássejtek és a monociták eltűntek, így tiszta, GCTB és csontvelői stromasejt tenyészetet kaptunk. A kontrollként használt felnőtt humán dermális fibroblaszt sejtvonalat (HDFa; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 5 ml Low Serum Growth Supplement-tel (LSGS; Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) kiegészített Medium 106 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) tápfolyadékban, az egér koponya eredetű oszteoblaszt sejtvonalat (2T3) [156] α -MEM tápfolyadékban, míg a humán nem-kissejtes tüdőrák (NSCLC) sejtvonalakat (H1650, H1975 és H358; ATCC, Manassas, VA, USA) 10% (v/v) FBS-t (Sigma-Aldrich), 10 mM L-glutamint (Gibco) és 100 U/ml penicillint és 10 μ g/ml sztreptomocint tartalmazó RPMI-1640 (Lonza) tápfolyadékban növesztettünk.

3.4.2. Perifériás vér mononukleáris sejtek (PBMC) szeparálása és oszteoklaszt differenciációs képesség *in vitro* vizsgálata

A humán perifériás vér mononukleáris sejteket (PBMC) három egészséges páciens heparinizált vénás véréből Ficoll (Sigma-Aldrich) sűrűség-gradiens centrifugálással nyertük ki. A vérmintákat α -MEM tápfolyadékkal kétszeresére hígítottuk, majd 15 ml Ficoll tetejére rétegeztük és 693 x g-n 20 percig centrifugáltuk. A szeparálás után a plazma és a Ficoll réteg határán feldúsuló PBMC réteget pipettával leszívtuk és α -MEM tápfolyadékban 300 x g-n 10 percig centrifugáltuk. A sejtledeket 20% (v/v) FBS-t, 10 mM L-glutamint, 100 U/ml penicillint és 10 μ g/ml sztreptomocint tartalmazó α -MEM tápfolyadékban reszuszpendáltuk, majd 6 lyukú sejttenyésztő edénybe helyezett 4 mm átmérőjű dentin lemezekre, illetve 6 mm átmérőjű üveg fedőlemezekre 1 x 10⁶ denzitásban rétegeztük. Ezután a lemezeket inkubáltuk 2 órán keresztül 37 °C-on, 5%-os CO₂ szint mellett, nedves termosztátban. A le nem tapadt sejteket PBS mosással eltávolítottuk. A dentin lemezeket és az üveg fedőlemezeket α -MEM tápfolyadékot tartalmazó 24 lyukú sejttenyésztő edénybe helyeztük át és 25 ng/ml M-CSF (R&D Systems, Abingdon, Egyesült Királyság), 50 ng/ml RANKL (Perotech,

London, Egyesült Királyság), 25 ng/ml M-CSF + 50 ng/ml RANKL (pozitív kontroll), 25 ng/ml EGF (Sigma-Aldrich) + 25 ng/ml M-CSF, 25 ng/ml EGF + 50 ng/ml RANKL, és 25 ng/ml EGF + 25 ng/ml M-CSF + 50 ng/ml RANKL hozzáadásával kezeltük. A citokineket tartalmazó sejtenyészítő tápfolyadékot minden harmadik nap frissre cseréltük. A TRAP detektálásához a sejteket 14 napos inkubációs időt követően PBS oldattal mostuk és az üveglemezekre ránőtt sejteket 4%-os formalinban 10 percig fixáltuk, majd desztillált vizes mosás után szobahőmérsékleten száradni hagytuk. A reakció előhívásához 0,1 mg/ml naftol AS-MX foszfátot (Sigma-Aldrich), 0,5 mg/ml Fast Red Violet B sőt (Sigma-Aldrich) és 50 mM nátrium-tartarátot tartalmazó 0,1 M nátrium-acetát puffert (pH 5,0) használtunk, amelyekkel 30 percig, szobahőmérsékleten, fénytől védett helyen inkubáltuk a sejteket. A üveg fedőlemezek egy részét 10 percig acetonnal fixáltuk. Ezt követően a vitronektin receptort (VNR) az immunohisztokémiai **(3.3.1)** fejezetben leírt módon tettük láthatóvá. Az oszteoklasztok aktivitását és reszorpciós képességét a dentin lemezeken keletkezett reszorpciós lakúnák mérete alapján határoztuk meg. A dentin lemezeket 30 percig 1 N NH₄OH oldatba helyeztük és a letapadt sejteket ultraszonikálással távolítottuk el. A dentin lemezeket 3 percig 0,5%-os (w/v) bórsavban oldott 0,5%-os (w/v) toluidin kék oldattal (pH 7,2-7,4) festettük meg és szobahőmérsékleten száradni hagytuk. A reszorpciós lakúnákról felvételeket készítettünk reflexiós mikroszkóppal, amihez 200x-os nagyítást és OLYMPUS C4040 Z típusú kamerát használtunk. A dentin lemezeken a reszorpciós területek méretét ImageJ software (NIH) segítségével határoztuk meg.

3.4.3. GCTB stromasejt proliferáció *in vitro* vizsgálata és a sejtviabilitás meghatározása

A GCTB stromasejteket 96 lyukú sejtenyészítő edénybe 10³ sejt/lyuk sűrűségben raktuk ki és 0,5% (v/v) FBS-t, 10 mM L-glutamint, 100 U/ml penicillint és 10 µg/ml sztreptomocint tartalmazó α-MEM tápoldatban tenyésztettük, amit 0, 10, 25, 50 és 100 ng/ml végkoncentrációjú EGF-el egészítettünk ki. A sejteket az 1, 3, 6 és 9 nap után 20 µl Cell Titer-Blue[®] Reagent (Promega, Southampton, Egyesült Királyság) oldattal inkubáltuk 90 percig, 37 °C-on, 5%-os CO₂ tartalmú termosztátban. A metabolikusan aktív sejtekben a gyengén fluoreszcens, kék színű resazurin dehidrogenázok hatására redukálódik, és erősen fluoreszcens, rózsaszín színű resorufin keletkezik. A resorufin

mennyiségét Fluoroskan Ascent™ FL Microplate Fluorométerrel (Thermo Fisher Scientific) 540 nm-es gerjesztő hullámhossz mellett 590 nm-en detektáltuk. A mért fluoreszcencia intenzitása arányos az élő sejtek számával.

3.4.4. GCTB stromasejt differenciációs képesség *in vitro* vizsgálata

A GCTB stromasejteket 24 lyukú sejtenyésztő edénybe 5×10^5 sejt/lyuk sűrűségben raktuk ki és α -MEM tápfolyadékot, 10% (v/v) FBS-t, 10 mM nátrium- β -glicerofoszfátot, 100 μ m aszkorbátot és 10^{-8} M dexametazont tartalmazó oszteogenikus differenciációs médiumban tenyésztettük, amit a proliferációs kísérletben alkalmazott EGF koncentrációkkal egészítettük ki. Egy hét inkubálás után a sejteket és a pozitív kontrollként használt 2T3 sejtvonalat 4%-os formalinban fixáltuk, desztillált vízzel mostuk és szobahőmérsékleten szárítottuk. Az oszteoblasztok ALP enzimaktivitását 0,25%-os naftol AS-MX foszfát szubsztrát és Fast Violet B kromogén keverékével 20 perces, sötétben történő inkubálás után tettük láthatóvá. A megfestett sejteket desztillált vízzel mostuk és szárítás után az ALP enzimaktivitást az oszteoklaszt differenciálódás (3.4.2) fejezetben leírt módon vizsgáltuk.

3.5. Fluoreszcens *in situ* hibridizáció (FISH)

3.5.1. FISH TMA metszeteken

Az EGFR gén kópiaszám meghatározását TMA metszeteken kétszínű centromer- és lókuszt-specifikus ZytoLight® EGFR/CEP7 Dual Color Probe Kit-el (ZytoVision GmbH, Bremerhaven, Németország) végeztük. Deparaffinált metszeteken az antigén feltárás 0,01 M-os, pH 6,0-os citrát pufferben 98 °C-on, 15 percig történt. A mintákat a citrát pufferben 10 percig hűlni hagytuk, majd pepszines emésztést [50 ml desztillált víz, 500 μ l 1 M-os sósav és 50 μ l 10% pepszin (Sigma-Aldrich) keveréke] végeztünk 37 °C-os vízfürdőben 13 percig. Kétszeres nátrium-citrát (SSC) pufferben végzett mosás után a mintákat felszálló etanol sorban (70%, 80%, 98%) víztelenítettük. Szárítás után a mintákhoz 7,5 μ l próbát adtunk, majd üveg fedőlemezzel lefedtük és szilikon ragasztóval (Fixogum, Marabu, Bietigheim, Németország) körberagasztottuk, hogy meggátoljuk a próba elpárolgását. A metszeteket FISH Hybridizer (Dako) készülékbe tettük, majd a

próba és a minták DNS-ének párhuzamos denaturálása következett 75 °C-on, 10 percig, amit a hibridizációs lépés követett 37 °C-on egy éjszakán át. A használt FISH próbák adatait a **4. táblázatban** foglaltuk össze. Másnap a ragasztó és az üveg fedőlemezek eltávolítását követően a lemezeket vízfürdőben, 72 °C-ra előmelegített 1x-es mosó pufferben 2 x 5 percig mostuk, majd felszálló etanol sorban (70%, 80%, 98%) víztelenítettük. Száradás után a metszeteket 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI-Antifade; ZytoVision) magfestő oldattal fedtük. A metszeteket sötétben, 4 °C-on egy éjszakán át száradni hagytuk. A 20 darab kéken megfestett sejtmagban a narancssárga (CEN) és zöld (CEP7) színű szignálok számát és arányát számoltunk.

4. táblázat. FISH próbák és tulajdonságaik

Próba neve	Lókuszt	Gyártó	Cat. No	Fluorokróm	Excitáció	Emisszió
SPEC EGFR/CEN 7	7p12 és 7p11.1-q11.1	ZytoVision	Z-2053-5	ZyGreen ZyOrange	503 nm 547 nm	528 nm 572 nm
CEP 3 (D3Z1)	3p11.1-q11.1	Vysis, Abott Molecular Inc.	06J36- 013	Spectrum Orange	559 nm	588 nm
CEP 4	4p11-q11	Vysis, Abott Molecular Inc.	06J37- 014	Spectrum Green	497 nm	524 nm
CEP 6 (D6Z1)	6p11.1-q11	Vysis, Abott Molecular Inc.	06J37- 016	Spectrum Green	497 nm	524 nm
CEP 6 (D6Z1)	6p11.1-q11	Vysis, Abott Molecular Inc.	06J36- 016	Spectrum Orange	559 nm	572 nm
CEP X (DXZ1)	Xp11.1-q11.1	Vysis, Abott Molecular Inc.	05J09- 033	Spectrum Aqua	433 nm	480 nm
TelVysion 11p	D11S2071	Vysis, Abott Molecular Inc.	05J03- 021	Spectrum Green	497 nm	524 nm

3.5.2. FISH sejtenyészeteken

Az izolált GCTB stromasejtek neoplasztikus eredetét a kromoszómák számbeli és strukturális eltérései alapján multicolor FISH segítségével határoztuk meg. Ennek során a 3-as, a 4-es és a 6-os kromoszómák, valamint az X kromoszóma centromerájára-specifikus alfa-szatellita, illetve 11p szubtelomerikus és 11-es kromoszóma centromerájára-specifikus alfa-szatellita próbakeverékeket használtunk. A sejteket Carnoy oldattal (metanol: ecetsav, 3:1 arányú keveréke) 10 percig, szobahőmérsékleten fixáltuk, majd üveg tárgylemezre cseppentettük és hagytuk megszáradni. Desztillált vizes mosást követően a mintákat 2x-es SSC-vel mostuk szobahőmérsékleten, 15 percig. Újabb desztillált vizes mosás után a minták emésztése pepszin oldatban [50 ml desztillált víz, 500 µl 1 M-os sósav és 50 µl 10% (w/v) pepszin keveréke] 37 °C-os vízfürdőben, 5 percig történt. A mintákat ismételten desztillált vízzel mostuk, majd felszálló etanol sorban (70%, 80%, 98%) víztelenítettük és hagytuk megszáradni. A mintákhoz 3 µl CEP hibridizációs pufferben (Vysis, Abbott Molecular Inc., Lake Bluff, IL, USA) és 1 µl desztillált vízben oldott 6 µl próbakeveréket tartalmazó oldatot adtunk. A mintákat üveg fedőlemezzel lefedtük és szilikonragasztóval körberagasztottuk. A használt FISH próbák adatait a **4. táblázatban** foglaltuk össze. A minták DNS-ét és a próbákat FISH Hybridizer (Dako) készülékben 85 °C-on, 10 percig denaturáltuk, amit a hibridizációs lépés követett 37 °C-on, egy éjszakán át. Másnap a ragasztó és az üveg fedőlemezek eltávolítását követően a lemezeket vízfürdőben, 72 °C-ra előmelegített 0,4x-es SSC oldatban 2 percig, majd 2x-es SSC és 0,1%-os (v/v) Nonidet P-40 (NP-40; Sigma-Aldrich) szobahőmérsékletű oldatában mostuk szintén 2 percig. Ezzel a két mosási lépéssel távolítottuk el a nem kötődött DNS próbákat. A metszeteket desztillált vizes öblítés után sötétben szárítottuk. A fedési lépés megegyezik a FISH TMA metszeteken **(3.5.1)** fejezetben leírotakkal.

3.6. Nukleinsav izolálás

3.6.1. Teljes RNS izolálás

Az RT-PCR analízishez a GCTB és csontvelői stromasejt tenyészetekből, illetve a HDFa sejtvonalból teljes RNS-t izoláltunk RNeasy® Mini Kit-el (Qiagen, Hilden,

Németország). A médium eltávolítása és PBS-sel történő mosás után a sejteket 600 µl RLT puffer hozzáadásával lizáltuk, majd egy Eppendorf csőben a lizátumot 600 µl 70%-os etanollal szuszpendáltuk. Az oldatot RNeasy Mini spin oszlopon 30 másodpercig 8000 x g-vel centrifugáltuk. Az oszlop szilikagél alapú membránja a 200 bp-nál hosszabb RNS-eket köti meg. Az oszlopot RW1 mosópufferrel 30 másodpercig 8000 x g-vel centrifugáltuk. A szilikagélhez kötött genomi DNS eltávolításához az oszlopot 80 µl RNase-free DNase (Qiagen) (70 µl RDD puffer + 10 µl DNáz törzsoldat) enzimmel 15 percig inkubáltuk. Ismételten RW1 pufferrel, majd RPE pufferrel centrifugálva mostuk, az utóbbi lépést megismételve. Végül RNázmentes desztillált vízzel 8000 x g-n végzett centrifugálás után az eluált, tisztított, teljes RNS-t steril Eppendorf csőbe gyűjtöttük, amit a további felhasználásig fagyasztva tároltuk -80 °C-on.

3.6.2. DNS izolálás

A TMA blokkokból készült 3-5 db 5 µm vastagságú metszetet Eppendorf csőben 2 x 10 percig xilollal deparaffináltuk, majd 2 x 10 percig abszolút alkohollal mostuk. Minden ismétlésnél a mintákat 5 percig 13000 x g-n centrifugáltuk, majd a felülúszót eltávolítottuk. A keletkező csapadékot 400 µl lízispufferben [10 mM Tris-HCl, 400 mM NaCl, 2 mM EDTA és 5% (w/v) nátrium-dodecil-szulfát (SDS)] szuszpendáltuk, majd 50 µl 5 mg/ml-es proteináz-K (Sigma-Aldrich) oldat hozzáadása után 50 °C-on 16 órán keresztül, enyhe rázatás mellett emésztettük. Az enzimet 90 °C-on 5 percig tartó hőkezeléssel inaktiváltuk. Ezután a mintákat 10 percig 13000 x g-n centrifugáltuk, majd a felülúszót egy tiszta Eppendorf csőben 300 µl 3,3 M-os amónium-acetát oldat és 5 µl glikogén hozzáadásával 15 percig jégen tartottuk. Ezután 10 percig 13000 x g-n végzett centrifugálással az oldatból eltávolítottuk a kicsapódott fehérjéket. A felülúszót egy tiszta Eppendorf csőbe gyűjtöttük és 1 ml -20 °C-os izopropanolt és 5 µl glikogént adtunk hozzá, amelyet végül 4 °C-on 15 percig 13000 x g-n centrifugáltuk. A pelletet 1 ml -20 °C-os 70%-os etanollal mostuk, majd ismét 4 °C-on 15 percig 13000 x g-n centrifugáltuk. Végül a pelletet levegőn száradni hagytuk, majd a csapadékban levő tisztított DNS-t 50 µl DEPC-el kezelt desztillált vízben oldottuk fel és további felhasználásig -20 °C-on tároltuk.

3.6.3. RNS és DNS koncentrációmérés

Az izolált DNS és RNS minta koncentrációját és tisztaságát NanoDrop™ ND-1000 UV-Vis (NanoDrop Tech., Houston, TX, USA) spektrofotométer segítségével megmértük. A minta DNS és RNS mennyiségét 260 nm-en mért abszorpciós érték alapján határoztuk meg, míg a minta tisztaságát 260/280 és 280/230 nm-en mért abszorbancia hányados alapján ellenőriztük.

3.7. EGFR tirozin-kináz domén mutáció vizsgálata

3.7.1. Polimeráz láncreakció (PCR)

Az EGFR gén 19-es és 21-es exonjait tartalmazó DNS szakaszokat fészek „nested” PCR segítségével amplifikáltuk két szekvencia-specifikus primerpár alkalmazásával, két egymást követő PCR reakcióban. Az első PCR reakcióban az úgynevezett külső primerpárral egy hosszabb PCR termék keletkezik. A második PCR reakció templátja az első lépés során keletkezett első PCR termék, amelyre specifikus belső primerpár kötődik, így egy rövidebb termék keletkezik. Ezzel a módszerrel a kis mennyiségben jelen levő cél DNS szakasz is kimutathatóvá válik. Az alkalmazott primereket az **5. táblázat** foglalja össze.

5. táblázat. Az EGFR-specifikus PCR reakció és szekvencia analízis során használt primerek

Név	Primer szekvenciája (5'→3')
19externalF	CTGGTAACATCCACCCAGATCACTG
19externalR	GAGATGAGCAGGGTCTAGAGCAGAG
19nestedF	CAGATCACTGGGCAGCATGTGG
19nestedR	CTAGAGCAGAGCAGCTGCCAGACAT
19mF	ATCCCAGAAGGTGAGAAAGATAAAATTC
21externalF	CTGAATTCCGATGCAGAGCTTCTT
21externalR	CATCCTCCCCTGCATGTGTAAA
21nestedF	GATGCAGAGCTTCTTCCCATGAT
21nestedR	GCATGTGTAAACAATACAGCTAGTGG

A PCR reakciót 25 µl végtérfogatban végeztük el Platinum® Taq DNS polimeráz. (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) enzim felhasználásával. A PCR reakcióelegy összetétele a **6. táblázatban** látható.

6. táblázat. A PCR reakció összetétele

Komponens	Mennyiség
High Fidelity PCR puffer (10x)	2 µl
dNTP mix (10 mM)	2 µl
MgSO ₄ (50 mM)	1 µl
Forward primer (10 µM)	1 µl
Reverse primer (10 µM)	1 µl
Platinum Taq DNS polimeráz (5 U/µl)	0,1 µl
DNS templát	100 ng
Desztillált víz	25 µl-ig

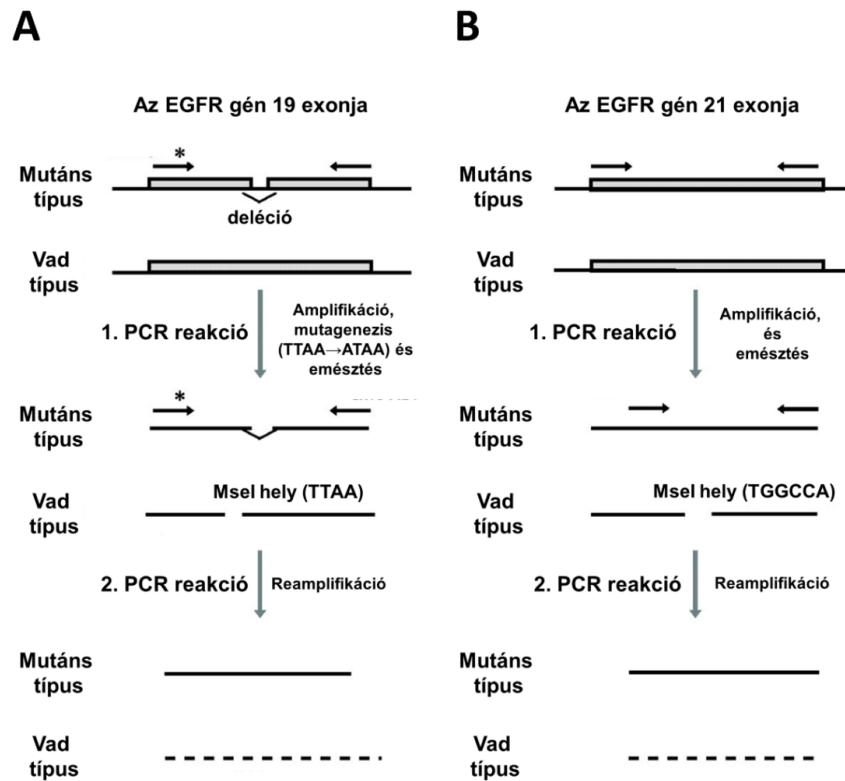
Az amplifikáció a Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) PCR készülékben touch-down PCR program szerint történt a **7. táblázatban** látható hőprofilnak megfelelően. A módszer lényege, hogy a kezdeti denaturációs lépés után ciklusonként 1 °C-al csökkentjük az anellációs hőmérsékletet (T_a). A PCR reakció a kezdeti lépésekben erősen specifikus, viszont hatásfoka alacsony. Így az elején kevés, de specifikus PCR termék keletkezik, amely már nagyobb hatékonysággal amplifikálódik a későbbi alacsonyabb anellációs hőmérsékletű ciklusok során.

7. táblázat. A PCR reakció hőprofilja

Lépés	Hőmérséklet	Idő	Ciklus szám
Kezdeti denaturáció	95 °C	2 min	1
Denaturáció	94 °C	30 s	10
Anelláció	62 °C (-1 °C/ciklus)	30 s	
Extenzió	72 °C	45 s	
Denaturáció	94 °C	30 s	30
Anelláció	52 °C	30 s	
Extenzió	72 °C	45 s	
Végső extenzió	72 °C	10 min	1
Hűtés	4 °C	∞	

3.7.2. Mutáció-dúsító PCR

A módszer többlépcsős PCR reakción alapul, lényege, hogy a vad típusú génszakaszt a mutáció lehetséges előfordulási helyén szelektíven hasítjuk, így az alacsony arányban előforduló mutáns allélt is ki lehet mutatni (**8. ábra**). A 19-es exon PCR termékét a 19mutF (forward) és 19nestedR (reverse) primer párokkal reamplifikáltuk. A 19mutF primer TTAA→ATAA mutagenézissel megszüntette az egyik olyan restriktions hasítási helyet, amelyiket a 19-es exon deléciója nem érinti. Az így kapott 1 µl PCR termék emésztése 1 UI MscI (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) restriktions enzimmel történt 37 °C-on, 4 órán keresztül, 5 µl végtér fogatban. Az enzim a vad típusú génben a 2239-2242 pozícióban elhelyezkedő TTAA szekvenciát hasítja, ami a mutáns típusú génben a 19-es exon deléciója miatt hiányzik, így nem emésztődik. A hasítási termék tisztítását Montage[®] PCR Centrifugal Filter Device (Millipore, Billerica, MA, USA) mikrofilter használatával végeztük el, a gyártó utasításai szerint. A tisztított terméket a 19mF (forward) és 19nestedR primerpárokkal újabb PCR reakcióval amplifikáltuk. Pozitív kontrollként a 19-es exon deléciót tartalmazó H1650 és vad típusú EGFR-t tartalmazó H358 sejtvonalak 3:97 arányú keverékét használtuk. A 21-es exon PCR termékét a 21nestedF és 21nestedR primerpárral reamplifikáltuk, majd 1 µl PCR terméket 1UI MscI (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) restriktions enzimmel, 37 °C-on, 4 órán keresztül, 5 µl végtér fogatban hasítottuk. Az enzim a vad típusú TGGCCA szekvenciát hasítja, amit a mutáns típusú génben a T2573G mutáció GGGCCA szekvenciává alakít. A hasítási termék tisztítását Montage[®] PCR Centrifugal Filter Device (Millipore) mikrofilter használatával végeztük el, a gyártó utasításai szerint. A tisztított terméket a 21nestedF (forward) és 21nestedR primerpárral újabb PCR reakcióval amplifikáltuk. Pozitív kontrollként az L858R pontmutációt hordozó H1975 és a vad típusú EGFR-t tartalmazó H358 sejtvonalak 3:97 arányú keverékét használtuk.



8. ábra. A mutáció-dúsító PCR működésének az elve. Az EGFR 19-es exon deléciójának (A) és 21-es exon L858R pontmutációjának kimutatása mutáció dúsító PCR módszerrel (B). (Forrás: Asano és mtsi, 2006 [157] nyomán módosított ábra)

3.7.3. A PCR termékek elválasztása, detektálása és tisztítása

A PCR termékeket 5 µl etidium-bromiddal (Sigma-Aldrich) festett 2%-os (w/v) agaróz gélben [2 g agaróz, 100 ml 1x Tris-acetát-EDTA (TAE) puffer] Sub-Cell® GT Cell (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) horizontális elektroforézis rendszerben futtattuk 30 percig, 100 V konstans feszültség mellett, 1x-es TAE pufferben (10x TAE törzsoldat: 0,4 M TRIS, 0,2 M ecetsav, 0,01 M EDTA). A futtatás során az egyes PCR fragmentumok méretének meghatározásához 1 kb nagyságú DNS markert (Promega) használtunk. A géltre felvitt minták UV fényben történő detektálásához KODAK Image Station 4000MM (Eastman Kodak Co., Rochester, NY, USA) géldokumentációs rendszert használtunk. A PCR termékek tisztítása Montage® PCR Centrifugal Filter Device (Millipore) kit segítségével történt, a gyártói útmutatás szerint. Ezzel a lépéssel eltávolítottuk a PCR reakció során fel nem használt dNTP-eket és primereket, amelyek zavarhatják a későbbi szekvenáló reakciót.

3.7.4. Szekvenálás

Az EGFR 19-es és 21-es exonjainak direkt szekvenálását BigDye[®] Terminator v3.1 Sequencing Kit (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) segítségével végeztük el. A 19-es exon mutáció-dúsító PCR termékét, mivel a 19mF primerhez a deléciós hely túl közel van, csak egy irányból, a 19nestedR primerrel szekvenáltuk (**5. táblázat**). A 21-es exon mutáció-dúsító PCR termékét két irányból, a 21nestedF és 21nestedR primerpár felhasználásával szekvenáltuk (**5. táblázat**). A Veriti[®] 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) PCR készülékben zajló szekvenáló PCR reakció összetételét és a PCR reakció hőmérsékleti paramétereit a **8. táblázat**, illetve a **9. táblázat** foglalja össze.

8. táblázat. A szekvenáló PCR reakció összetétele

Komponens	Mennyiség
Big Dye Terminator	1 µl
Big Dye puffer (10x)	1 µl
F vagy R primer (10 µM)	1 µl
PCR termék	2 µl

9. táblázat. A szekvenáló PCR reakció hőprofilja

Lépés	Hőmérséklet	Idő	Ciklus szám
Kezdeti denaturáció	95 °C	2 min	25
Denaturáció	95 °C	30 s	
Anelláció	51 °C	15 s	
Extenzió	60 °C	4 min	
Hűtés	4 °C	∞	-

A PCR termék tisztítása a feleslegben megmaradt és a későbbiekben zavaróvá váló fluoreszcens komponensektől a DyeEx[™] 2.0 Spin Kit-el (Qiagen) történt. A tisztított PCR termékekhez 20 µl deionizált formamid oldatot pipettáztunk, majd 95 °C-on 1 perces denaturációt követően jégen tartottuk azokat. A szekvenálást automata fluoreszcens kapilláris-elektroforézissel ABI PRISM[®] 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) készülékkel végeztük, 61 cm-es kapillárist és POP-6 polimert

alkalmazva. A nyers adatok értékelése az ABI PRISM® DNA Sequencing Analysis 3.3 (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific), illetve a BioEdit (Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, USA) software-ek segítségével történt.

3.8. Génexpresszió vizsgálat

3.8.1. Reverz transzkripció (RT)

A cDNS szintéziséhez a High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit-et (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) használtuk, a gyártó előírásainak megfelelően. A reverz transzkripció során 1 µg teljes RNS-t írtunk át egyszálú cDNS-re random hexamer primerek felhasználásával, 20 µl végtérfogatban. Az esetleges DNS szennyezés kiküszöbölése érdekében az RT reakciót mintánként RNS nélküli (non-RT) kontrollal végeztük, ahol a templátot nukleázmentes vízzel helyettesítettük. Az RT PCR reakcióelegy összetételét a **10. táblázat** tartalmazza.

10. táblázat. Az RT PCR reakcióelegy összetétele

Komponens	Mennyiség
RT puffer (10x)	2 µl
RT Random primer (10x)	2 µl
dNTP Mix (100 mM)	0,5 µl
Reverz transzkriptáz (50 U/µl)	1 µl
RNS templát	1 µg
Nukleáz mentes víz	20 µl-ig

Az RT reakció a Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) PCR készülékben zajlott a **11. táblázatban** összefoglalt hőmérsékleti profil alapján. Az így kapott cDNS-t a további felhasználásig -20 °C-on tároltuk.

11. táblázat. Az RT PCR reakció hőprofilja

Lépés	Hőmérséklet	Idő
1. lépés	25 °C	10 min
2. lépés	37 °C	120 min
3. lépés	85 °C	5 min
4. lépés	4 °C	∞

3.8.2. Valós idejű kvantitatív polimeráz láncreakció (RT-qPCR)

A GCTB stromasejt tenyészetek mRNS expressziós szintjének vizsgálatát valós idejű kvantitatív PCR (RT-qPCR) segítségével végeztük el. Kontrollként HDFa sejtvonalat és csontvelői stromasejt tenyészetet alkalmaztunk. A vizsgálat során TaqMan® Gene Expression Assay-t (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) használtunk, amely tartalmazza a génre specifikus primer párt és a primerek által közrefogott kettős fluorogén TaqMan próbát. A reakció során használt TaqMan assay-eket és azok gyári azonosítóit a **12. táblázat** tartalmazza.

12. táblázat. A TaqMan módszerrel vizsgált gének és gyári azonosítóik

Gén szimbólum	Gén neve	ABI assay azonosító száma
GJA1	Connexin 43	Hs00748445_s1
TNFSF11	RANKL	Hs00243522_m1
TNFRSF11B	OPG	Hs00900358_m1
ACTB	β-aktin	Hs01060665_g1

Az RT-qPCR reakciókat 20 µl végtérfogatban, 96 lyukú PCR plate-eken (Eppendorf, Hamburg, Németország) TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) segítségével végeztük el. Az RT-qPCR reakcióelegy összetétele a **13. táblázatban** látható.

13. táblázat. RT-qPCR reakcióelegy összetétele

Komponens	Mennyiség
TaqMan Mastermix (2x)	10 µl
TaqMan PCR assays (20x)	1 µl
cDNS	2 µl
Nukleázmentes víz	7 µl

Az ABI StepOne™ Plus Real-Time (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) PCR készülékben zajló reakció hőprofilját a **14. táblázatban** tüntettük fel. Ez a hőprofil az úgynevezett két-lépéses PCR-nek felel meg, mivel az anelláció és az extenzió azonos hőmérsékleten megy végbe. Minden esetben három párhuzamos reakciót futtatunk.

14. táblázat. Az RT-qPCR reakció hőprofilja

Lépés	Hőmérséklet	Idő	Ciklus szám
UNG aktiváció	50 °C	2 min	1
Polimeráz aktiváció	95 °C	10 min	1
Denaturáció	95 °C	15 s	40
Anelláció/Extenzió	60 °C	1 min	

Belső kontrollként a β -aktin háztartási gént használtunk. Az adatok értékelését StepOne™ Plus v2.0 (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) software segítségével végeztük el. Az RT-qPCR során kapott amplifikációs görbékből meghatároztuk a küszöbérték ciklus (C_T) értékeket. A C_T érték azt a ciklusszámot jelöli, ahol a relatív fluoreszcencia szint eléri az általunk beállított küszöbértéket (threshold) az amplifikációs görbe exponenciális szakaszán. A relatív expressziós értékeket a β -aktin háztartási gén amplitikonra történő normalizálás után (ΔC_T) a $2^{-\Delta C_T}$ képlet alapján számoltuk ki.

3.9. Fehérje izolálás és foszfatáz kezelés

A GCTB és csontvelői stromasejt tenyészeteket, illetve a HDFa sejtvonalat PBS oldattal mostuk, majd 200 µl fehérje lízispuffer [20 mM Tris pH 7,5, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% (v/v) Triton-X], 0,5% (v/v) proteáz inhibitor koktél (PIC; Sigma-Aldrich), 2 mM Na_3VO_4 , és 10 mM NaF hozzáadása után sejtkaparó segítségével eltávolítottuk a

sejteket a tenyésztőedény faláról. A lizátumokat Eppendorf csövekbe pipettáztuk és 30 percig jégen tartottuk, majd 15000 x g-vel 4 °C-on, 15 percig centrifugáltuk. A felülúszókat tiszta Eppendorf csövekbe pipettáztuk. A lizátumok összfehérje koncentrációját Quick Start™ Bradford Assay-el (Bio-Rad Laboratories Inc.) határoztuk meg UV-VIS spektrofotométerben, 595 nm-en mérve az elegy abszorbanciáját. A fehérjék defoszforilációja során a sejteket 200 µl fehérje lízispuffer [20 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 1% (v/v) Triton-X] hozzáadása után a fent leírt módon lizáltuk. A fehérje izoátumokat 20 µg ALP (Sigma-Aldrich, code: P0114) és 25 µl foszfátáz puffer [100 mM NaCl, 50 mM Tris, 10 mM Mg₂Cl és 1 mM dithiotreitol (DTT) pH 7,9] hozzáadása után 30 °C-on 30 percig inkubáltuk. A reakciót 5%-os (v/v) β-merkaptóetanolt tartalmazó Laemli mintapuffer [1250 mM Tris pH 6,8, 50% (v/v) glicerin, 5% (w/v) Na-lauril-szulfát, 0,05% (w/v) brómfenolkék] hozzáadása után 95 °C-on 5 perces forralással állítottuk le.

3.10. Western Blot

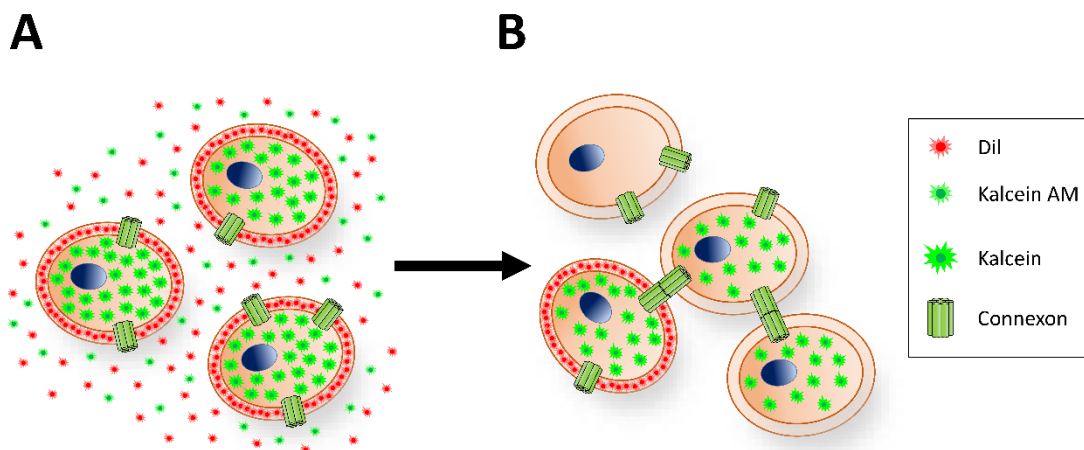
A fehérje izolátumokban bizonyos fehérjék jelenlétét Western blot módszerrel határoztuk meg. Az izolált fehérje mintákat 5%-os β-merkaptóetanolt tartalmazó 5x-ös koncentrációjú Laemli (Bio-Rad Laboratories Inc.) mintapufferrel keverük össze és 95 °C-on 5 percig denaturáltuk. A denaturált mintákból zsebenként 20 µg összfehérje mennyiséget vittünk fel a 0,75 mm vastagságú, 12%-os poliakrilamid gélre, majd Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories Inc.) vertikális elektroforézis rendszerben futtattuk 60 percig, 160 V konstans feszültség mellett, futtató pufferben [25 mM Tris, 192 mM glicin és 0.1% (w/v) SDS]. A molekulatömegük alapján szétválasztott fehérjéket a gélből egy 0,45 µm pórusméretű polivinilidén difluorid (PVDF, Millipore) membránra blottoltuk a Mini Trans-Blot® Cell (Bio-Rad Laboratories Inc.) blottoló készülékkel, 75 mA konstans áramerősség mellett, 4 °C-on, egy éjszakán keresztül transzfer pufferben [192 mM glicin, 25 mM TRIS, 10% (v/v) metanol]. Desztillált vizes öblítés után a blottolás hatékonyságát Ponceau S (Bio-Rad Laboratories Inc.) vörös festékkel ellenőriztük. A membránokat 5 x 5 percig TBST-vel mostuk, majd az aspecifikus kötéseket elkerülése végett 5%-os (w/v) tejporral (Bio-Rad Laboratories Inc.), TBST-ben oldva, 60 percig szobahőmérsékleten blokkoltuk. Ezt követően a membránokat 3%-os (w/v) tejpor TBST oldatban hígított elsődleges ellenanyagokkal 4 °C-on egy éjszakán keresztül

inkubáltuk. Bemérési kontrollként nyúl anti-humán β -aktin monoklonális primer antitestet használtunk. Másnap 5 x 5 perces TBST-vel történő mosás után a membránokat 1:1000 hígítású HRP konjugált kecske anti-egér IgG vagy anti-nyúl IgG (Cell Signalling Technology Inc., Denvers, MA, USA) másodlagos ellenanyaggal inkubáltuk 60 percig szobahőmérsékleten. Újabb 5 x 5 perces TBST mosást követően a jelek előhívásához SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate Kit-et (Thermo Fisher Scientific) alkalmaztunk 10 percig szobahőmérsékleten, amit a Kodak Image Station 4000MM (Eastman Kodak Co.) készülék segítségével tettünk láthatóvá. A kapott jeleket denzitometriás méréssel kvantifikáltuk, az Image J 1.48v software (NIH) segítségével. A Western blot során használt elsődleges ellenanyagokat és azok hígításait a **3. táblázat** foglalja össze.

3.11. Áramlási „flow” citometria

A sejt-sejt közötti kommunikáció funkcionális vizsgálatát sejtfesték-transzfer módszerrel tanulmányoztuk GCTB és csontvelői stromasejt tenyészetekben, illetve HDFa sejtvonalban. A módszer azon alapszik, hogy a nem fluoreszcens, hidrofób kalcein acetoximetil-észter (kalcein AM; Sigma-Aldrich) festék az élő sejtekben intracelluláris észterázok hatására, az acetoximetil-észter hidrolízise miatt zöld színű, hidrofil fluoreszcens kalceinné alakul, amely a réskapcsolatokon keresztül képes átjutni az egyik sejtől a másikba. Az 1,1'-dioktadecil-3,3,3'-tetra-metilin-dodikarbocianin (DiI; Sigma-Aldrich) egy lipofil, piros színű, fluoreszcens festék, amely a sejtmembrán kettős lipíd rétege közé kötődik, így jelezve a kalceinnel jelölt donor sejteket. A festéktranszfer folyamatát a **9. ábra** szemlélteti. A donor sejteket 20% FCS tartalmú α -MEM tápfolyadékban oldott 9 μ M DiI és 0,5 μ M kalcein AM festékek keverékével 30 percig, 37 °C-on, 5%-os CO₂ tartalmú termosztátban inkubáltuk. A kétszeresen jelölt donor és a nem jelölt akceptor sejteket PBS pufferrel mostuk, majd tripszin-EDTA segítségével szuszpenzióba vittük, és α -MEM tápfolyadékban 10 percig, 300 x g-vel centrifugáltuk. A sejteket újabb α -MEM tápfolyadékban reszuszpendáltuk, majd a sejtenyészet 90%-os konfluenciájának megfelelő sejtszámmal (60000–200000 sejt/ml végkoncentráció) 1:9 arányban összekevertük a jelölt donor sejteket a nem jelölt akceptor sejtekkel és 12 órát 37 °C-on, 5%-os CO₂ tartalmú termosztátban tartottuk. Ez idő alatt a sejtek letapadtak és létrehozták a réskapcsolatokat, amelyeken keresztül a már fluoreszcens kalcein képes

átjutni. Másnap a sejteket tripszin-EDTA segítségével felszedtük, majd α -MEM tápfolyadékban 300 x g-vel, 10 percig centrifugáltuk. A sejtpelletet 200-300 μ l PBS-ben reszuszpendáltuk és az egyszeresen kalcein-pozitív sejtek arányának meghatározásához mintánként 10000 sejtet számoltunk meg a Gallios™ Flow Cytometer (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA) berendezés segítségével. A minták argon lézerrel, 488 nm-en történő gerjesztését követően a kalcein fluoreszcenciájának intenzitását az FL1 csatornában mértük 530/30 nm-es sávszűrőn keresztül, míg a Dil esetében az FL2 csatornában detektáltuk 585/42 nm-es felületáteresztő szűrővel. A kapott eredményeket kvadráns dot plot segítségével jelenítettük meg. A jelölt sejtek egy részét (20000 sejt/lyuk) 24 lyukú sejtenyésző edénybe helyezett 6 mm-es üveg fedőlemezre szélesztettük, és a letapadás után Nikon Eclipse E600 epifluoreszcens mikroszkóppal (Nikon Co., Tokyo, Japán) és VDS Vosskuhler CCD-1300 monokróm kamerával tettük láthatóvá. A különböző színű képeket digitálisan egymásra vetítettük LUCIA™ Cytogenetics 1.5.6 software (Laboratory Imaging, Praha, Csehország) segítségével.



9. ábra. A festéktranszfer és a sejtek közötti kommunikáció sematikus ábrázolása. Az 1,1'-dioktadecil-3,3,3'-tetra-metilín-dodikarbocianin (Dil) (piros) és kalcein acetoximetil-észter (kalcein AM) (zöld) fluoreszcens festékekkel jelölt donor sejtek (A). A donor és akceptor sejtek keveréke és a kalcein áramlása a rés kapcsolatokon keresztül (B). (Forrás: saját szerkesztés)

3.12. Digitális mikroszkópia, értékelés és képanalízis

Az immunfestett TMA metszetek digitalizálása Panoramic Scan (3DHISTECH Ltd.) digitális mikroszkóppal, 20x-os nagyítású objektívvel és 3CCD (HV-F22CL, Hitachi) vagy fluoreszcens (AxioCam MRm, Zeiss) kamerával történt. A digitalizált

metszeteken az oszteoklaszt gazdag területek analízise a mononukleáris sejtek immunperoxidáz festődésének gyakorisága és intenzitása alapján, Panoramic Viewer software (3DHISTECH Ltd.) alkalmazásával 2-3 független értékelő által történt. Az EGFR reakciót az immunfestés intenzitásának erőssége alapján egy 1-től 12-ig terjedő skálán értékeltük, ami alapján gyenge (1-től 4-ig), közepes (5-től 8-ig) és erős (9-től-12-ig) festődést különböztettünk meg. A Cx43 reakciót a mononukleáris sejtek festődésének gyakorisága alapján egy 0-tól 8-ig terjedő skálán értékeltük: 0: <3%; 1+: 3-5%; 2+: 6-10%; 3+: 11-20%; 4+: 21-30%; 5+: 31-40%; 6+: 41-50%; 7+: 51-60%, 8+: >60% pozitív tumorsejt. Az immunfluoreszcens szignálokat Panoramic Viewer HistoQuant modul software (3DHISTECH Ltd.) segítségével határoztuk meg. A CD163-pozitív monocita/makrofágok, illetve az α -SMA-pozitív neoplasztikus stromasejtek Cx43 expresszióját kettős immunfluoreszcens jelölés után képszegmentációval határoztuk meg. Ennek során a piros színű fluoreszcens jeleket (Cx43) és a zöld színű fluoreszcens jeleket (CD163 vagy α -SMA) külön detektáltuk, majd a piros és a zöld színű fluoreszcens szignálok átfedését is meghatároztuk. Ugyancsak automatizált képanalízissel vizsgáltuk a Cx43 plakkok számát, illetve a Cx43-pozitív területek arányát is. A Cx43 fehérje intracelluláris eloszlását a GCTB és normál csontvelői stromasejt tenyészetben, illetve HDFa sejtvonalon immunfluoreszcens jelölés után, a digitálizált metszetek 40x-es nagyítású látóterein Image J 1.48v software (NIH, Bethesda, MD, USA) alkalmazásával határoztuk meg. A Cx43-pozitív plakkok kijelölt sejtmembrán régióinak arányát a Cx43-pozitivitás és a teljes terület egymáshoz való viszonyításával határoztuk meg. A FISH szignálokat a metszeteken és a sejttenyészeteken két, illetve háromcsatornás (DAPI/Rodamin/FITC), többsíkú digitalizálás után Panoramic Viewer software (3DHISTECH Ltd.) segítségével vizsgáltuk.

3.13. Statisztikai értékelés

A statisztikai tesztekhez az SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) és a Statistica 8.0 (StatSoft, Tulsa, OK, USA) software-eket használtuk. Az EGFR expresszió és a GCTB progressziós csoportok kapcsolatát kétoldalas Pearson-féle Khi-négyzet (χ^2) teszttel és Spearman-féle rangkorrelációs analízissel vizsgáltuk. A Cx43 expresszió kapcsolatát a GCTB klinikoradiológiai stádiumával, illetve a progresszióval nem-parametrikus Jonkeer-Terpstra és Mann-Whitney U teszttel vizsgáltuk Bonferroni vagy

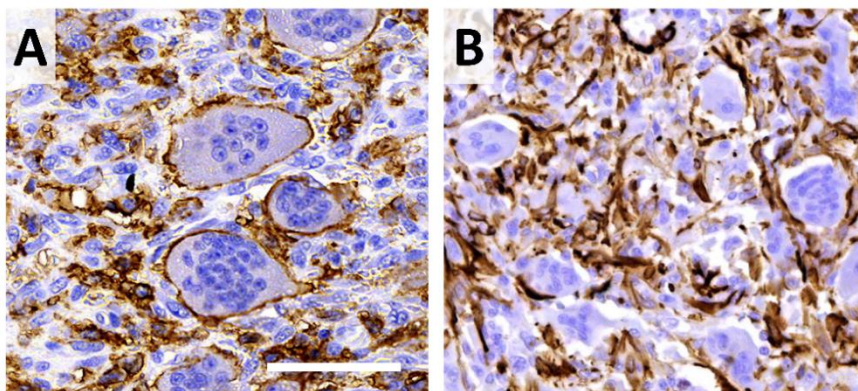
Holm-Hochberg korrelációt alkalmazva. A túléléseket Kaplan-Meier-féle túlélési görbén ábrázoltuk és az egyes csoportok közötti különbségeket log-rank teszttel vizsgáltuk. A Cx43 expresszió összefüggését a progressziómentes túléléssel (PFS) univariáns Cox regressziós analízissel, míg a Cx43 expresszió kapcsolatát a nemmel, életkorral, grádussal, lokalizációval és az első kezelés időpontjával multivariáns Cox regressziós analízissel határoztuk meg. A sejtenyésztés, az immunreakció, illetve az mRNS és fehérje expresszió eredményeinek értékeléséhez párosított Student-féle t-tesztet használtunk. Az eredményeket átlag \pm szórás (SD) formában tüntettük fel, szignifikánsnak a $p < 0,05$ értéket tekintettük.

4. EREDMÉNYEK

4.1. EGFR szerepe óriássejtes csonttumorban

4.1.1. EGFR expressziója óriássejtes csonttumorban

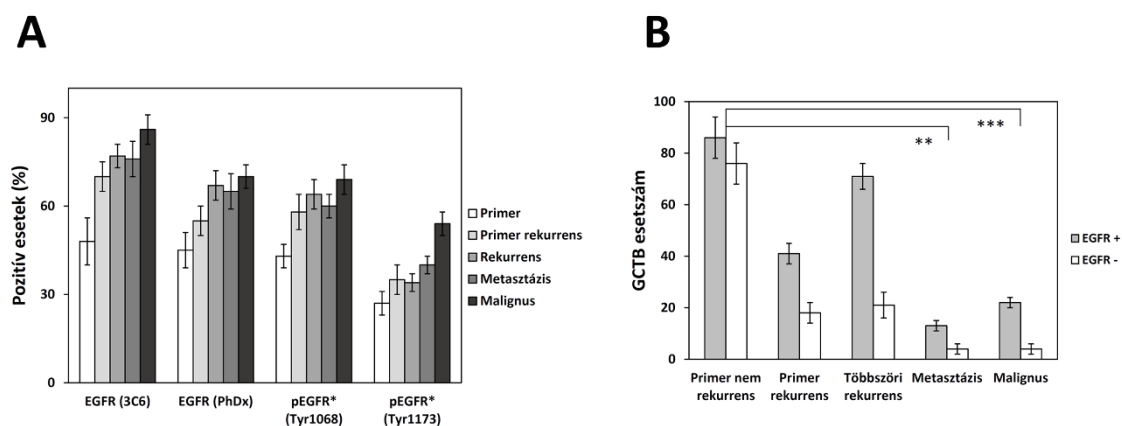
Vizsgálatainkban elsősorban a GCTB-t alkotó mononukleáris sejtpopulációra fókuszáltunk. A daganatot alkotó sejtpopulációkat immunhisztokémiai reakciókkal azonosítottuk. A monocita/makrofág és az oszteoklaszt típusú óriássejtek CD11c sejtmembrán (**10. ábra A**), a stromasejtek α -SMA citoplazma festődést mutattak (**10. ábra B**).



10. ábra. Az óriássejtes csonttumor (GCTB) sejtípusainak immunhisztokémiai azonosítása. Az ovális monocita/makrofág és a multinukleáris óriássejtek CD11c membrán festődése (**A**). Az orsó alakú mononukleáris stromasejtek specifikus marker híján gyakran alfa-simaizom aktin (α -SMA)-pozitivitást mutatnak (**B**). Digitális mikroszkópia, méretskála: 50 μ m (**A**), illetve 70 μ m (**B**).

Az EGFR fehérje expressziót számos EGFR-specifikus antitesttel igazoltuk (**11. ábra A**). A 3C6 antitest klónnal végzett immunreakció alapján a GCTB esetek 76%-a (235-ből 176) mutatott EGFR fehérje membrán- és citoplazma-pozitivitást, amit a 2-18C9 antitest klón némileg gyengébb reakcióival hasonló százalékban validáltunk. A 3C6 antitest klón reakcióit értékeltük szisztematikusan. Az EGFR receptor aktivitását a tirozin-kináz domén foszforilált tirozinjét (pY1068 és pY1173) felismerő specifikus antitestekkel végzett immunreakcióval igazoltuk. A 3C6 antitest klón reakciójával kimutatott EGFR expresszió és a daganat progressziója között pozitív statisztikai korrelációt találtunk. Az EGFR expresszió gyakorisága szignifikánsan magasabb volt a

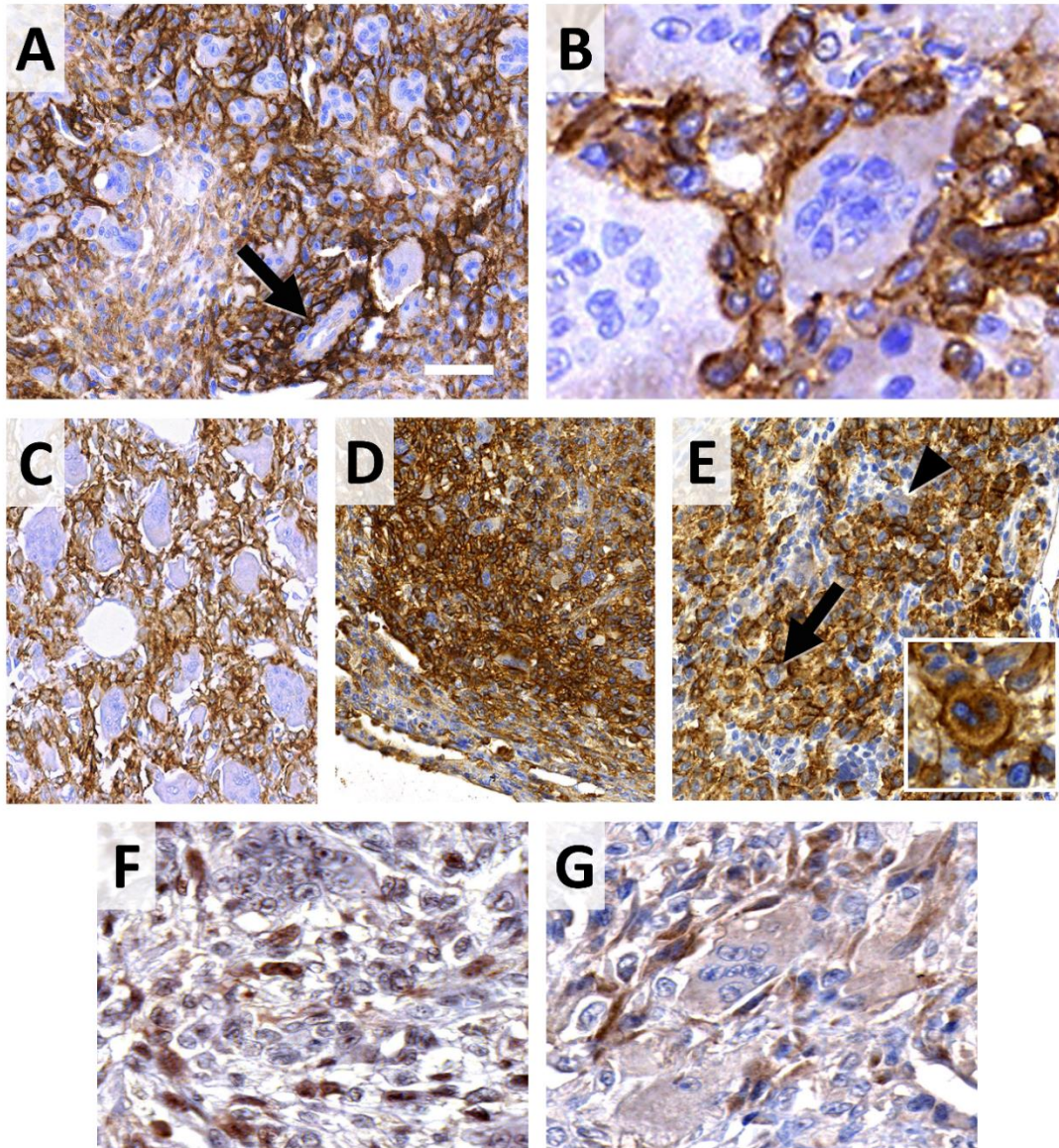
többszöri rekurrens (92-ből 71; 77%; $p < 0,002$) és a malignus (26-ből 22; 86%; $p < 0,001$) GCTB esetekben a primer nem rekurrens esetekhez képest (**11. ábra B**).



11. ábra. Az epidermális növekedési faktor receptor (EGFR) fehérje expressziója az óriássejtes csonttumor (GCTB) progressziója során, számos antitest klónnal végzett immunreakció alapján (**A**). A különböző progressziós csoportok EGFR expressziója közötti korreláció a 3C6 antitest klón reakció után (**B**). Az oszlopokon az átlag \pm szórások (SD) szintjét tüntettük fel. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Az EGFR fehérje 3C6 antitest klónnal való immunreakciója mérsékelt vagy erős sejtmembrán reakció mellett gyenge citoplazma festést mutatott az orsó alakú mononukleáris sejtekben, elsősorban az oszteoklaszt gazdag területeken (**12. ábra A**). A vaszkuláris periciták gyakran EGFR-pozitívak voltak, azonban sem a preoszteoklasztok, sem az óriássejtek nem mutattak EGFR reakciót (**12. ábra B**). Azonos betegből származó tumoroknál nem volt jelentős különbség a primer és rekurrens, vagy áttéti tumor EGFR expressziója között. Az EGFR-pozitivitás megjelenését, a 19 szarkómává transzformálódott esetből csak két esetben figyeltünk meg az eredetileg negatív GCTB mintához képest. A 3C6 antitest klónnal megfigyelt EGFR immunreakciót a 2-18C9 antitest klónnal is validáltuk (**12. ábra C**). A 16 metasztatikus esetből 12-ben mutattunk ki EGFR-pozitivitást (**12. ábra D**). A GCTB/GC szarkóma (7-ből 6 eset) és a GC szarkóma (19-ből 16 eset) esetek multinukleáris tumor sejtjei EGFR-pozitívak voltak, a reaktív oszteoklasztok EGFR-negativitása mellett (**12. ábra E**). A 3C6 antitest klónnal pozitív EGFR GCTB esetek 72%-ában az orsó alakú mononukleáris stromasejtek 20%-a foszforilált (aktivált) tirozin-kináz domént specifikusan felismerő EGFR antitestekkel (pY1068, illetve pY1173) is pozitív reakciót adott (**12. ábra F-G**). Az EGFR fehérje

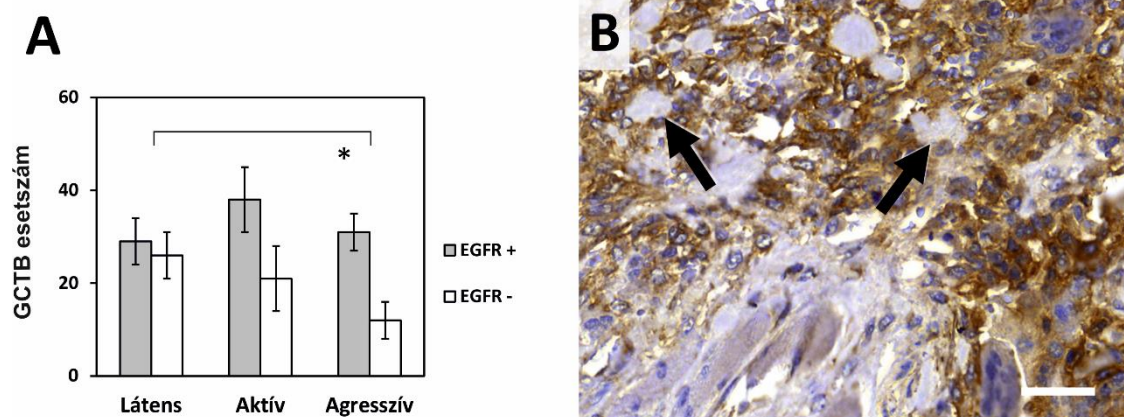
túltermelődése és a receptor tirozin-kináz domének aktiválódása között statisztikailag pozitív korrelációt ($p < 0,05$) igazoltunk.



12. ábra. Az epidermális növekedési faktor receptor (EGFR) immunhisztokémiai reakciói óriássejtes csonttumorban (GCTB). Az oszteoklaszt gazdag EGFR-pozitív területek erős reakciót mutatnak a vaszkuláris pericitákban (nyíl) (A). EGFR-pozitív mononukleáris sejtek és EGFR-negatív oszteoklaszt típusú óriássejtek direkt membrán kapcsolata egy primer rekurrens tumorban (B). EGFR expresszió igazolása PharmDx 2-18C9 antitest klónnal egy primer rekurrens mintán (C). Erős EGFR expresszió GCTB tüdő metasztázisban (D). A GCTB területén kialakult oszteoszarkóma EGFR-negatív oszteoklaszt (nyílhegy) és EGFR-pozitív multinukleáris tumor sejtjei (nyíl és betéti kép) (E). Mérsékelt EGFR tirozin-kináz domén foszforilált tirozin (pY1068) (F), illetve pY1173 (G) festődés orsó alakú GCTB stromasejtben. Digitális mikroszkópia, méretskála: 100 μm (A), 15 μm (B), 100 μm (C), 150 μm (D), 100 μm (E), 50 μm (F) és 25 μm (G).

4.1.2. Az EGFR expresszió klinikopatológiai korrelációja

Az EGFR fehérje expresszióját az óriássejtes csonttumor klinikoradiológiai stádiumaival összefüggésben is vizsgáltuk. Az EGFR-pozitív esetek szignifikánsan gyakoribbak voltak az agresszív klinikoradiológiai csoportban (43-ből 31; 72%) mint a látens (54-ből 27; 50%) csoportban ($p = 0,034$). A látens és aktív, illetve az aktív és az agresszív csoportok között nem volt összefüggés (**13. ábra A**). Egyes agresszív esetekben az EGFR- (3C6 antitest klón) pozitív stromasejtek a környező vázizmot is infiltrálták (**13. ábra B**). Az EGFR-pozitivitás gyakoribb volt a femurt és a tibiát érintő tumorokban, mint azokban, amelyek a szakrum és a pelvisz régióiban alakultak ki. Ugyancsak erősebb EGFR expressziót láttunk fiatalabb (15-40 éves) korosztályban, az idősebbekhez (41-76 éves) képest. Ezek az eltérések azonban nem mutattak statisztikailag szignifikáns különbséget.

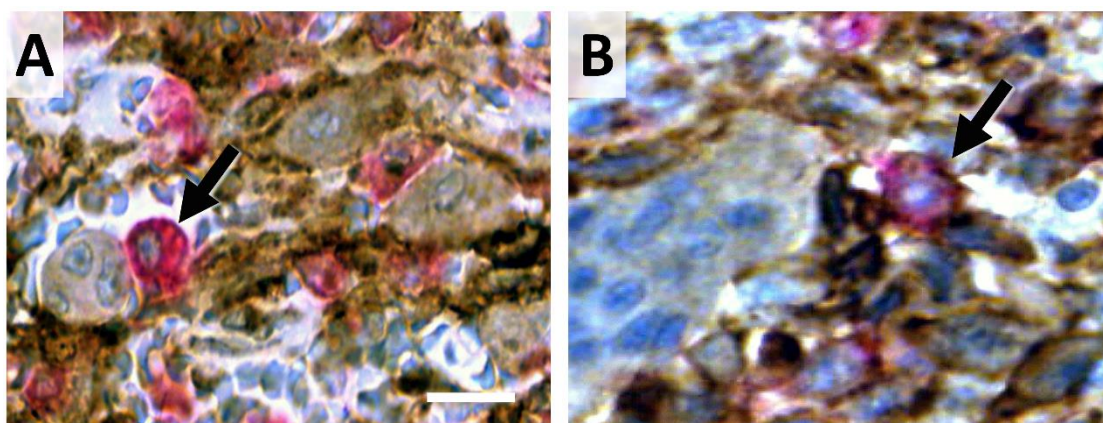


13. ábra. Az epidermális növekedési faktor receptor (EGFR) fehérje expresszió klinikopatológiai korrelációja az óriássejtes csonttumorban (GCTB). Az EGFR-immunpozitív esetek gyakorisága szignifikánsan magasabb az agresszív csoportban, a látens csoporthoz képest ($p = 0,034$) (**A**). Az EGFR-pozitív stromasejtek vázizom inváziója (nyilak) (**B**). Digitális mikroszkópia, méretskála: 15 μm (**B**). Az oszlopokon az átlag \pm szórások (SD) szintjét tüntettük fel. * $p < 0,05$.

4.1.3. Az EGFR fehérjét expresszáló sejtípus meghatározása

Az EGFR fehérjét termelő sejtípus meghatározására kettős immunfestést alkalmaztunk, ahol az EGFR reakcióját (elsősorban a sejtmembránban) vizsgáltuk a CD163, illetve α -SMA immunreakcióval párhuzamosan. A CD163 fehérje egy monocita/makrofág sejtmembrán marker, amely az oszteoklasztokban nem, csak az

oszteoklaszt prekursorok (monocita/makrofág) detektálására alkalmas. Az α -SMA fehérje gyakran megjelenik neoplastikus GCTB stromasejtekben. EGFR (peroxidáz-DAB, barna) reakcióval azonos sejtekben ritkán vagy egyáltalán nem tudunk CD163 fehérjét (alkalikus foszfatázzal, „Permanent red”, bordó) igazolni, vagyis a monocita/makrofág sejtek nem expresszálták az EGFR fehérjét (**14. ábra A**). Az EGFR viszont gyakran kolokalizált az α -SMA fehérjével, ami az EGFR fehérjét expresszáló sejtek stromális eredetére utalt (**14. ábra B**).

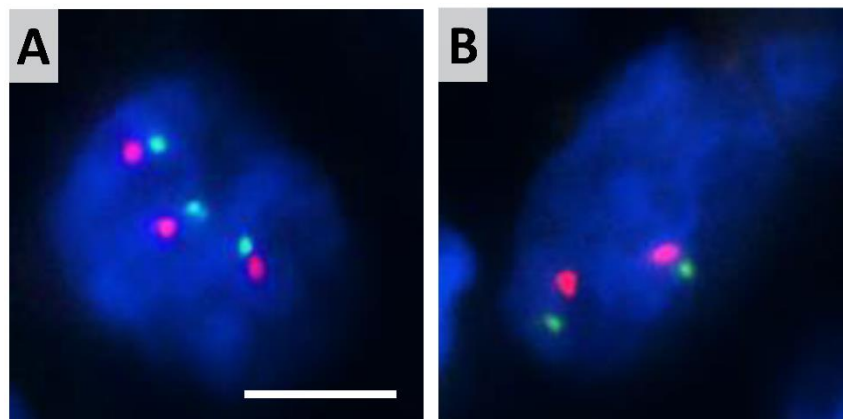


14. ábra. Az epidermális növekedési faktor receptor (EGFR) fehérjét termelő sejtípus meghatározása kettős immunfestéssel óriássejtes csonttumorban (GCTB). CD163 citoplazmatikus (bordó) festődés EGFR membrán (barna) kolokalizáció nélkül (nyíl) (A), valamint EGFR (barna) és citoplazma alfa-simaizom aktin (α -SMA) (bordó) festődés azonos sejtekben (nyíl) (B). Digitális mikroszkópia, méretskála: 50 μ m (A), 15 μ m (B).

4.1.4. EGFR gén státusz meghatározása

FISH analízissel vizsgáltuk a 7p12 lókuszon elhelyezkedő EGFR gén státuszát 72 primer nem rekurrens, 25 primer rekurrens, 35 többszöri rekurrens és 6 metasztatikus GCTB mintákat tartalmazó TMA metszeteken. A mononukleáris sejtek 5-20%-ában a 7-es kromoszóma számbeli eltérései közül tri- vagy tetraszómiáját (három vagy négy EGFR gén kópia) mutattuk ki EGFR-pozitivitást mutató 3 többszöri rekurrens, 2 primer rekurrens és 2 primer nem rekurrens GCTB esetben. Ezekben a sejtekben három vagy négy zöld színű EGFR lókuszs-specifikus és ugyan annyi piros színű 7-es kromoszóma centromer-specifikus fluoreszcens szignált detektáltunk (**15. ábra A**). A 7-es kromoszóma 7p12-es lókusznál lokalizálódó EGFR gén amplifikációja nem volt kimutatható. A mononukleáris sejtek többsége normál diploid volt a 7-es kromoszómára

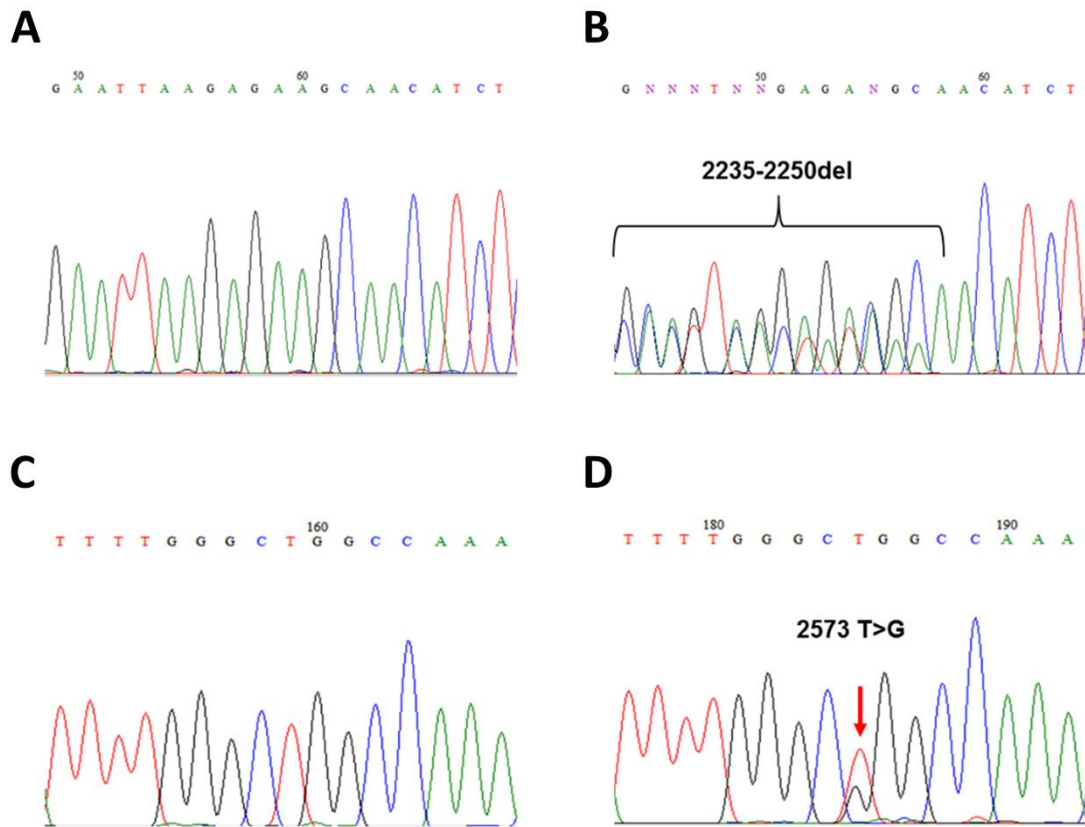
és a rajta levő EGFR génre, vagyis két zöld színű EGFR lókuszt-specifikus és két piros színű 7-es kromoszóma centromer-specifikus fluoreszcens szignál volt jelen (**15. ábra. B**).



15. ábra. Az óriássejtes csonttumor (GCTB) szöveti multiblokkon (TMA) végzett fluoreszcens *in situ* hibridizáció (FISH) vizsgálatának eredménye. A zöld színű szignálok az epidermális növekedési faktor receptor (EGFR) gén lókuszt (7p12), a piros színű szignálok a 7-es kromoszóma centromer régiót (7p11.1-q11.1) reprezentálja. A sejtmagok kék színét a 4',6-diamidino-fenilindol (DAPI) festés adta. Triszómiás mononukleáris sejt (**A**). Normál diszómiás mononukleáris sejt (**B**). Digitális mikroszkópos felvételek, digitalizálás 5 optikai síkban, méretskála: 5 μm (**A, B**).

4.1.5. Az EGFR gén tirozin-kináz domén 19-es és 21-es exonok mutáció vizsgálata

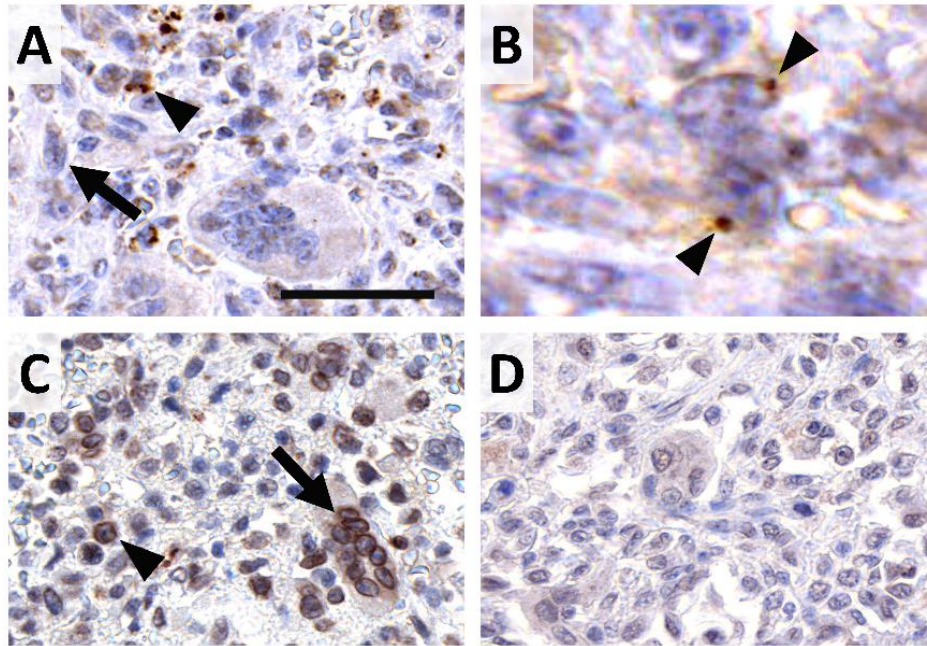
Az EGFR tirozin kináz domén mutációjának detektálása céljából az EGFR gén 19-es és 21-es exonjának szekvencia analízisét végeztük el 3 darab 70 GCTB mintát tartalmazó TMA blokkból (GCTB TMA blokk 1, blokk 2 és blokk 3) izolált DNS-en. A mutáció-dúsító PCR reakciót követő szekvenálás elvégzése után az EGFR gén 19-es exonja vad típusúnak bizonyult (**16. ábra A**), vagyis nem tartalmazta a del746-750 deléciót, ami egy 15 bp méretű (2235-2250del) szakasz kiesését eredményezte a pozitív kontrollként használt H1650 sejtvonalban (**16. ábra B**). Az EGFR gén 21-es exonjának mutáció-dúsító PCR reakcióját követő szekvenálás nem mutatta ki a 21-es exont érintő L858R pontmutációt (**16. ábra C**), ami viszont a pozitív kontrollként használt H1975 sejtvonalban a 2573-as pozícióban G>A nukleotid cseréjét okozta (**16. ábra D**). A 3 darab GCTB TMA blokkból kapott eredmények hasonlósága miatt csak a blokk 1. elektroforetogramját tüntettük fel a **16. ábrán**.



16. ábra. Az epidermális növekedési faktor receptor (EGFR) gén tirozin-kináz doménjének 19-es és 21-es exonjának szekvencia analízise. Az óriássejtes csonttumor (GCTB) szöveti multiblokk (TMA) minták EGFR gén 19-es exon (A) és a kontroll H1650 sejtvonallal 19-es exon deléciójának (del746-750) (B) elektroforetogramja. A GCTB TMA minták EGFR gén 21-es exon (C) és a kontroll H1975 sejtvonallal 21-es exon L858R pontmutáció (D) elektroforetogramja.

4.1.6. Az EGFR ligandok jelenlétének igazolása

Két EGFR ligand jelenlétét is igazoltuk, az EGF-et és a TGF α -t. Az EGF jelenlétét a monocita/makrofág és az endoteliális sejtekben mutattuk ki, míg a stromális sejtek negatívnak bizonyultak mindkét ligandra (17. ábra A). Az oszteoklasztok szintén gyenge paranukleáris EGF immunfestődést mutattak (17. ábra B). A TGF α immunreakció a monocitákban és oszteoklasztokban adott perinukleáris-pozitivitást, míg a stromális sejtekben csak gyenge reakció látszott (17. ábra C). Az antigén telítése során a primer antitestet 0,5 μ g/ml rekombináns EGF-el 60 percig inkubálva a mintákon az immunreakció elmaradt (17. ábra D).

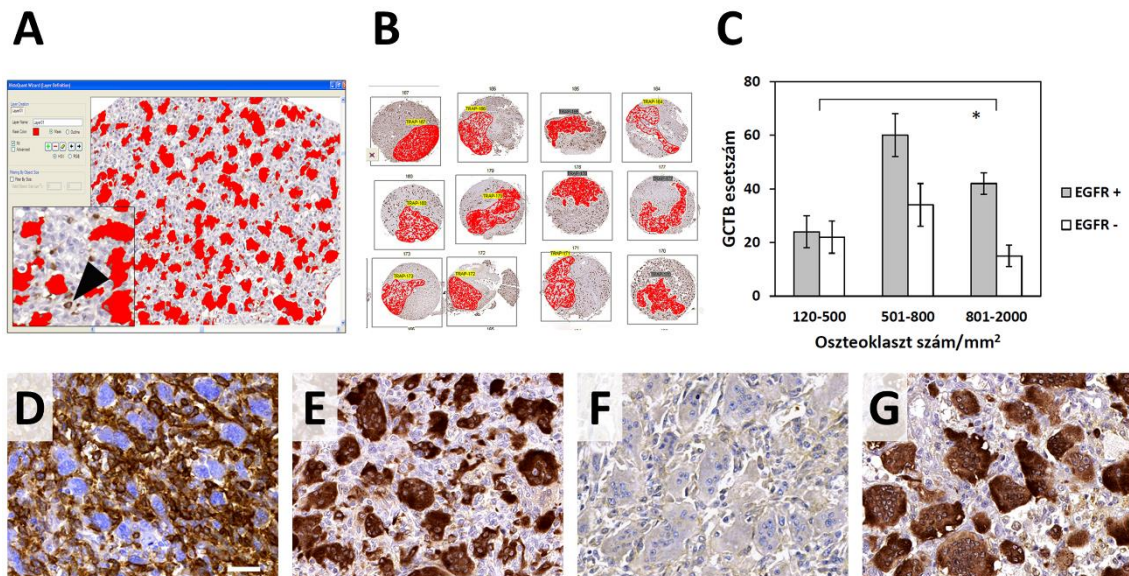


17. ábra. Az epidermális növekedési faktor receptor (EGFR) ligandok immunhisztokémiai detektálása óriássejtes csonttumorban (GCTB) rekombináns EGF és transzformáló növekedési faktor alfa (TGF α) antitestekkel. Az EGF reakció a monocitákat festi (nyílhegy), a stromasejtek negatívak (nyíl) (A). A korai oszteoklasztokban az EGF-pozitivitás paranukleáris pontok formájában van jelen (nyílhegyek) (B). A TGF α elsősorban a monocitákban (nyílhegy) és az oszteoklaszt típusú óriássejtekben (nyíl) perinukleáris gyűrű formájában figyelhető meg (C). Negatív immunreakció az anti-EGF IgG telítése után 0,5 $\mu\text{g/ml}$ rekombináns EGF-el (D). Digitális mikroszkópia, méretskála: 15 μm (A), 50 μm (B), 70 μm (C) és 30 μm (D).

4.1.7. Az EGFR expresszió és a TRAP-pozitív oszteoklasztok viszonya

Vizsgáltuk az EGFR expressziójának és az oszteoklasztok számának és méretének egymáshoz való viszonyát. Reprezentatív oszteoklaszt gazdag területeken immunhisztokémiai eljárással azonosítottuk az oszteoklasztokat és preoszteoklasztokat a tartarát-rezisztens alkalikus foszfatáz (TRAP) termelődése alapján, amelynek eredményét HistoQuant automatizált képanalízis software segítségével értékeltük. Az egy vagy két sejtmagnál több sejtmagot tartalmazó TRAP-pozitív sejteket vettük figyelembe. (18. ábra A). Az immunreakcióval azonosított TRAP-pozitív sejtek számát és méretbeli megoszlását automatizált algoritmussal határoztuk meg, majd 1 mm^2 területre vonatkoztatva konszolidáltuk (18. ábra B). Az oszteoklasztok méretét a sejt átmérőjének becslése és a sejtmagok száma alapján kis- és nagyméretű oszteoklaszt csoportokba

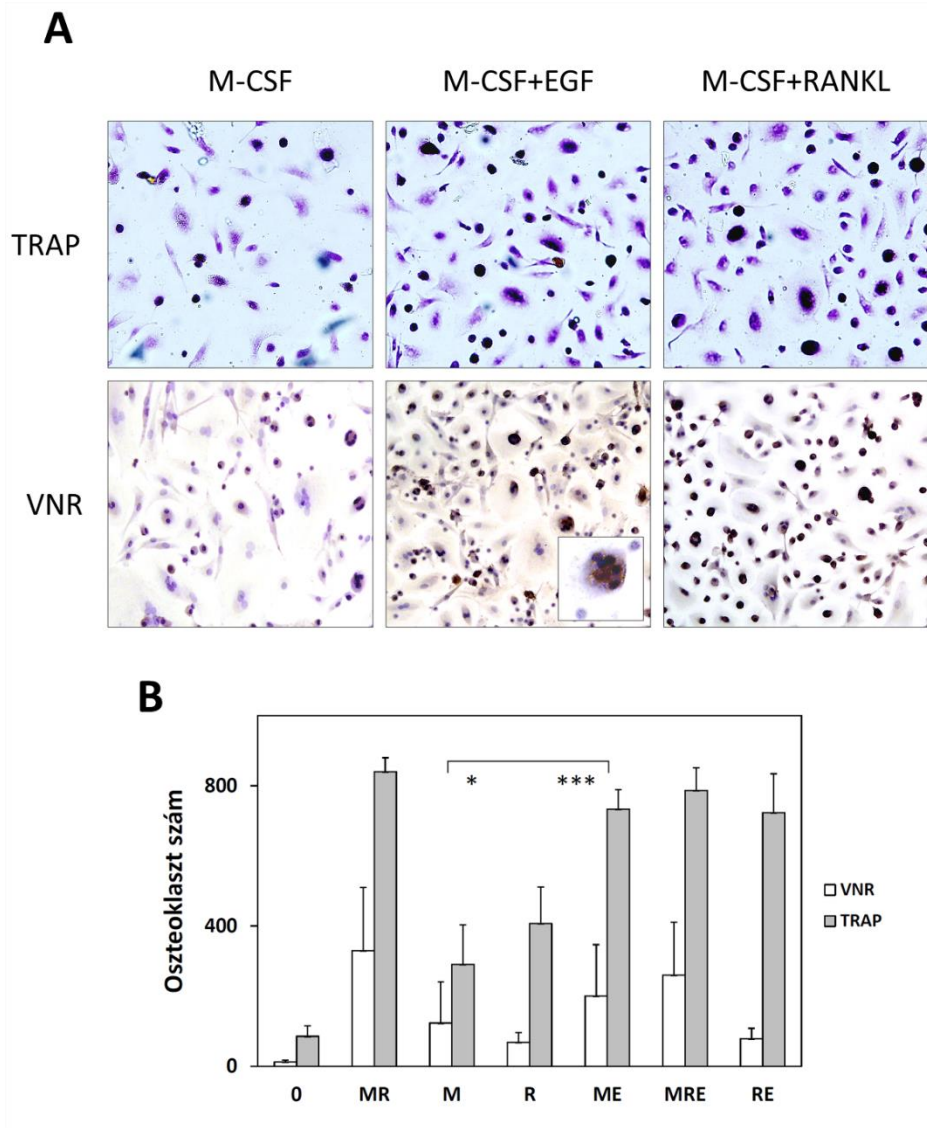
soroltuk. Az eseteket az oszteoklasztok száma alapján alacsony (120-500/mm²), közepes (500-800/mm²) és magas (800-2000/mm²) oszteoklaszt számú csoportokra osztottuk. A TRAP-pozitív oszteoklasztok száma szignifikánsan magasabb volt az EGFR-pozitív esetekben (735 ± 237), mint az EGFR-negatív esetekben (581 ± 237) (p = 0,02) (**18. ábra C**). Azokban a tumorokban, ahol erős EGFR fehérje expressziót láttunk (**18. ábra D**), szignifikánsan nagyobb számban voltak jelen kisebb méretű, TRAP-pozitív oszteoklasztok (**18. ábra E**), mint a negatív (**18. ábra F**) és az alacsony EGFR fehérjét expresszáló esetekben (**18. ábra G**). A TRAP-pozitív oszteoklasztok átlagos mérete szignifikánsan kisebb volt (>8%) az EGFR-pozitív esetekben, mint az EGFR-negatív esetekben (p <0,05).



18. ábra. A tartarát-rezisztens alkalikus foszfátázzal (TRAP) immunjelölt (barna) oszteoklasztok óriássejtes csonttumorban (GCTB). A képszegmentálással kijelölt TRAP-pozitív oszteoklasztok (piros). A sejt méret küszöbérték beállítás alapján a mono- és binukleáris sejtek (betéti kép: nyílhegy) nem jelölődtek (**A**). A megjelölt (piros) oszteoklasztok automatizált értékelése szöveti multiblokk (TMA) core-okon kijelölt reprezentatív GCTB tumor területeken (**B**). Az epidermális növekedési faktor receptor (EGFR)-pozitivitás szignifikánsan gyakoribb a magas (801-2000) oszteoklaszt számú esetekben, mint az alacsony (120-500) oszteoklaszt számú GCTB esetében, 1 mm² tumor területre vonatkoztatva (**C**). Egy EGFR-pozitív eset (**D**) kisebb méretű TRAP-pozitív oszteoklasztokkal (**E**), és egy EGFR-negatív eset (**F**) nagyobb méretű oszteoklasztokkal (**G**). Digitális mikroszkópia, méretskála: 60 µm (**D**, **E**) és 30 µm (**F**, **G**). Az oszlopokon az átlag ± szórások (SD) szintjét tüntettük fel. *p <0,05.

4.1.8. EGF-kezelés hatása az oszteoklasztogenezisre

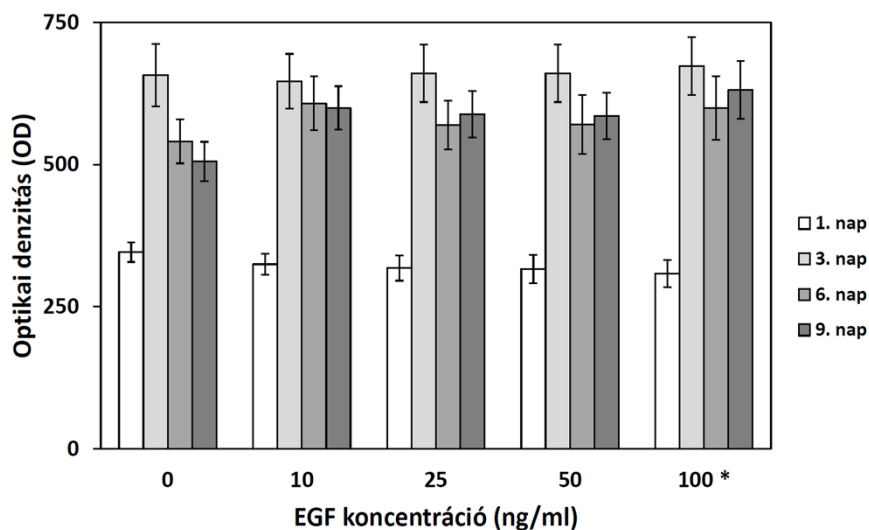
In vitro funkcionális kísérletekkel vizsgáltuk az EGF-kezelés hatását az oszteoklasztogenezisre. A PBMC 14 napos kezelése EGF és M-CSF kombinációval közel hasonló hatással volt az oszteoklasztogenezis serkentésére, mint a pozitív kontrollként alkalmazott kanonikus M-CSF és RANKL kombináció. Az M-CSF önmagában nem váltott ki jelentős hatást a TRAP- és VNR-pozitív oszteoklasztok keletkezésére (**19. ábra A**). Azonban az M-CSF és RANKL együttes hatásával ellentétben, az EGF és M-CSF együttes alkalmazása nem indukálta az oszteoklasztok aktiválását, amit a dentin lemezek lakunáris reszorpciós tesztjével mértünk. A VNR és TRAP-pozitív, multinukleáris (>3 sejtmag) oszteoklasztok száma szignifikánsan magasabb volt (VNR $p = 0,024$ és TRAP $p < 0,001$) EGF és M-CSF együttes kezelésre, mint az önmagában adott M-CSF hatására (**19. ábra B**).



19. ábra. Tartarát rezisztens alkalikus foszfatáz (TRAP)- és vitronektin receptor (VNR)-pozitív oszteoklasztok keletkezése perifériás vér mononukleáris sejtekből (PBMC) epidermális növekedési faktor (EGF) és citokin kezelés hatására 14 napos sejt kultúrában. A megfestett multinukleáris sejtek (>3 sejt mag) aránya összehasonlítva a pozitív kontrollként használt MR (makrofág kolónia stimuláló faktor, M-CSF) és nukleáris faktor kappa-B-receptor-aktivátor ligand (RANKL) kombinált kezeléssel. A betéti képen egy VNR-pozitív oszteoklaszt látszik (A). A TRAP és VNR-pozitív sejtek száma hasonló az ME (M-CSF és EGF)- és az MR-kezelés hatására, ami lényegében magasabb, mint a kizárólagos M-CSF-kezelés hatására (VNR $p = 0,024$ és TRAP $p < 0,001$) (B). Az oszlopokon az átlag \pm szórások (SD) szintjét tüntettük fel. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$. Rövidítések: 0 = nem volt kezelés, MR = M-CSF és RANKL; ME = M-CSF és EGF; MRE = M-CSF, RANKL és EGF; RE = RANKL és EGF.

4.1.9. Az EGF-kezelés hatása a GCTB stromasejtek proliferációjára és differenciálódására

A GCTB stromasejteket növekvő EGF koncentrációjával kezeltük. A sejtek proliferációját a sejtekben keletkező resorufin optikai denzitása (OD) alapján határoztuk meg. A neoplasztikus stromasejtek 100 ng/ml EGF hatására a harmadik ($p < 0,05$) és a kilencedik napon emelkedett proliferációs aktivitást mutattak a nem kezelt kontrollhoz képest (**20. ábra**). Az ALP aktivitást, mint oszteoblaszt differenciálódási markert, is mértük. A négyből két izolált stromasejt minta ALP-negatívnak bizonyult, vagyis nem mutatott oszteoblaszt differenciációt, és az ALP-pozitív stromasejtek ALP szintje nem változott szignifikánsan a növekvő EGF koncentráció kezelés hatására a kontroll 2T3 sejtvonalhoz viszonyítva.

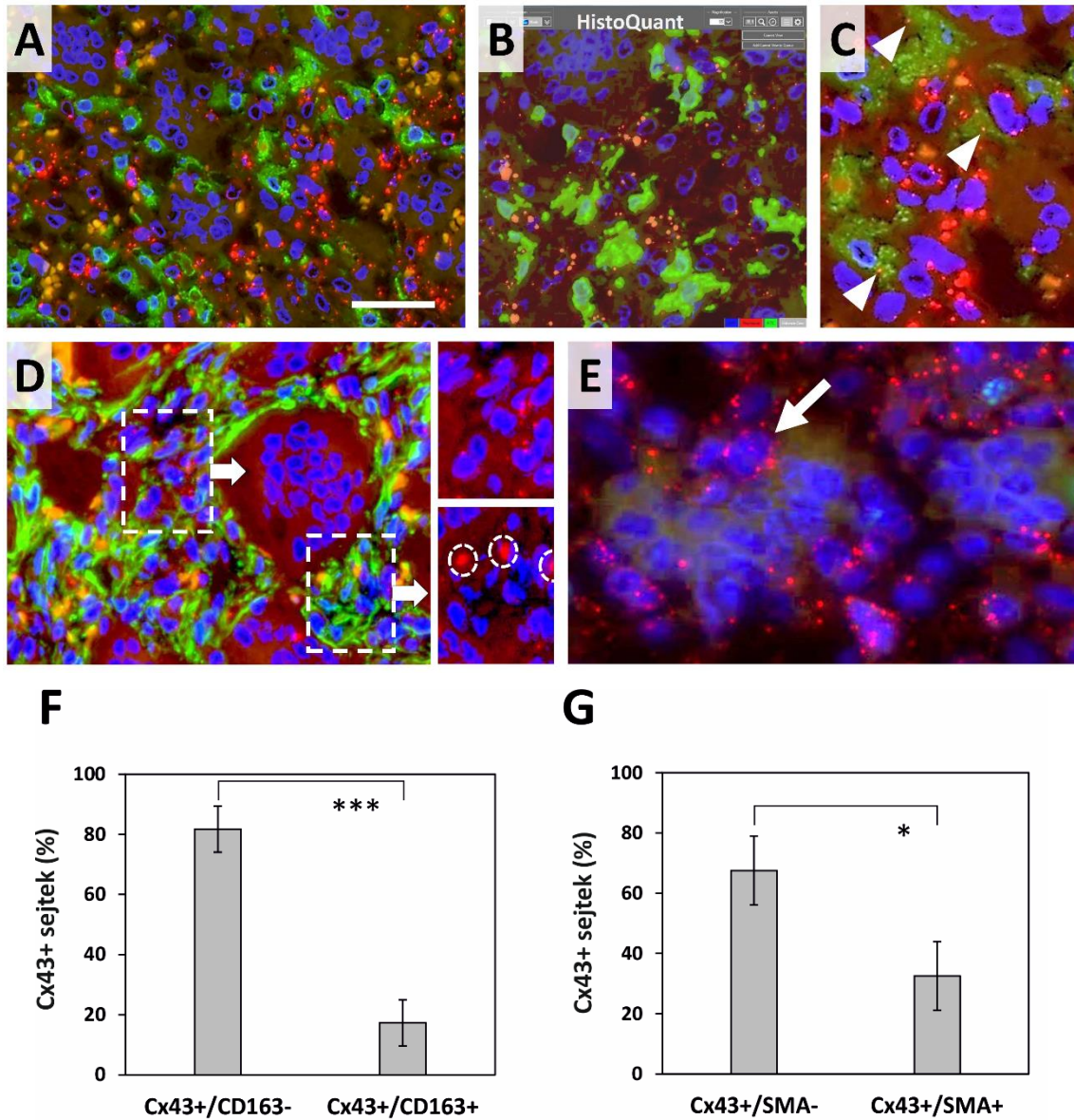


20. ábra. Az óriássejtes csonttumor (GCTB) stromasejtek emelkedő proliferációjának meghatározása a resorufin optikai denzitásának (OD) mérése alapján, sejtenyészetekben, növekvő epidermális növekedési faktor (EGF) koncentráció hatására. A nem kezelt kontrollhoz képest a sejtproliferáció a harmadik napon 100 ng/ml EGF hatására szignifikáns növekedést mutatott ($p < 0,05$). Az oszlopokon az átlag \pm szórások (SD) szintjét tüntettük fel. * $p < 0,05$.

4.2. Cx43 expresszió és sejt-kommunikációs csatornák GCTB-ben

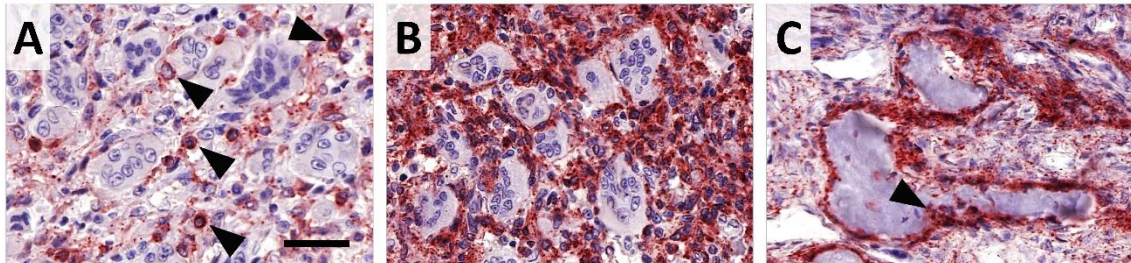
4.2.1. Cx43 kifejeződés klinikopatológiai korrelációja

Kettős, immunfluoreszcens festéssel kimutattuk, hogy a Cx43 plakkok zömét CD163-negatív neoplasztikus stromasejtek ($81,7 \pm 12,56\%$) és nem a CD163-pozitív monocita/makrofágok expresszálták **(21. ábra A)**. Az automatizált képanalízissel kijelölt Cx43 immunreakció nem vagy csak alig mutatott kolokalizációt a CD163 reakcióval **(21. ábra B)**, vagyis a Cx43 fehérje zömét a CD163-negatív GCTB stromasejtek termelték **(21. ábra C, F)**. Az α -SMA-pozitív GCTB stromasejtekben jelentősen kevesebb Cx43 fehérjét tudunk detektálni ($32,6 \pm 13,4\%$), mint az α -SMA-negatívokban ($p = 0,017$) **(21. ábra D, G)**. Az oszteoklasztokban alig volt Cx43 reakció, amelyet elsősorban az oszteoklasztokkal érintkező mononukleáris sejtekben láttunk **(21. ábra E)**.



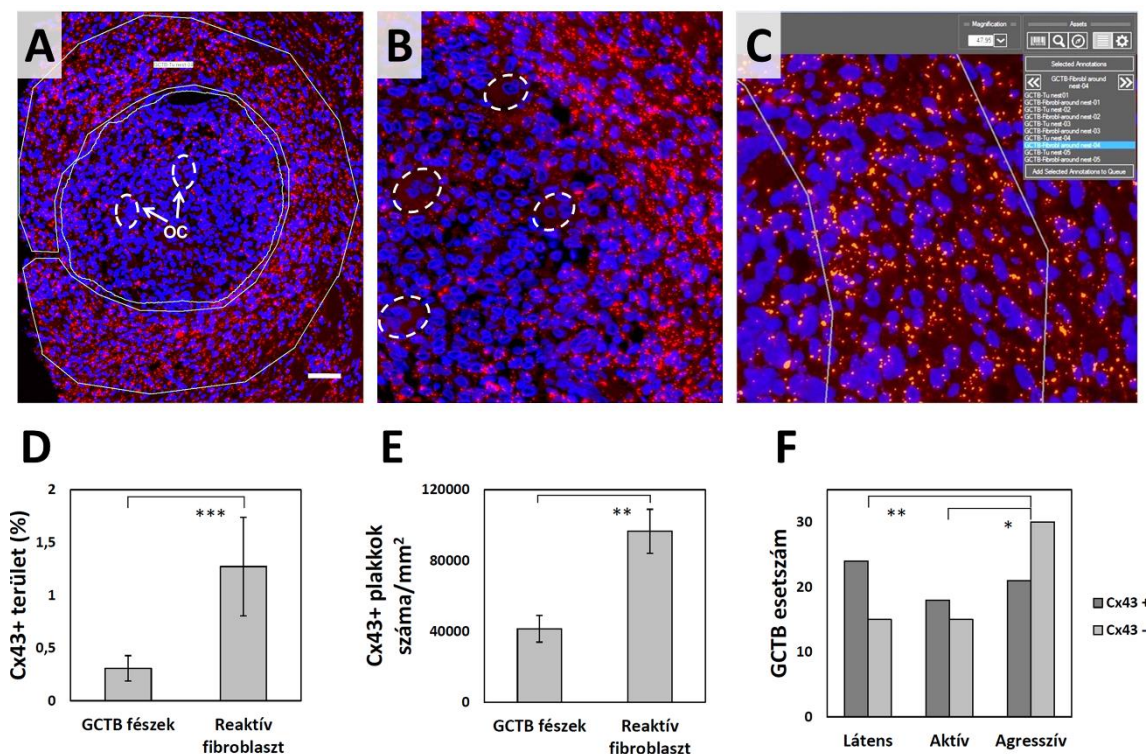
21. ábra. A Cx43 fehérjét termelő sejttípusok meghatározása kettős immunfluoreszcens reakcióval óriássejtes csonttumorban (GCTB). Cx43-pozitív (piros) mononukleáris sejtek ritka kolokalizációja a CD163-pozitív monocita/makrofágokkal (zöld) (A). Automatizált képanalízissel kijelölt Cx43 (piros), illetve CD163-pozitív jelek (zöld) elkülönített csatornákon (B). A Cx43 (piros) és CD163 (zöld) szignálok átfedése (nyílhegyek) (C). A Cx43 jelek (piros) gyakoribb előfordulása az alfa-simaizom aktin (α -SMA)-negatív, mint az α -SMA-pozitív (zöld) sejtekben. A szaggatott négyzettel jelölt területek kinagyítása után (felső és alsó kis kép) látható a vörösvértestek autofluoreszcenciája (szaggatott körök) (D). Cx43 plakkok az oszteoklasztokkal érintkező mononukleáris sejteken (nyíl) (E). Digitális mikroszkópia, méretskála: 20 μ m (A-E). A Cx43 fehérje szignifikánsan emelkedett expressziója a CD163-negatív sejtekben ($p < 0,001$), (F), illetve az α -SMA-negatív sejtekben ($p = 0,017$) (G). Az oszlopokon az átlag \pm szórások (SD) szintjét tüntettük fel. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

A Cx43 fehérje expresszióját mononukleáris sejtekben immunperoxidáz reakcióval, egy 0-tól 8-ig terjedő skálán értékeltük (**22. ábra A, B**). A csontgerendák mentén megmaradt normál oszteoblaszt réteg és az oszteociták nagy mennyiségű Cx43 fehérjét expresszáltak (**22. ábra C**).



22. ábra. Az óriássejtes csonttumor (GCTB) mononukleáris sejtfrakciójának Cx43 fehérje expressziója. Mérsékelt (3+) (nyílhegyek) (A), illetve erős (8+) (B) Cx43 expresszió (piros) a GCTB oszteoklaszt gazdag területein. Erős Cx43 expresszió a csontgerenda mentén elhelyezkedő normál oszteoblaszt rétegben és a csont oszteocitáiban (nyílhegy) (C). Digitális mikroszkópia, méretskála: 30 μ m (A-C).

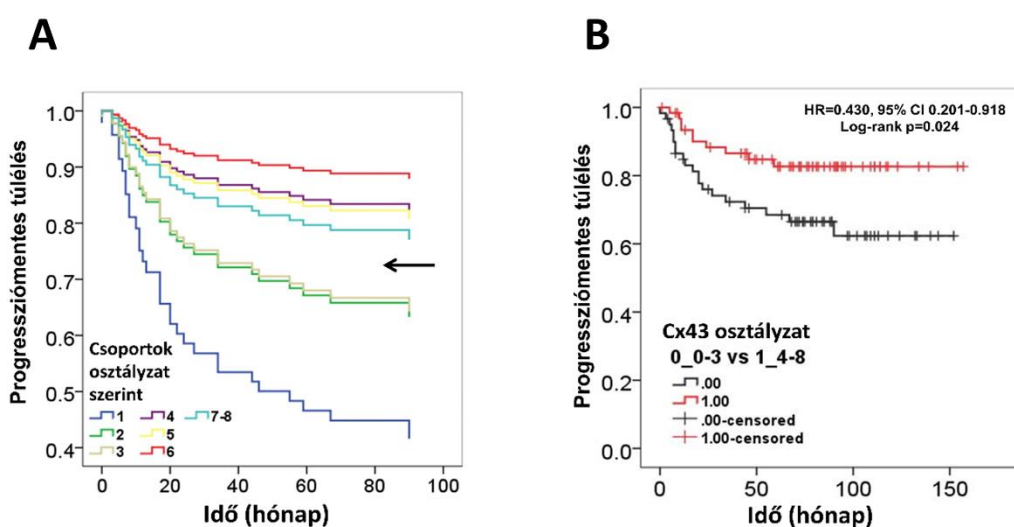
Digitális képanalízis segítségével meghatároztuk, hogy a Cx43 kifejeződés szignifikánsan magasabb volt az oszteoklasztokban gazdag, tumort körülvevő reaktív stromában, mint a tumorfészekben (**23. ábra A-C**). A különbség mind a Cx43-pozitív területhez viszonyítva (**23. ábra D**), mind a Cx43 plakkok számában (**23. ábra E**) szignifikáns volt ($p < 0,001$). A Cx43 fehérje expresszió nem mutatott szignifikáns összefüggést a GCTB rekurrencia gyakoriságával ($U_{MW} = 1277$, $Z = -1,363$, $p = 0,173$), viszont a tumor klinikoradiológiai stádiumával igen. Szignifikánsan több alacsony (negatív) Cx43 fehérjeszintet mutató GCTB eset volt az agresszív csoportban, a látens csoporthoz képest ($p = 0,002$) Bonferroni korrekció ($p < 0,0167$) után, illetve az aktív csoporthoz viszonyítva ($p = 0,018$) Holm-Hochberg korrekció ($p < 0,025$) után (**23. ábra F**).



23. ábra. A Cx43 fehérje immunfluoreszcens detektálása és a Cx43 fehérjeszint klinikopatológiai korrelációja óriássejtes csonttumorban (GCTB). A tumorfészkek és az azt körülvevő reaktív stroma elkülönítése után a Cx43-pozitív (piros) terület és plakk szám meghatározása (OC-oszteoklasztok) (A). Az oszteoklaszt (szaggatott körök) gazdag terület nagyítása (B). Digitális képszegmentációval kijelölt Cx43 plakkok (narancs) automatizált meghatározása (C). Digitális mikroszkópia, méretskála: 80 μm (A), 30 μm (B) és 15 μm (C). A Cx43-pozitív terület szignifikánsan kisebb ($p < 0,001$) a GCTB tumor fészkekben a reaktív stromához képest (D), csakúgy, mint a Cx43 plakkok száma ($p < 0,016$) (E). A Cx43-immunpozitív esetek gyakorisága csökken a klinikoradiológiai agresszivitással és szignifikánsan alacsonyabb az agresszív esetekben a látens ($p = 0,002$), illetve az aktív esetekhez ($p = 0,018$) képest (F). Az oszlopokon az átlag \pm szórások (SD) szintjét tüntetik fel. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Egy 0-8-ig terjedő skálán osztályozva vizsgáltuk a Cx43 fehérjeszint ($n = 123$) és a PFS, vagyis a daganat sebészi eltávolításától a következő eseményig (recidíva, tüdő áttét, malignus transzformáció, esetleg halál) eltelt idő viszonyát. Az univariáns Cox regressziós analízis jelentős különbséget mutatott a 3-as és 4-es osztályzatot kapott Cx43-pozitív csoportok PFS értéke között (1-es és 3-as csoport: HR = 0,505, 95% CI 0,064-3,967; $p = 0,516$; 2-es és 4-es csoport: HR = 0,226, 95% CI 0,025-2,030; $p = 0,184$). Ez a különbség a betegszámot két egyenlő csoportra osztotta, ezért ezt a határértéket választottuk az alacsony (1-3-as osztályzat; $n = 60$, 48,8%), illetve a magas (4-8-as

osztályzat; n = 63, 51,2%) Cx43 expressziós csoportok szétválasztásához (**24. ábra A**). Univariáns Cox regressziós analízissel (HR = 0,430, 95% CI 0,201-0,918; p = 0,024) és log-rank teszttel ($\chi^2 = 5,073$, df = 1, log-rank p = 0,024) kimutattuk, hogy az alacsony Cx43 expresszió szignifikánsan kedvezőtlenebb PFS-el járt (**24. ábra B**). A diagnózisra, életkorra, nemre, tumor grádusra, lokalizációra és sebészi kezelésre korrigálva multivariáns Cox regressziós analízissel még erőteljesebb (HR = 0,411, 95% CI 0,187-0,903; p = 0,027) pozitív szignifikáns összefüggés volt a Cx43 expresszió és a PFS között.

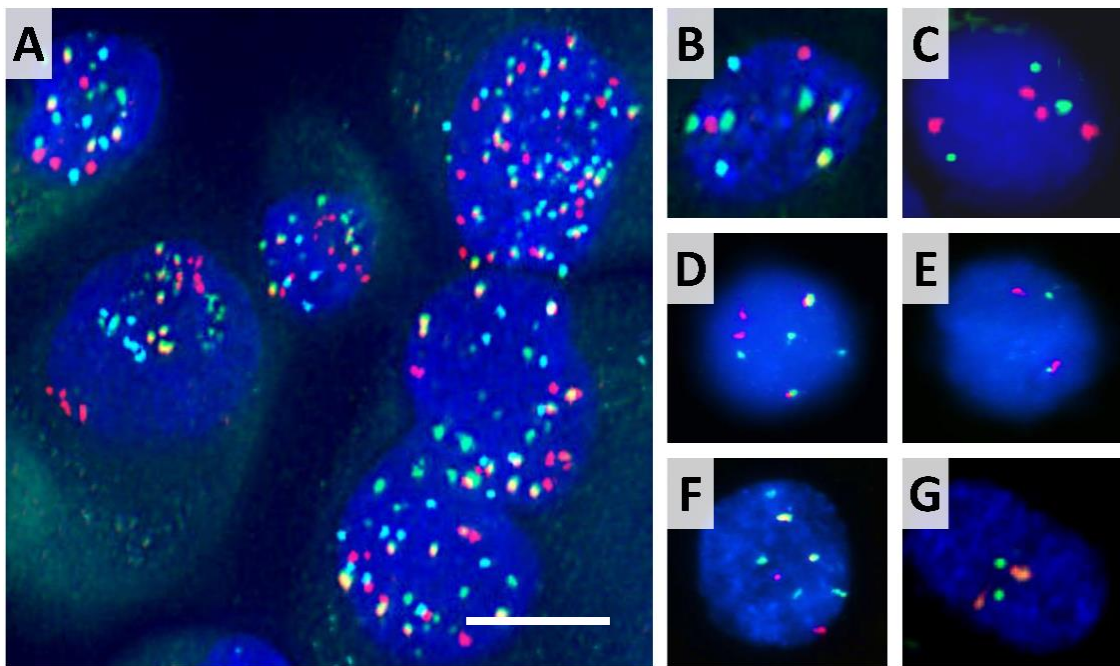


24. ábra. A Cx43 expresszió és a progressziómentes túlélés (PFS) vizsgálata óriássejtes csonttumorban (GCTB), Kaplan-Meier túlélési görbékben ábrázolva. Az 1-3-as, illetve a 4-8-as csoport elválasztása a beteg számot is nagyjából egyenlően osztotta ketté (nyíl), $N_{\text{SCORE 1-3}} = 60$ (48,8%), $N_{\text{SCORE 4-8}} = 63$ (51,2%) (**A**). A magasabb Cx43 expresszióhoz (4-8) szignifikánsan kedvezőbb PFS társult, mint az alacsonyabb expresszióhoz (1-3) (**B**).

4.2.2. A GCTB stromasejtek neoplastikus természetének igazolása FISH módszerrel

A betegek mintáiból izolált, majd tenyésztett GCTB stromasejtek neoplastikus természetét többpróbás FISH módszerrel igazoltuk. A kromoszómák számbeli eltéréseinek kimutatását centromer-specifikus próbák, míg a strukturális eltérések detektálását szubtelomer-specifikus próbák felhasználásával vizsgáltuk. A tenyésztett GCTB stromasejtek többsége különböző mértékű poliszómiát mutatott, a centromerikus 3-as, 4-es, 6-os és X kromoszóma-specifikus próbák alkalmazásával (**25. ábra A**). Egyedi sejtek szintjén aneuszómiákat is megfigyeltünk. A 4-es kromoszóma centromer régiójára

specifikus próba alkalmazása után a 4-es kromoszóma triszómiáját, vagyis három zöld színű fluoreszcens szignált detektáltunk (**25. ábra B**). Néhány sejtben a 11-es kromoszóma tetraszómiája mellett a kromoszóma rövid karján elhelyezkedő telomer régió elvesztését is megfigyeltük (**25. ábra C**). A kontroll sejtek, így a HDFa sejtvonal (**25. ábra D-E**) és a csontvelői stromasejt tenyészet (**25. ábra F-G**) normál diszómiás mintázatot mutatott, vagyis két piros, két zöld, két sárga (piros és zöld színek átfedése) és a női vagy férfi nemnek megfelelően kettő vagy egy világoskék színű fluoreszcens szignált detektáltunk.

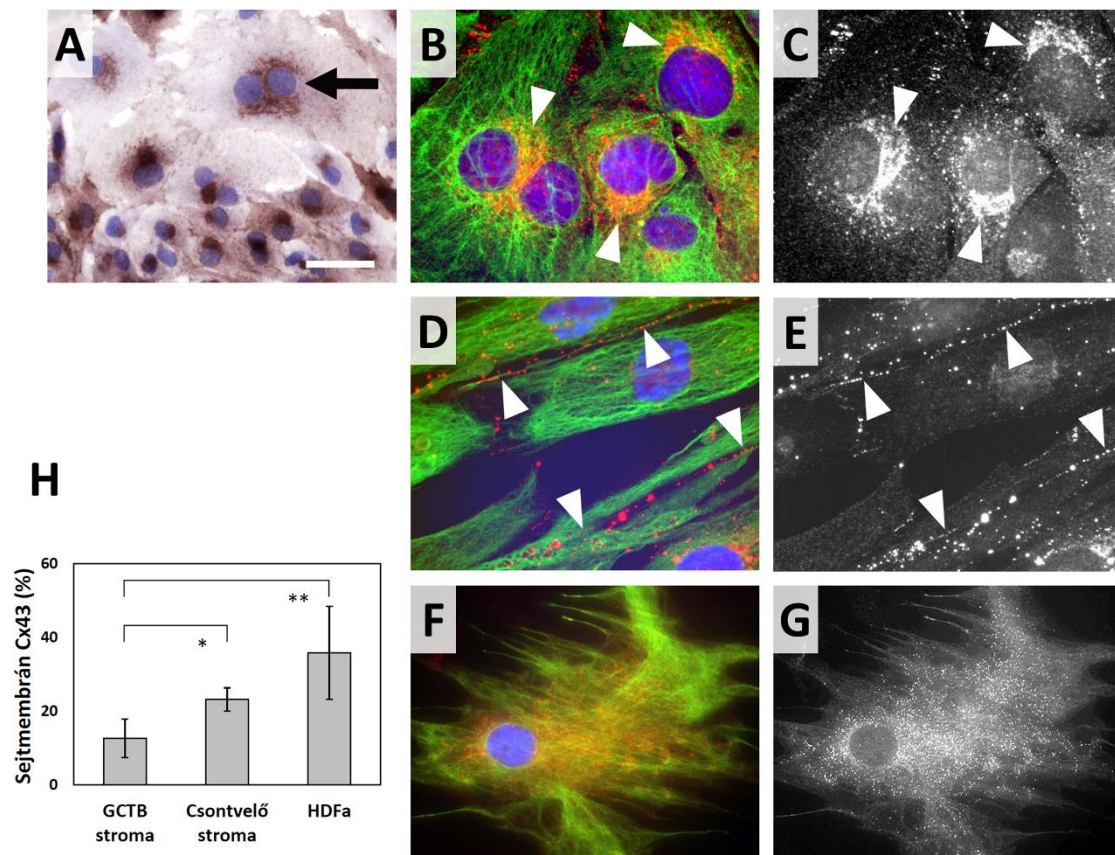


25. ábra. Az óriássejtes csonttumor (GCTB) stromasejtek neoplasztikus eredetének vizsgálata többszínű fluoreszcens *in situ* hibridizáció (FISH) módszerrel. A GCTB stromasejtek poliszómiája a 3-as (piros), a 4-es (zöld), a 6-os (piros) és az X (világoskék) centromerikus kromoszóma próbákkal (**A**). A GCTB stromasejt 4-es kromoszómájának triszómiája (**B**). A GCTB stromasejt 11-es kromoszómájának triszómiája és a 11-es kromoszóma telomer régiójának deléciója (**C**). Normál diszómiás kontroll csontvelői stromasejt (**D, E**) és HDFa sejtvonal (**F, G**). A sejtmagok kék színét a 4',6-diamidino-fenilindol (DAPI) festés adta. Digitális mikroszkópia, digitalizálás 5 optikai síkban, méretskála: 5 μm (**A**) és 2,5 μm (**B-G**).

4.2.3. Connexin43 fehérje expresszió GCTB stromasejtekben

A Cx43 fehérje kifejeződését és sejtben belüli lokalizációját sejtenyészetekben immuncitokémiai módszerrel vizsgáltuk. A Cx43 fehérje immunperoxidáz reakciója paranukleárisan jelent meg a GCTB stromasejtekben. A sejtek jelentős morfológiai

heterogenitást mutattak, méretben és alakban eltértek egymástól, gyakran kétmagvúak voltak (**26. ábra A**). A szubcelluláris lokalizációt immunfluoreszcens módszerrel tovább vizsgáltuk. A Cx43 fehérje a GCTB stromasejtekben döntően az ER-Golgi régióban megrekedt, és csak kis mennyiségben jelent meg a sejtmembránon (**26. ábra B-C**). Ezzel szemben a kontrollként használt HDFa sejtvonalban (**26. ábra D-E**) és a csontvelői stromasejtekben a Cx43 reakció egyenletes eloszlást mutatott, gyakran a sejtmembránhoz kötve (**26. ábra F-G**). Immunfluoreszcens képanalízissel a sejtmembránhoz kötött Cx43 frakció szignifikánsan magasabb volt a kontroll HDFa sejtvonalban ($p < 0,01$) és a csontvelői stromasejtekben ($p < 0,05$), mint a GCTB stromasejtekben (**26. ábra H**).

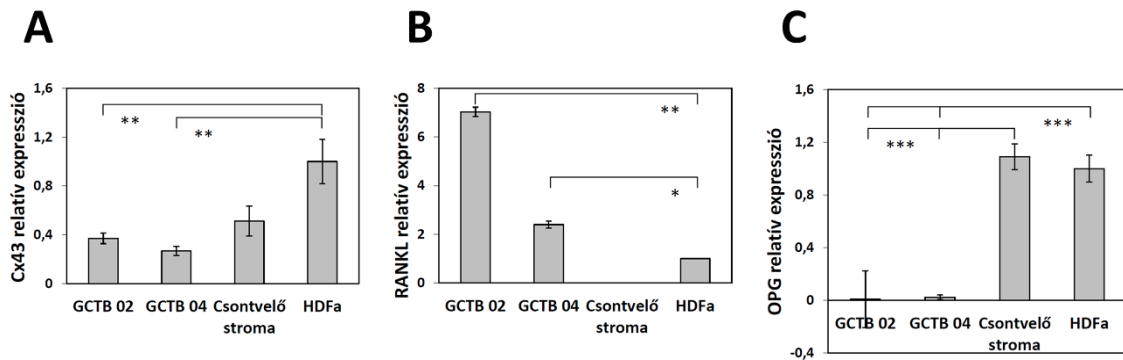


26. ábra. A Cx43 fehérje kifejeződése és sejten belüli lokalizációja óriássejtes csonttumor (GCTB) és csontvelői stromasejt tenyészetekben, illetve HDFa sejtvonalban. Paranukleáris Cx43 immunoperoxidáz reakció a gyakran binukleáris GCTB stromasejtekben (nyíl) (A). A Cx43 fehérje (piros) immunfluoreszcens detektálása a GCTB stromasejtek endoplazmatikus retikulum (ER)-Golgi régiójában (nyílhegyek) (B, C). A HDFa sejtvonalban a Cx43 fehérje (piros) döntően a sejtmembránban (nyílhegyek) (D, E), míg a csontvelői stromasejtekben sejtstrate megfigyelhető (F, G). Jobb oldalon a piros színű csatornát emeltük ki fekete-fehérben (C, E, G). A sejtmagok kék színét a hematoxin (A) és Hoescht (B, D, F) festés, a sejt alakját a vimentin (zöld) (B, D, F) reakció mutatja. Digitális mikroszkópia, méretek: 20 μm (A) és epifluoreszcens mikroszkópia (B-F), skála: 10 μm (B-E) és 15 μm (F, G). A sejtmembrán Cx43 fehérje mennyisége szignifikánsan alacsonyabb a GCTB stromasejtekben, mint a HDFa sejtvonalban ($p < 0,01$), illetve a csontvelői stromasejtekben ($p < 0,05$) (H). Az oszlopok az átlag \pm szórások (SD) szintjét tüntetik fel. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

4.2.4. Cx43, RANKL és OPG mRNS expresszió GCTB stromasejtekben

A Cx43, RANKL és OPG gének átírásának mértékét RT-qPCR módszerrel mértük. GCTB stromasejtekben a Cx43 mRNS szintje szignifikánsan alacsonyabb volt ($p < 0,01$), mint a kontroll HDFa sejtvonal Cx43 mRNS szintje (27. ábra A). Az

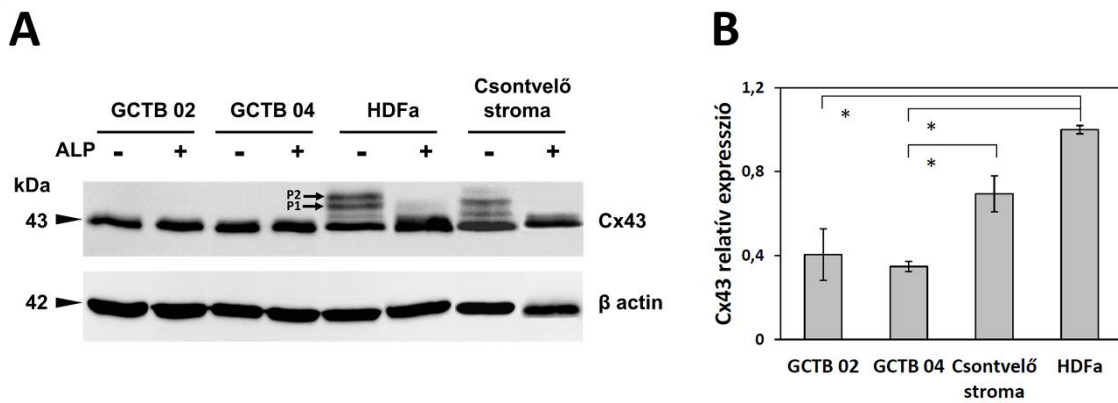
oszteoklasztogenikus RANKL mRNS szintje nem volt detektálható a csontvelői stromasejtekben, míg HDFa sejtvonalban szignifikánsan alacsonyabb ($p < 0,01$) volt, mint a GCTB stromasejtekben (**27. ábra B**). Az oszteoklasztogenezist gátló OPG mRNS-szinttel ellentétben szignifikánsan alacsonyabb volt GCTB stromasejtekben, mint a csontvelői stromasejtekben vagy HDFa sejtvonalban ($p < 0,001$) (**26. ábra C**).



27. ábra. Az oszteoklasztogenezissel összefüggő génexpresszió (relatív mRNS szintek) óriássejtes csonttumor (GCTB) és csontvelői stromasejt tenyészetekben, illetve HDFa sejtvonalban. A Cx43 (**A**), a nukleáris faktor kappa-B-receptor-aktivátor ligand (RANKL) (**B**), illetve az oszteoprotegerin (OPG) (**C**) gének expressziójának szignifikáns eltérései a tenyésztett sejttypusok között. Az oszlopokon az átlag \pm szórások (SD) szintjét tüntettük fel. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

4.2.5. Cx43 foszforiláció vizsgálata GCTB stromasejtekben Western blot módszerrel

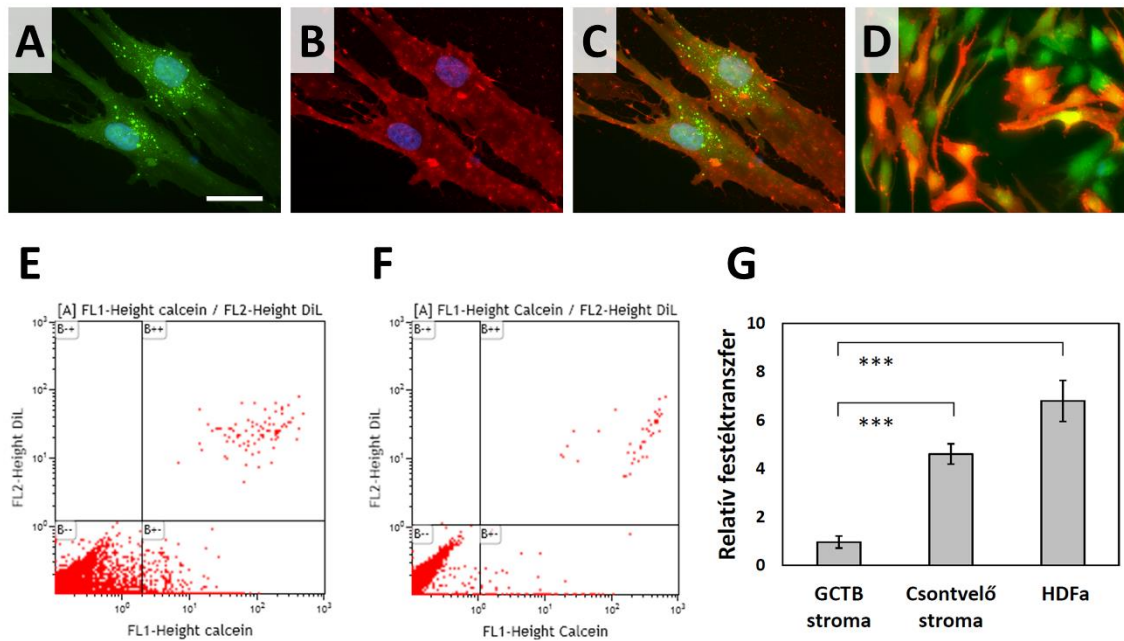
A Cx43 fehérje expresszióját sejtenyészetekben Western blot módszerrel is vizsgáltuk. A kontrollként alkalmazott HDFa sejtvonalban és a csontvelői stromasejtekben a 43 kDa méretnek megfelelő sáv felett két plusz sáv volt megfigyelhető, ami a GCTB stromasejtekben hiányzott. Az ALP kezelés a két extra sávot eltüntette, ami igazolta foszforilált fehérje természetüket (P_1 és P_2) (**28. ábra A**). A Western blot sávok intenzitásának denzitometriás értékelése alapján a GCTB stromasejtekben a Cx43 fehérje expressziója szignifikánsan alacsonyabb volt a β -aktin denzitásához normalizálva, mint a kontroll csontvelői stromasejtekben vagy HDFa sejtvonalhoz képest ($p < 0,05$) (**28. ábra B**).



28. ábra. A Cx43 fehérje Western blottal történő detektálása óriássejtes csonttumor (GCTB) és csontvelői stromasejt tenyészetekben, illetve HDFa sejtvonalban. Alkalikus foszfatáz-kezelés (ALP+) hatására a foszforilált sávok (P1 és P2) eltűntek (A). A Cx43 fehérje relatív mennyisége szignifikánsan magasabb a kontroll csontvelői stromasejtekben és HDFa sejtvonalban, a GCTB stromasejtekhez képest ($p < 0,05$) (B). Az oszlopokon az átlag \pm szórások (SD) szintjét tüntettük fel. * $p < 0,05$.

4.2.6. A Cx43 kommunikációs csatornák funkcionális vizsgálata áramlási citometriával

A Cx43 csatornafunkció szerepét a sejtek közötti kommunikációban festéktranszfer módszerrel áramlási citometriával vizsgáltuk. A GCTB stromasejtekben a Cx43 fehérje megrekedése az ER-Golgi régióban és a hiányos Cx43 foszforiláció a Cx43 membrán transzport zavarára utalt. A fluoreszcens festékekkel (Dil és kalcein) kettősen jelölt sejteket (29. ábra A-D) 1:9 arányban ugyanolyan jelöletlen sejtekkel együtt tenyésztettük 5 órán át, majd a connexin csatorna-permeábilis zöld színű kalcein megjelenését mértük az eredetileg jelöletlen sejtekben. A GCTB stromasejtekben szignifikánsan alacsonyabb festéktranszfert mértünk, mint a kontroll sejtekben. A metabolikus kapcsolatot jelző kalcein fluoreszcenciája eredetileg jelöletlen sejtekben átlagosan a GCTB stromasejtek 0,98%-ában (29. ábra E), míg a kontroll HDFa sejtvonal 7,13%-ában (29. ábra F), illetve a csontvelői stromasejtek 4,6%-ában fordult elő. Tehát a kontroll HDFa sejtvonalban és csontvelői stromasejtekben a festéktranszfer legalább hétszer nagyobb volt, mint a GCTB stromasejtekben mért transzfer értékhez képest ($p < 0,001$) (29. ábra G).



29. ábra. Festéktranszfer és a sejtek közötti kommunikáció meghatározása áramlamos citometriával óriássejtes csonttumor (GCTB) és csontvelői stromasejt tenyészetekben, illetve HDFa sejtvonalban. A kalcein acetoximetil-észter (kalcein AM) és az 1,1'-dioktadecil-3,3,3'-tetra-metilin-dodikarbocianin (Dil) jelölt GCTB stromasejtekben található kalcein detektálása (zöld színű fluoreszcencia) (A), Dil detektálása (piros színű fluoreszcencia) (B) és a kalcein és Dil együttes detektálása (zöld és piros színű fluoreszcencia) (C, D). A sejtmagok kék színét a 4',6-diamidino-fenilindol (DAPI) festés adta. Epifluoreszcens mikroszkópia, méretskála: 10 μ m (A-C) és 50 μ m (D). Bal alsó kvadráns (B- -): nem jelölt sejtek; jobb alsó kvadráns (B+ -): egyszeresen, kalceinnel jelölt sejtek; jobb felső kvadráns (B++): kétszeresen jelölt sejtek. Az egyszeresen kalcein-pozitív sejtek százaléka (B+ -) a GCTB stromasejtekben (E) és a HDFa sejtvonalban (F). A relatív sejt-sejt kommunikáció szignifikáns csökkenése a GCTB stromasejtekben a csontvelői stromasejtek és a HDFa sejtvonalhoz képest ($p < 0,001$) (G). Az oszlopokon az átlag \pm szórások (SD) szintjét tüntetik fel. *** $p < 0,001$.

5. MEGBESZÉLÉS

5.1. EGFR szerepe GCTB-ben

Az értekezésben az EGFR és Cx43 fehérjék expresszióját és szerepét vizsgáltuk GCTB-ben, ami egy lokálisan agresszív oszteolitikus daganat. A GCTB progressziója, recidívakészsége hagyományos szövetpatológiai jelek alapján nem jósolható meg és erre megbízható biomarkert sem ismerünk. Elsősorban a daganat neoplasztikusnak tartott stromasejt populációját vizsgáltuk, amely a patológiás oszteoklasztogenezis szabályozásában elsődleges szerepet játszik [29,158].

Eredményeink azt mutatják, hogy a GCTB stromasejtekben az EGFR fehérje gyakran felülregulált, amelynek mértéke pozitív statisztikai korrelációt mutat a GCTB progressziójával és klinikoradiológiai agresszivitásával. A foszfortirozin epitópok (pY1068 és pY1173) kifejeződésének igazolása a stromasejtekben bizonyítja, hogy az EGFR jelút aktiválódik, a receptor parakrin aktiválása révén, amiben szerepet játszanak a monocita/makrofág sejtek által termelt, és az általunk is igazolt EGFR ligandok (EGF és a TGF α). A funkcionális *in vitro* sejt kísérletek ugyancsak alátámasztják, hogy az EGFR jelút serkenti a GCTB stromasejtek proliferációját, ugyanakkor nem játszik szerepet az oszteoklasztok differenciációjában. Továbbá, az együttes EGF- és M-CSF-kezelés támogatja az oszteoklaszt típusú multinukleáris óriás sejtek keletkezését, de nem serkenti az oszteolitikus aktivitást és az ezzel járó csontlebonthatást.

Óriássejtes csonttumorban a patológiás oszteolízist az oszteoblaszt eredetű stromasejtek szabályozzák, amelyek aktivációjáért az oxigéntenzió, a citokinek és a növekedési faktorok felelősek, amelyek membrán receptorokon, így az EGFR-en keresztül is hatnak [29,159,160]. A normál fiziológiás csontújraképződés („remodeling”) során az EGFR által közvetített jelutak fontos szerepet játszanak az oszteoblasztok proliferációjának szabályozásában és az oszteoklasztok toborzásában [99,161,162]. Eredményeink azt mutatják, hogy a GCTB-ben az EGFR jelút aktiválásának elsődleges szerepe a stromasejtek proliferációjának serkentése és nem az oszteoblaszt differenciáció.

Az csont lebontásáért felelős oszteoklasztok az oszteoblaszt eredetű M-CSF hatására felszaporodó monocita/makrofág sejt populációból az ugyancsak oszteoblasztok által termelt RANKL hatására keletkeznek. Ezt a folyamatot a kis molekulatömegű, EGFR-t blokkoló gefitinib képes gátolni a stromasejtek által termelt M-CSF és a RANKL

expressziójának gátlásán keresztül [163]. A funkcionális *in vitro* sejtkísérleteink azt mutatják, hogy az EGF és az M-CSF a monocita sejt kultúrában ehhez hasonló mértékű TRAP-pozitív, oszteoklaszt-szerű multinukleáris óriássejtképződést eredményez. Az EGFR jelentőségét a GCTB oszteoklasztogenezis során szöveti metszeteken nyert megfigyeléseink is igazolták, amelyek alapján az EGFR-pozitív GCTB esetekben nagyobb számban voltak jelen az oszteoklasztok, mint az EGFR-t kisebb mértékben kifejező (negatív) GCTB esetekben. Az EGFR fehérjét elsősorban a GCTB stromasejtekben detektáltuk és nem a monocita/makrofág vagy oszteoklaszt típusú multinukleáris óriássejtekben. Az irodalomban leírtakhoz hasonlóan [159] megfigyeléseink is arra utalnak, hogy az EGFR közvetett úton, az oszteoblaszt típusú stromasejtek citokin termelésén keresztül közvetett úton támogatja az oszteoklasztogenezist. Újjonnan közölt adatok alapján, az oszteoklasztokban az EGFR jelút hatással lehet („cross-talk”) a RANK szignálútra, amelynek aktiválása szerepet játszik az mCD14 expresszió csökkenésében a monocita sejtekben [164], felvetve az EGFR közvetlenebb szerepét a GCTB oszteoklasztogenezis során.

Az EGFR fehérje expresszió a GCTB neoplasztikus sejt populációját alkotó mononukleáris stromasejtekre korlátozódott [165], és az EGFR szintje pozitív korrelációt mutatott a betegség progressziójával és a klinikoradiológiai agresszivitással. Az EGFR-pozitív esetek gyakorisága nem mutatott szignifikáns különbséget a rekurrens, metasztatikus és a malignus esetek között, ami alátámasztja az oszteosarkómában mások által közölt eredményeket [166]. Az EGFR fehérje szintje nem változott szignifikánsan a betegség progressziója során azonos betegekben sem, ami arra utal, hogy az EGFR hatásához köthető kiújulás vagy áttétképző hajlam már a primer tumorban meghatározott. A daganat progressziójában azonban más faktorok, így a sebészi beavatkozás és a lokális adjuváns terápia sikeressége [167] is szerepet játszhatnak. Az alacsonyabb EGFR szinttel rendelkező (negatív) esetek gyakoribbak a primer, nem rekurrens esetekben, amelyek jobban reagálnak a standard kezelésekre, míg az EGFR-pozitív esetek nagyobb számban fordulnak elő a rekurrens, illetve a metasztatikus GCTB csoportokban, valamint a malignus esetekben. Tehát az EGFR immunológiai detektálása a primer daganatokban a 3C6 antitest klónnal segítheti a GCTB progressziójának előrejelzését.

A GCTB esetekben nem találtunk sem EGFR gén amplifikációt, sem pontmutációt vagy deléciót a tirozin-kináz domént kódoló exonokban. Ebből arra

következtethetünk, hogy az EGFR felülregulációja a HIF által közvetített növekedési jelutak aktiválásán keresztül valósulhat meg, amit glioma, emlő- és prosztatadaganatokban is megfigyeltek [168]. Kimutatták, hogy a hipoxia és a HIF képesek szabályozni az oszteolitikus fenotípust a GCTB-ben, amelyben a funkcionális hipoxia kialakulása ismert [29]. A hipoxia indukálhatja az EGFR és a HIF-1 α gén átírását [169,170], és az EGFR aktiváció pedig felülregulálhatja a HIF-1 α termelődését, mind hipoxiás, mind normoxiás viszonyok között [171].

Az egyedi, sejtszintű *in situ* antigén meghatározás komplex szövetekben alkalmas a vizsgált sejtípusok fehérje szintjének és az adott betegség klinikopatológiai paramétereinek és összefüggéseinek feltárására. A TMA módszer biztosítja az elemzés nagy hatékonyságát, míg a dedikált software és a digitális metszetek, valamint a digitálisan hozzárendelhető betegadatok megkönnyítik a szakértők által validált értékelést.

5.2. Cx43 direkt sejt-sejt kommunikáció prognosztikus jelentősége a GCTB-ben

A Cx43 által alkotott direkt sejtkommunikációs csatornák fontos szerepet játszanak a csontszövet fejlődésében és a csont átépülésében. Ez a szerep a csontképző sejtek metabolikus összekapcsolásán keresztül és a túlélésüket támogató (anabolikus) gének expressziójának pozitív szabályozása által valósul meg [172,173]. A connexinek részt vesznek az oszteoblasztok proliferációjának szabályozásában, differenciációjában, a szolúbilis faktorok, illetve mechanikai ingerek által kiváltott szignálok közvetítésében, valamint az oszteoblasztok és oszteociták közötti tápanyagtranszportban [174]. Emellett a Cx43 csatornák a csontvelői stromasejteken keresztül hozzájárulnak a vérképzésért felelős hematopoetikus őssejtek nyugalmi állapotának és túlélésének fenntartásában, illetve csontvelő-abláció után elősegítik a hematopoetikus őssejtek megfelelő mikrokörnyezetbe vándorlását („homing”) [175–177]. Tehát a csont és a csontvelő között a Cx43 csatornák lehetővé teszik az oszteogenikus sejtek és a hematopoetikus stromasejtek alkotta szinciciális funkciók koordinálását.

A Cx43 expressziójának és funkciójának megváltozása módosítja az oszteoblasztok differenciációját szabályozó gének expresszióját [178]. Az egérben indukált GJA1 gén ablációja vagy az ODDD-szerű pontmutációk oszteopéniás fenotípust eredményeznek, ami az oszteoblaszt működési zavara és az OPG fehérje csökkent

termelődése miatt megnövekedett oszteoklasztogenezissel jár [137]. Ez alapján a Cx43 fehérje elsődleges szerkezetében bekövetkező akár egyetlen aminosavcsere, domináns negatív hatással, a Cx43 membráncsatorna hibás működését eredményezheti. Feltételezésünk szerint a GCTB stromasejtekben detektált Cx43 membráncsatornák számának szignifikáns csökkenése hasonlóan korlátozhatja a rés-kapcsolat és a connexon félcsatorna által szabályozott funkciókat, amelyek létfontosságúak a csontszövet homeosztázisának fenntartásában. A szakirodalomban már leírták, hogy az oszteoklasztok működését gátló, a csonttrikulás kezelésére szolgáló biszfoszfonátok az oszteoblaszt és oszteocita sejtek apoptózist gátolják, melyet a Cx43 félcsatornák közvetítenek [167,179]. Ez alapján feltételezhető, hogy a Cx43 expresszió, a sejtmembrán transzport és a kommunikáció terápiás célú serkentése támogatja a biszfoszfonátok anti-oszteoklasztogénikus hatását óriássejtes csonttumorban.

A GCTB klinikoradiológiai stádiumát meghatározó kortikális érintettség összefügg az oszteoklasztok által előidézett oszteolízis mértékével [3]. Egér modellben a Cx43 csatorna károsodott működése, az oszteoblaszt érés zavara, a sejtek közötti kommunikáció hiánya és a csökkent OPG termelés miatt, fokozott oszteoklaszt aktivitást és oszteolízist okoz, ami károsodott csontátépülést („remodeling”) eredményez [137]. Az általunk talált szignifikáns korreláció a csökkenő Cx43 fehérjeszint és metabolikus kommunikáció GCTB stromasejtekben, összefügg az agresszív tumor fenotípussal, illetve a rosszabb PFS-sel. Ezt az eredményt az általunk mért oszteoklasztogénikus RANKL mRNS szintjének emelkedése, illetve az oszteoklasztogenezis gátló OPG mRNS szintjének csökkenése igazolta GCTB stromasejtekben a kontroll stromasejtekhez képest.

Sejtenyészetben az izolált GCTB stromasejtek neoplasztikus természetét kombinált FISH módszerrel igazoltuk a poliszómiák és az egyedi, sejtszintű aneuszómiák alapján [160]. Mivel a GCTB stromasejtek „normál” megfelelőjeként szóba jövő oszteoblasztok sejtenyészetben könnyen tovább differenciálódnak, kétféle kontroll sejtet vizsgáltunk, a csontvelői stromasejteket és a HDFa sejt vonalat. A kontroll sejtekben a Cx43 fehérje és a csatornák zömében a sejtmembránban lokalizálódtak, míg tenyésztett GCTB stromasejtekben az ER-Golgi régiójában halmozódtak fel és ritkán jutottak a sejtmembránba. Emellett a Cx43 fehérje foszforilációja is elmaradt a kontrollként használt sejtekhez képest. A Cx43 fehérje foszforilációjának fontossága a poszt-transzlációs Cx43 csatorna összeszerelődésében, a membránba történő transzportban, a

csatorna lebontásának és áteresztő képességének szabályozásában nyilvánul meg [113,125]. A kontroll sejtekben Western blot módszerrel kapott alkalikus foszfatáz-szenzitív extra sávok (P1 és P2) a Cx43 fehérje legalább két szerinjének (S369, S372, vagy S373) foszforilációját igazolják. A Ser369 és Ser373 oldalláncok foszforilációja az Akt útvonalon keresztül elősegíti a Cx43 és a 14-3-3 fehérje közötti kölcsönhatás kialakulását, membránba való transzportját és a csatornák stabilitásának fenntartását [128,180]. A PKA általi foszforiláció a Cx43 csatornák összeszerelődésének és áteresztő képességének szabályozásában játszik fontos szerepet [181,182]. A fentiek alapján elmondható, hogy a Cx43 fehérje foszforilációjának hiánya a GCTB neoplasztikusnak tartott stromasejtjeiben hozzájárulhat a Cx43 fehérje károsodott sejtmembrán transzportjához és a csökkent csatornafunkciókhoz. Mivel Cx43 génmutációkat még malignus daganatokban sem igazoltak, ezért a hibás foszforiláció háttérében valószínűleg poszttranszlációs hatások állnak.

A Cx43 fehérje expressziója alapvetően ubikviter, minden szövetben kifejeződik, így a csontszövetet alkotó sejtekben is megtalálható, ahol részt vesz az oszteoblasztok, oszteociták és oszteoklasztok működésében [137]. A CD163 egy hemoglobin scavenger receptor, amit a monocita/makrofágok expresszálnak és az oszteoklasztok felszínéről hiányzik [183]. Kimutattuk, hogy a Cx43 fehérje mennyisége szignifikánsan magasabb volt a CD163-negatív stromasejtjelekben, a CD163-pozitív monocita eredetű sejtekhez képest. Ismert az is, hogy a Cx43 fehérje a multicelluláris működések összehangolásában vesz részt a mezenhimális őssejtjelekben és az ezekből származó oszteoblasztokban, csontvelői stromasejtjelekben és stromális fibroblasztokban [172,175,184]. A primer monociták és makrofágok, valamint ezek sejtvonalai a gyulladásos és szövet regenerációs folyamatok kivételével kevésbé használják a Cx43 csatornákat [185]. Mivel a CD163-pozitív mononukleáris sejtfrakció nem mutatott szignifikáns összefüggést a PFS-sel, valószínű, hogy a CD163-negatív stromasejt frakció Cx43 fehérjeszintje határozza meg a GCTB kimenetelét. Kimutattuk, hogy GCTB szövetben a csontgerendák mentén megmaradt oszteoblaszt réteg és az oszteociták nagy mennyiségű Cx43 fehérjét termelnek, ami támogatja ezen sejtek együttműködését [172], és esetünkben a Cx43 reakció pozitív kontrolljaként is szolgált. Az oszteoklasztokban a Cx43 fehérjék előfordulása ritka, elsősorban mononukleáris sejtekkel közvetlenül érintkezve láthatók, így valószínű, hogy ezeket legalább részben az oszteoklasztokkal fuzionáló

mononukleáris sejtek hordozták. Mivel a Cx43 sejt-sejt kapcsolat gátlása az oszteoklaszt típusú óriássejtek sejtmag számának mérséklődését eredményezi, a direkt sejt-sejt kommunikáció szerepe fontos lehet a monocita és oszteoklaszt sejtek fúziójában is [186].

A primer tumorok, így a GCTB is, gyakran mutatnak α -SMA-pozitivitást [18], ami leginkább a stromasejtek miofibroblasztos differenciációjával és migrációs fenotípusával hozható kapcsolatba. Kimutattuk a Cx43 fehérje expressziójának csökkenését az α -SMA-pozitív esetekben, az α -SMA-negatív GCTB stromasejteket tartalmazó esetekhez képest. Ez a megfigyelés megegyezik az irodalmi adatokkal, amelyek szerint a Cx43 fehérje expresszió csökken a miofibroblaszt differenciáció során [187–189]. Azonban a Cx43 fehérje által képzett kommunikációs csatornák szerepe fontos lehet a fibroblaszt-miofibroblaszt átalakulásban, mivel az ODDD-szerű Cx43 mutációt hordozó fibroblasztok α -SMA termelése lecsökken [190]. A Cx43 csatornák képesek közvetíteni a TGF β által indukált szignálokat, amelyek a fibroblaszt-miofibroblaszt differenciáció fontos vezérlői [191]. Ennek megfelelően, a GCTB stromasejtekben található mérsékelt mennyiségű Cx43 membráncsatorna még elegendő a miofibroblaszt differenciáció iniciálásához.

6. AZ ÉRTEKEZÉS EREDETI MEGFIGYELÉSEI

Eredményeink az alábbi eredeti megfigyelésekhez vezettek:

1. Az EGFR fehérjét főleg a neoplasztikus stromasejtek termelik. Az EGFR aktivitását a C-terminális autofoszforilációs doméneinek, a pY1068 és a pY1173 kimutatásával igazoltuk, amelyek az EGFR-pozitív esetek 72%-ában voltak jelen.
2. Az EGFR expresszió korrelál a GCTB progresszióval és a klinikoradiológiai agresszivitásával.
3. Az emelkedett EGFR fehérjeszint háttérben sem génamplifikáció, sem a tirozinkináz domén mutációja nem mutatható ki, ezért valószínű, hogy epigenetikai okokra vezethető vissza.
4. *In vitro* az EGF-kezelés a GCTB stromasejt proliferációjának serkentésével közvetve serkenti az oszteoklasztogenezist, de közvetlenül az oszteoklasztokat nem aktiválja.
5. Az ugyancsak főként a neoplasztikus stromasejtek által termelt Cx43 fehérje expressziója negatív korrelációt mutat a GCTB klinikoradiológiai agresszivitásával, és pozitív kapcsolatot a daganat PFS-ével.
6. A GCTB stromasejt tenyészetben a Cx43 fehérje az ER-Golgi rendszerben megreked, csökkent sejtmembrán lokalizációt és foszforilációt mutat. Emiatt a sejtek közötti direkt sejt-sejt kommunikáció csökken a GCTB neoplasztikus stromasejtjei között.
7. A GCTB stromasejt tenyészetben a csökkent Cx43 és OPG mRNS szint emelkedett RANKL szinttel jár együtt, a kontroll reaktív stromasejtekhez képest, ami felveti a deregulált csatornák és sejt-sejt kommunikáció szerepét a patológiás oszteoklasztogenezisben.

7. ÖSSZEFOGLALÓ

Az értekezésben két potenciális biomarker, az EGFR és a Cx43 fehérje szerepét és hatását tanulmányoztam óriássejtes csonttumor (GCTB) szöveti mintáin és GCTB stroma sejtenyészeten. Az EGFR és a Cx43 fehérje elsősorban a mononukleáris sejtfrakció neoplasztikusnak tartott stromasejt populációjában volt megfigyelhető. Kimutattuk, hogy az EGFR fehérje expresszió mértéke korrelál a daganat progressziójával és a klinikoradiológiai agresszivitásával. Az EGFR jelút pálya aktivitása az esetek 75%-ában kimutatható volt. Az EGFR fehérje fokozott expressziója az oszteoklasztok számának növekedésével járt együtt, ami felveti szerepét az oszteoklasztogenezisben. *In vitro* kísérletekben az EGF-kezelés, az oszteoblasztok proliferációjának serkentése révén, indirekt módon indukálta az oszteoklasztok keletkezését a kanonikus útvonalhoz tartozó ligandokhoz hasonló mértékben, de nem játszott szerepet az oszteoklasztok aktivációjában. Tehát az EGFR jelút aktiválása szerepet játszhat az GCTB progressziójában az oszteoklasztogenezist vezérlő neoplasztikus stromasejtek proliferációjának támogatásával, ami közvetve hozzájárul a patológiás oszteolízishez. Ennek megfelelően az EGFR receptorszint immunhisztokémiai kimutatása segítheti a GCTB progressziójának előrejelzését.

Nagyszámú GCTB esetben bizonyítottuk, hogy a csökkent Cx43 expresszió szignifikáns összefüggést mutat a daganat klinikoradiológiai agresszivitásával és a kedvezőtlenebb PFS-sel. Tenyésztett GCTB stromasejtekben megfigyeltük, hogy a Cx43 fehérje elsősorban az ER-Golgi régióban megreked, membrántranszportja csökkent és a fehérje foszforilációja is elmaradt a kontroll sejtekhez képest. A deregulált és csökkent számú Cx43 sejtmembráncsatorna a GCTB stromasejtek közötti metabolikus kommunikáció szignifikáns csökkenéséhez vezetett. Az GCTB stromasejt tenyészetben az oszteoklasztogenezist serkentő RANKL mRNS szintje emelkedett, illetve az oszteoklasztogenezist kontrolláló OPG génexpressziója csökkent a kontroll sejtekéhez képest. Eredményeink alapján feltételezzük, hogy GCTB-ben a deregulált Cx43 kommunikációs csatornák hozzájárulnak a patológiás oszteolízishez és a GCTB rosszabb kimeneteléhez, ami a csatornák terápiás célú felülregulálásával és membrántranszportjának támogatásával mérsékelhető lehet.

8. SUMMARY

In the PhD thesis I have studied two potential biomarkers, EGFR and gap junction forming Cx43 proteins in giant cell tumour of bone (GCTB) by using pathological tissue samples and GCTB stromal cell cultures. Both EGFR and Cx43 were primarily expressed by GCTB neoplastic mononuclear stromal cells of osteoblastic origin. EGFR protein expression showed positive statistical correlation with tumour progression (recurrence) and clinicoradiological aggressiveness. The activation of EGFR pathway was detected in 75% of cases. Elevated EGFR protein levels were also linked to increased number of osteoclasts, suggesting a role for EGFR pathway in osteoclastogenesis. *In vitro*, EGF treatment induced osteoclastogenesis indirectly through stimulation of osteoblast proliferation similarly to the canonical pathway, but EFG did not induce osteoclasts activation. Our results suggest that the activation of EGFR pathway may play a role in GCTB progression, by supporting osteoclastogenesis through neoplastic stromal cells proliferation, which indirectly contributes to pathological osteolysis. Therefore, immunodetection of EGFR receptor level may help in assessing GCTB progression.

We have proved that reduced Cx43 expression significantly correlated both with the clinicoradiological aggressiveness and worse PFS of GCTB cases. In cultured GCTB stromal cells Cx43 protein was mainly stuck in ER-Golgi region, instead of localizing in the cell membranes as it was seen in control stromal cells. This was also accompanied by the deficient phosphorylation of Cx43 in GCTB stromal cells, compared to control stromal cells. Deregulation and decreased number of Cx43 cell membrane channels among GCTB stromal cells, led to significant decrease in metabolic communication. In GCTB stromal cell culture the osteoclastogenesis stimulating RANKL mRNA level was increased, while the osteoclastogenesis controlling OPG gene expression decreased compared to control cells. Based on our results we suppose that deregulation of Cx43 communication channels is likely to contribute to the pathological osteolysis and worse outcome in GCTB, which might potentially be alleviated by therapeutic upregulation and support of cell membrane trafficking of Cx43 channels.

9. IRODALOMJEGYZÉK

1. Athanasou N A, Bansal M, Forsyth R, Reid R P, Sági Z (2013) Giant cell tumour of bone. In: Fletcher CD, Bridge JA, Hogendoorn PC, eds. WHO Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone. In: IARC; 2013:321–324.
2. Lee MJ, Sallomi DF, Munk PL, Janzen DL, Connell DG, O’Connell JX, Logan PM, Masri BA (1998) Pictorial review: giant cell tumours of bone. *Clin Radiol* 7: 481-489.
3. Szendrői M (2004) Giant-cell tumour of bone. *J Bone Joint Surg Br* 1: 5-12.
4. Naam NH, Jones SL, Floyd J, Memisoglu EI (2014) Multicentric giant cell tumor of the fourth and fifth metacarpals with lung metastases. *Hand N Y N* 3: 389-392.
5. Kransdorf MJ, Sweet DE, Buetow PC, Giudici MA, Moser RP (1992) Giant cell tumor in skeletally immature patients. *Radiology* 1: 233-237.
6. Fong YC, Chen TH, Chen WM, Lo WH (1997) Giant-cell tumor of bone around the knee. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi Chin Med J Free China Ed* 4: 240-247.
7. Bhojraj SY, Nene A, Mohite S, Varma R (2007) Giant cell tumor of the spine: A review of 9 surgical interventions in 6 cases. *Indian J Orthop* 2: 146-150.
8. Bajpai J, Saini S, Bajpai A, Khera R (2013) Rare presentation of giant cell tumor of bone in the lateral end of the clavicle. *Am J Case Rep*: 235-237.
9. van der Heijden L, Dijkstra PDS, van de Sande MAJ, Kroep JR, Nout RA, van Rijswijk CSP, Bovée JVMG, Hogendoorn PCW, Gelderblom H (2014) The Clinical Approach Toward Giant Cell Tumor of Bone. *The Oncologist* 5: 550-561.
10. Cooper AP, Travers B (1818) *Surgical Essays*. Cox
11. Bloodgood J (1912) A conservative treatment of giant cell sarcoma with the study of bone transplantation. *Ann Surg*: 210-239.

12. Jaffe E, Lichtenstein L, Portis RB (1940) Giant cell tumor of bone: its pathologic appearance, grading, supposed variants and treatment. *Arch Pathol*: 993-1031.
13. Werner M (2006) Giant cell tumour of bone: morphological, biological and histogenetical aspects. *Int Orthop* 6: 484-489.
14. Wülling M, Engels C, Jesse N, Werner M, Delling G, Kaiser E (2001) The nature of giant cell tumor of bone. *J Cancer Res Clin Oncol* 8: 467-474.
15. Steensma MR, Tyler WK, Shaber AG, Goldring SR, Ross FP, Williams BO, Healey JH, Purdue PE (2013) Targeting the giant cell tumor stromal cell: functional characterization and a novel therapeutic strategy. *PloS One* 7: e69101.
16. Huang L, Teng XY, Cheng YY, Lee KM, Kumta SM (2004) Expression of preosteoblast markers and Cbfa-1 and Osterix gene transcripts in stromal tumour cells of giant cell tumour of bone. *Bone* 3: 393-401.
17. Lehner B, Kunz P, Saehr H, Fellenberg J (2014) Epigenetic silencing of genes and microRNAs within the imprinted Dlk1-Dio3 region at human chromosome 14.32 in giant cell tumor of bone. *BMC Cancer*: 495.
18. Hemingway F, Kashima TG, Mahendra G, Dhongre A, Hogendoorn PCW, Mertens F, Athanasou NA (2012) Smooth muscle actin expression in primary bone tumours. *Virchows Arch Int J Pathol* 5: 525-534.
19. Atkins GJ, Bouralexis S, Haynes DR, Graves SE, Geary SM, Evdokiou A, Zannettino AC, Hay S, Findlay DM (2001) Osteoprotegerin inhibits osteoclast formation and bone resorbing activity in giant cell tumors of bone. *Bone* 4: 370-377.
20. Chambers TJ (2000) Regulation of the differentiation and function of osteoclasts. *J Pathol* 1: 4-13.
21. Kini U, Nandeesh BN (2012) Physiology of Bone Formation, Remodeling, and Metabolism. In: Fogelman I, Gnanasegaran G, Wall H van der, eds. *Radionuclide and Hybrid Bone Imaging*. Springer Berlin Heidelberg; 2012:29-57.

22. Feng X, McDonald JM (2011) Disorders of bone remodeling. *Annu Rev Pathol*: 121-145.
23. Quinn JM, Sabokbar A, Athanasou NA (1996) Cells of the mononuclear phagocyte series differentiate into osteoclastic lacunar bone resorbing cells. *J Pathol* 1: 106-111.
24. Kim Y, Nizami S, Goto H, Lee FY (2012) Modern interpretation of giant cell tumor of bone: predominantly osteoclastogenic stromal tumor. *Clin Orthop Surg* 2: 107-116.
25. Athanasou NA, Bliss E, Gatter KC, Heryet A, Woods CG, McGee JO (1985) An immunohistological study of giant-cell tumour of bone: evidence for an osteoclast origin of the giant cells. *J Pathol* 3: 153-158.
26. Horowitz MC, Xi Y, Wilson K, Kacena MA (2001) Control of osteoclastogenesis and bone resorption by members of the TNF family of receptors and ligands. *Cytokine Growth Factor Rev* 1: 9-18.
27. Yagi M, Miyamoto T, Toyama Y, Suda T (2006) Role of DC-STAMP in cellular fusion of osteoclasts and macrophage giant cells. *J Bone Miner Metab* 5: 355-358.
28. Gori F, Hofbauer LC, Dunstan CR, Spelsberg TC, Khosla S, Riggs BL (2000) The expression of osteoprotegerin and RANK ligand and the support of osteoclast formation by stromal-osteoblast lineage cells is developmentally regulated. *Endocrinology* 12: 4768-4776.
29. Knowles HJ, Athanasou NA (2009) Canonical and non-canonical pathways of osteoclast formation. *Histol Histopathol* 3: 337-346.
30. Knowles HJ, Athanasou NA (2008) Hypoxia-inducible factor is expressed in giant cell tumour of bone and mediates paracrine effects of hypoxia on monocyte-osteoclast differentiation via induction of VEGF. *J Pathol* 1: 56-66.
31. Gorunova L, Vult von Steyern F, Storlazzi CT, Bjerkehagen B, Follerås G, Heim S, Mandahl N, Mertens F (2009) Cytogenetic analysis of 101 giant cell tumors of

- bone: nonrandom patterns of telomeric associations and other structural aberrations. *Genes Chromosomes Cancer* 7: 583-602.
32. Forsyth RG, De Boeck G, Bekaert S, De Meyer T, Taminiou AHM, Uyttendaele D, Roels H, Praet MM, Hogendoorn PCW (2008) Telomere biology in giant cell tumour of bone. *J Pathol* 5: 555-563.
 33. Moskovszky L, Szuhai K, Krenács T, Hogendoorn PCW, Szendroi M, Benassi MS, Kopper L, Füle T, Sági Z (2009) Genomic instability in giant cell tumor of bone. A study of 52 cases using DNA ploidy, relocalization FISH, and array-CGH analysis. *Genes Chromosomes Cancer* 6: 468-479.
 34. Moskovszky L, Dezsö K, Athanasou N, Szendrői M, Kopper L, Kliskey K, Picci P, Sági Z (2010) Centrosome abnormalities in giant cell tumour of bone: possible association with chromosomal instability. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc* 3: 359-366.
 35. Gamberi G, Benassi MS, Ragazzini P, Pazzaglia L, Ponticelli F, Ferrari C, Balladelli A, Mercuri M, Gigli M, Bertoni F, Picci P (2004) Proteases and interleukin-6 gene analysis in 92 giant cell tumors of bone. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO* 3: 498-503.
 36. Gamberi G, Benassi MS, Böhling T, Ragazzini P, Molendini L, Sollazzo MR, Merli M, Ferrari C, Magagnoli G, Bertoni F, Picci P (1998) Prognostic relevance of C-myc gene expression in giant-cell tumor of bone. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc* 1: 1-7.
 37. Wuelling M, Delling G, Kaiser E (2004) Differential gene expression in stromal cells of human giant cell tumor of bone. *Virchows Arch Int J Pathol* 6: 621-630.
 38. Okubo T, Saito T, Mitomi H, Takagi T, Torigoe T, Suehara Y, Kaneko K, Yao T (2013) p53 mutations may be involved in malignant transformation of giant cell tumor of bone through interaction with GPX1. *Virchows Arch Int J Pathol* 1: 67-77.

39. Papanastassiou I, Ioannou M, Papagelopoulos PJ, Arealis G, Mihas C, Iakovidou I, Demertzis N (2010) P53 expression as a prognostic marker in giant cell tumor of bone: a pilot study. *Orthopedics* 5.
40. Kandel R, Li S-Q, Bell R, Wunder J, Ferguson P, Kauzman A, Diehl JA, Werier J (2006) Cyclin D1 and p21 is elevated in the giant cells of giant cell tumors. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc* 3: 428-437.
41. Kumta SM, Huang L, Cheng YY, Chow LTC, Lee KM, Zheng MH (2003) Expression of VEGF and MMP-9 in giant cell tumor of bone and other osteolytic lesions. *Life Sci* 11: 1427-1436.
42. Pazzaglia L, Conti A, Chiechi A, Novello C, Magagnoli G, Astolfi A, Pession A, Krenacs T, Alberghini M, Picci P, Benassi MS (2010) Differential gene expression in classic giant cell tumours of bone: Tenascin C as biological risk factor for local relapses and metastases. *Histopathology* 1: 59-72.
43. Lieveld M, Bodson E, De Boeck G, Nouman B, Cleton-Jansen AM, Korsching E, Benassi MS, Picci P, Sys G, Poffyn B, Athanasou NA, Hogendoorn PCW, Forsyth RG (2014) Gene expression profiling of giant cell tumor of bone reveals downregulation of extracellular matrix components decorin and lumican associated with lung metastasis. *Virchows Arch Int J Pathol* 6: 703-713.
44. Behjati S et al. (2013) Distinct H3F3A and H3F3B driver mutations define chondroblastoma and giant cell tumor of bone. *Nat Genet* 12: 1479-1482.
45. Mosakhani N, Pazzaglia L, Benassi MS, Borze I, Quattrini I, Picci P, Knuutila S (2013) MicroRNA expression profiles in metastatic and non-metastatic giant cell tumor of bone. *Histol Histopathol* 5: 671-678.
46. Guo S, Bai R, Liu W, Zhao A, Zhao Z, Wang Y, Wang Y, Zhao W, Wang W (2015) MicroRNA-210 is upregulated by hypoxia-inducible factor-1 α in the stromal cells of giant cell tumors of bone. *Mol Med Rep* 4: 6185-6192.

47. Oh JH, Yoon PW, Lee SH, Cho HS, Kim WS, Kim H-S (2006) Surgical treatment of giant cell tumour of long bone with anhydrous alcohol adjuvant. *Int Orthop* 6: 490-494.
48. Nelson DA, Barker ME, Hamlin BH (1997) Thermal effects of acrylic cementation at bone tumour sites. *Int J Hyperth Off J Eur Soc Hyperthermic Oncol North Am Hyperth Group* 3: 287-306.
49. Saikia KC, Borgohain M, Bhuyan SK, Goswami S, Bora A, Ahmed F (2010) Resection-reconstruction arthroplasty for giant cell tumor of distal radius. *Indian J Orthop* 3: 327-332.
50. Kriz J, Eich HT, Mücke R, Büntzel J, Müller R-P, Bruns F, Seegenschmiedt MH, Gosheger G, Micke O, German Cooperative Group on Radiotherapy for Benign Diseases (GCG-BD) (2012) Radiotherapy for giant cell tumors of the bone: a safe and effective treatment modality. *Anticancer Res* 5: 2069-2073.
51. Balke M, Campanacci L, Gebert C, Picci P, Gibbons M, Taylor R, Hogendoorn P, Kroep J, Wass J, Athanasou N (2010) Bisphosphonate treatment of aggressive primary, recurrent and metastatic Giant Cell Tumour of Bone. *BMC Cancer*: 462.
52. Singh AS, Chawla NS, Chawla SP (2015) Giant-cell tumor of bone: treatment options and role of denosumab. *Biol Targets Ther*: 69-74.
53. Witton CJ, Reeves JR, Going JJ, Cooke TG, Bartlett JMS (2003) Expression of the HER1-4 family of receptor tyrosine kinases in breast cancer. *J Pathol* 3: 290-297.
54. Wieduwilt MJ, Moasser MM (2008) The epidermal growth factor receptor family: biology driving targeted therapeutics. *Cell Mol Life Sci CMLS* 10: 1566-1584.
55. Reiter JL, Maihle NJ (2003) Characterization and expression of novel 60-kDa and 110-kDa EGFR isoforms in human placenta. *Ann N Y Acad Sci*: 39-47.
56. Zandi R, Larsen AB, Andersen P, Stockhausen M-T, Poulsen HS (2007) Mechanisms for oncogenic activation of the epidermal growth factor receptor. *Cell Signal* 10: 2013-2023.

57. Bazley LA, Gullick WJ (2005) The epidermal growth factor receptor family. *Endocr Relat Cancer*: S17-27.
58. Iwakura Y, Nawa H (2013) ErbB1-4-dependent EGF/neuregulin signals and their cross talk in the central nervous system: pathological implications in schizophrenia and Parkinson's disease. *Front Cell Neurosci*: 4.
59. Dawson JP, Berger MB, Lin C-C, Schlessinger J, Lemmon MA, Ferguson KM (2005) Epidermal growth factor receptor dimerization and activation require ligand-induced conformational changes in the dimer interface. *Mol Cell Biol* 17: 7734-7742.
60. Gerber D, Sal-Man N, Shai Y (2004) Two motifs within a transmembrane domain, one for homodimerization and the other for heterodimerization. *J Biol Chem* 20: 21177-21182.
61. Morrow MR, Grant CW (2000) The EGF receptor transmembrane domain: peptide-peptide interactions in fluid bilayer membranes. *Biophys J* 4: 2024-2032.
62. Jorissen RN, Walker F, Pouliot N, Garrett TPJ, Ward CW, Burgess AW (2003) Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Exp Cell Res* 1: 31-53.
63. Várkonyi E, Pintér F, Peták I (2006) Epidermális növekedési faktor receptor család szerepe hámeredetű daganatok molekulárisan célzott gyógyszeres kezelésében és diagnosztikájában. *Orvosképzés* 3: 159-167.
64. Stamos J, Sliwkowski MX, Eigenbrot C (2002) Structure of the epidermal growth factor receptor kinase domain alone and in complex with a 4-anilinoquinazoline inhibitor. *J Biol Chem* 48: 46265-46272.
65. Roskoski R (2014) The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. *Pharmacol Res*: 34-74.

66. Abe M, Kuroda Y, Hirose M, Watanabe Y, Nakano M, Handa T (2006) Inhibition of autophosphorylation of epidermal growth factor receptor by small peptides in vitro. *Br J Pharmacol* 4: 402-411.
67. Moasser MM (2007) The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *Oncogene* 45: 6469-6487.
68. van der Veecken J, Oliveira S, Schiffelers RM, Storm G, van Bergen En Henegouwen PMP, Roovers RC (2009) Crosstalk between epidermal growth factor receptor- and insulin-like growth factor-1 receptor signaling: implications for cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets* 6: 748-760.
69. Berasain C, Ujue Latasa M, Urtasun R, Goñi S, Elizalde M, Garcia-Irigoyen O, Azcona M, Prieto J, Avila MA (2011) Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Crosstalks in Liver Cancer. *Cancers* 2: 2444-2461.
70. Blobel CP (2005) ADAMs: key components in EGFR signalling and development. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1: 32-43.
71. Harris RC, Chung E, Coffey RJ (2003) EGF receptor ligands. *Exp Cell Res* 1: 2-13.
72. Holbro T, Civenni G, Hynes NE (2003) The ErbB receptors and their role in cancer progression. *Exp Cell Res* 1: 99-110.
73. Wilson KJ, Gilmore JL, Foley J, Lemmon MA, Riese DJ (2009) Functional selectivity of EGF family peptide growth factors: implications for cancer. *Pharmacol Ther* 1: 1-8.
74. Schlessinger J (2002) Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor. *Cell* 6: 669-672.
75. Scaltriti M, Baselga J (2006) The epidermal growth factor receptor pathway: a model for targeted therapy. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 18: 5268-5272.

76. Corbit KC, Trakul N, Eves EM, Diaz B, Marshall M, Rosner MR (2003) Activation of Raf-1 signaling by protein kinase C through a mechanism involving Raf kinase inhibitory protein. *J Biol Chem* 15: 13061-13068.
77. Batzer AG, Rotin D, Ureña JM, Skolnik EY, Schlessinger J (1994) Hierarchy of binding sites for Grb2 and Shc on the epidermal growth factor receptor. *Mol Cell Biol* 8: 5192-5201.
78. Hallberg B, Rayter SI, Downward J (1994) Interaction of Ras and Raf in intact mammalian cells upon extracellular stimulation. *J Biol Chem* 6: 3913-3916.
79. Rojas JM, Oliva JL, Santos E (2011) Mammalian son of sevenless Guanine nucleotide exchange factors: old concepts and new perspectives. *Genes Cancer* 3: 298-305.
80. Roskoski R (2012) MEK1/2 dual-specificity protein kinases: structure and regulation. *Biochem Biophys Res Commun* 1: 5-10.
81. Sridhar SS, Hedley D, Siu LL (2005) Raf kinase as a target for anticancer therapeutics. *Mol Cancer Ther* 4: 677-685.
82. Zhang W, Liu HT (2002) MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res* 1: 9-18.
83. Liu P, Cheng H, Roberts TM, Zhao JJ (2009) Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov* 8: 627-644.
84. Hellyer NJ, Cheng K, Koland JG (1998) ErbB3 (HER3) interaction with the p85 regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase. *Biochem J*: 757-763.
85. Song X, Fan P-D, Bantikassegn A, Guha U, Threadgill DW, Varmus H, Politi K (2015) ERBB3-independent activation of the PI3K pathway in EGFR-mutant lung adenocarcinomas. *Cancer Res* 6: 1035-1045.
86. Kiyatkin A, Aksamitiene E, Markevich NI, Borisov NM, Hoek JB, Kholodenko BN (2006) Scaffolding protein Grb2-associated binder 1 sustains epidermal growth

- factor-induced mitogenic and survival signaling by multiple positive feedback loops. *J Biol Chem* 29: 19925-19938.
87. Cantley LC (2002) The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 5573: 1655-1657.
 88. Zhang S, Yu D (2010) PI(3)king apart PTEN's role in cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 17: 4325-4330.
 89. Hyun SW, Anglin IE, Liu A, Yang S, Sorkin JD, Lillehoj E, Tonks NK, Passaniti A, Goldblum SE (2011) Diverse injurious stimuli reduce protein tyrosine phosphatase- μ expression and enhance epidermal growth factor receptor signaling in human airway epithelia. *Exp Lung Res* 6: 327-343.
 90. Wells A, Grandis JR (2003) Phospholipase C-gamma1 in tumor progression. *Clin Exp Metastasis* 4: 285-290.
 91. Dickson EJ, Falkenburger BH, Hille B (2013) Quantitative properties and receptor reserve of the IP(3) and calcium branch of G(q)-coupled receptor signaling. *J Gen Physiol* 5: 521-535.
 92. Catlett-Falcone R, Dalton WS, Jove R (1999) STAT proteins as novel targets for cancer therapy. Signal transducer an activator of transcription. *Curr Opin Oncol* 6: 490-496.
 93. Quesnelle KM, Boehm AL, Grandis JR (2007) STAT-mediated EGFR signaling in cancer. *J Cell Biochem* 2: 311-319.
 94. Yang J, Stark GR (2008) Roles of unphosphorylated STATs in signaling. *Cell Res* 4: 443-451.
 95. Zhang T, Ma J, Cao X (2003) Grb2 regulates Stat3 activation negatively in epidermal growth factor signalling. *Biochem J Pt 2*: 457-464.
 96. Zhang X, Tamasi J, Lu X, Zhu J, Chen H, Tian X, Lee T-C, Threadgill DW, Kream BE, Kang Y, Partridge NC, Qin L (2011) Epidermal growth factor receptor plays

- an anabolic role in bone metabolism in vivo. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res* 5: 1022-1034.
97. Zhu J, Shimizu E, Zhang X, Partridge NC, Qin L (2011) EGFR signaling suppresses osteoblast differentiation and inhibits expression of master osteoblastic transcription factors Runx2 and Osterix. *J Cell Biochem* 7: 1749-1760.
 98. Sibia M, Wagner B, Hoebertz A, Elliott C, Marino S, Jochum W, Wagner EF (2003) Mice humanised for the EGF receptor display hypomorphic phenotypes in skin, bone and heart. *Dev Camb Engl* 19: 4515-4525.
 99. Tamama K, Fan VH, Griffith LG, Blair HC, Wells A (2006) Epidermal growth factor as a candidate for ex vivo expansion of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dayt Ohio* 3: 686-695.
 100. Lu X, Kang Y (2010) Epidermal growth factor signalling and bone metastasis. *Br J Cancer* 3: 457-461.
 101. Qin L, Tamasi J, Raggatt L, Li X, Feyen JHM, Lee DC, Diccico-Bloom E, Partridge NC (2005) Amphiregulin is a novel growth factor involved in normal bone development and in the cellular response to parathyroid hormone stimulation. *J Biol Chem* 5: 3974-3981.
 102. Angelucci A, Gravina GL, Rucci N, Millimaggi D, Festuccia C, Muzi P, Teti A, Vicentini C, Bologna M (2006) Suppression of EGF-R signaling reduces the incidence of prostate cancer metastasis in nude mice. *Endocr Relat Cancer* 1: 197-210.
 103. Lu X, Wang Q, Hu G, Van Poznak C, Fleisher M, Reiss M, Massagué J, Kang Y (2009) ADAMTS1 and MMP1 proteolytically engage EGF-like ligands in an osteolytic signaling cascade for bone metastasis. *Genes Dev* 16: 1882-1894.
 104. Meşe G, Richard G, White TW (2007) Gap junctions: basic structure and function. *J Invest Dermatol* 11: 2516-2524.

105. Chipman JK, Mally A, Edwards GO (2003) Disruption of gap junctions in toxicity and carcinogenicity. *Toxicol Sci Off J Soc Toxicol* 2: 146-153.
106. Schalper KA, Carvajal-Hausdorf D, Oyarzo MP (2014) Possible role of hemichannels in cancer. *Front Physiol*.
107. Oyamada M, Takebe K, Oyamada Y (2013) Regulation of connexin expression by transcription factors and epigenetic mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 1: 118-133.
108. Saez JC, Berthoud VM, Branes MC, Martinez AD, Beyer EC (2003) Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. *Physiol Rev* 4: 1359-1400.
109. Molica F, Meens MJP, Morel S, Kwak BR (2014) Mutations in cardiovascular connexin genes. *Biol Cell Auspices Eur Cell Biol Organ* 9: 269-293.
110. Harris AL (2001) Emerging issues of connexin channels: biophysics fills the gap. *Q Rev Biophys* 3: 325-472.
111. Dbouk HA, Mroue RM, El-Sabban ME, Talhouk RS (2009) Connexins: a myriad of functions extending beyond assembly of gap junction channels. *Cell Commun Signal CCS*: 4.
112. Kumar NM, Gilula NB (1996) The gap junction communication channel. *Cell* 3: 381-388.
113. Solan JL, Lampe PD (2014) Specific Cx43 phosphorylation events regulate gap junction turnover in vivo. *FEBS Lett* 8: 1423-1429.
114. Laird DW (2006) Life cycle of connexins in health and disease. *Biochem J Pt 3*: 527-543.
115. Eiberger J, Degen J, Romualdi A, Deutsch U, Willecke K, Söhl G (2001) Connexin genes in the mouse and human genome. *Cell Commun Adhes* 4-6: 163-165.

116. Musil LS, Le AC, VanSlyke JK, Roberts LM (2000) Regulation of connexin degradation as a mechanism to increase gap junction assembly and function. *J Biol Chem* 33: 25207-25215.
117. White TW, Bruzzone R, Wolfram S, Paul DL, Goodenough DA (1994) Selective interactions among the multiple connexin proteins expressed in the vertebrate lens: the second extracellular domain is a determinant of compatibility between connexins. *J Cell Biol* 4: 879-892.
118. Gemel J, Valiunas V, Brink PR, Beyer EC (2004) Connexin43 and connexin26 form gap junctions, but not heteromeric channels in co-expressing cells. *J Cell Sci Pt 12*: 2469-2480.
119. Martinez AD, Hayrapetyan V, Moreno AP, Beyer EC (2002) Connexin43 and connexin45 form heteromeric gap junction channels in which individual components determine permeability and regulation. *Circ Res* 10: 1100-1107.
120. Phelan P, Starich TA (2001) Innexins get into the gap. *BioEssays News Rev Mol Cell Dev Biol* 5: 388-396.
121. Penuela S, Gehi R, Laird DW (2013) The biochemistry and function of pannexin channels. *Biochim Biophys Acta* 1: 15-22.
122. Musil LS, Cunningham BA, Edelman GM, Goodenough DA (1990) Differential phosphorylation of the gap junction protein connexin43 in junctional communication-competent and -deficient cell lines. *J Cell Biol* 5 Pt 1: 2077-2088.
123. Solan JL, Marquez-Rosado L, Sorgen PL, Thornton PJ, Gafken PR, Lampe PD (2007) Phosphorylation at S365 is a gatekeeper event that changes the structure of Cx43 and prevents down-regulation by PKC. *J Cell Biol* 6: 1301-1309.
124. Lampe PD, Cooper CD, King TJ, Burt JM (2006) Analysis of Connexin43 phosphorylated at S325, S328 and S330 in normoxic and ischemic heart. *J Cell Sci Pt 16*: 3435-3442.

125. Axelsen LN, Calloe K, Holstein-Rathlou N-H, Nielsen MS (2013) Managing the complexity of communication: regulation of gap junctions by post-translational modification. *Front Pharmacol*: 130.
126. Johnstone SR, Billaud M, Lohman AW, Taddeo EP, Isakson BE (2012) Posttranslational modifications in connexins and pannexins. *J Membr Biol* 5-6: 319-332.
127. Park DJ, Freitas TA, Wallick CJ, Guyette CV, Warn-Cramer BJ (2006) Molecular dynamics and in vitro analysis of Connexin43: A new 14-3-3 mode-1 interacting protein. *Protein Sci Publ Protein Soc* 10: 2344-2355.
128. Dunn CA, Su V, Lau AF, Lampe PD (2012) Activation of Akt, not connexin 43 protein ubiquitination, regulates gap junction stability. *J Biol Chem* 4: 2600-2607.
129. Dunn CA, Lampe PD (2014) Injury-triggered Akt phosphorylation of Cx43: a ZO-1-driven molecular switch that regulates gap junction size. *J Cell Sci Pt 2*: 455-464.
130. TenBroek EM, Lampe PD, Solan JL, Reynhout JK, Johnson RG (2001) Ser364 of connexin43 and the upregulation of gap junction assembly by cAMP. *J Cell Biol* 7: 1307-1318.
131. Cooper CD, Lampe PD (2002) Casein kinase 1 regulates connexin-43 gap junction assembly. *J Biol Chem* 47: 44962-44968.
132. Kanemitsu MY, Jiang W, Eckhart W (1998) Cdc2-mediated phosphorylation of the gap junction protein, connexin43, during mitosis. *Cell Growth Differ Mol Biol J Am Assoc Cancer Res* 1: 13-21.
133. Ek-Vitorin JF, King TJ, Heyman NS, Lampe PD, Burt JM (2006) Selectivity of connexin 43 channels is regulated through protein kinase C-dependent phosphorylation. *Circ Res* 12: 1498-1505.
134. Warn-Cramer BJ, Cottrell GT, Burt JM, Lau AF (1998) Regulation of connexin-43 gap junctional intercellular communication by mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 15: 9188-9196.

135. Leithe E, Rivedal E (2004) Epidermal growth factor regulates ubiquitination, internalization and proteasome-dependent degradation of connexin43. *J Cell Sci Pt 7*: 1211-1220.
136. Lin R, Warn-Cramer BJ, Kurata WE, Lau AF (2001) v-Src phosphorylation of connexin 43 on Tyr247 and Tyr265 disrupts gap junctional communication. *J Cell Biol 4*: 815-827.
137. Watkins M, Grimston SK, Norris JY, Guillotin B, Shaw A, Beniash E, Civitelli R (2011) Osteoblast connexin43 modulates skeletal architecture by regulating both arms of bone remodeling. *Mol Biol Cell 8*: 1240-1251.
138. Loisel AE, Jiang JX, Donahue HJ (2013) Gap junction and hemichannel functions in osteocytes. *Bone 2*: 205-212.
139. Koval M, Harley JE, Hick E, Steinberg TH (1997) Connexin46 is retained as monomers in a trans-Golgi compartment of osteoblastic cells. *J Cell Biol 4*: 847-857.
140. Huang T, Shao Q, MacDonald A, Xin L, Lorentz R, Bai D, Laird DW (2013) Autosomal recessive GJA1 (Cx43) gene mutations cause oculodentodigital dysplasia by distinct mechanisms. *J Cell Sci Pt 13*: 2857-2866.
141. Paznekas WA, Karczeski B, Vermeer S, Lowry RB, Delatycki M, Laurence F, Koivisto PA, Van Maldergem L, Boyadjiev SA, Bodurtha JN, Jabs EW (2009) GJA1 mutations, variants, and connexin 43 dysfunction as it relates to the oculodentodigital dysplasia phenotype. *Hum Mutat 5*: 724-733.
142. Zhang Y, Paul EM, Sathyendra V, Davison A, Sharkey N, Bronson S, Srinivasan S, Gross TS, Donahue HJ (2011) Enhanced osteoclastic resorption and responsiveness to mechanical load in gap junction deficient bone. *PloS One 8*: e23516.
143. Schiller PC, D'Ippolito G, Balkan W, Roos BA, Howard GA (2001) Gap-junctional communication is required for the maturation process of osteoblastic cells in culture. *Bone 4*: 362-369.

144. Lecanda F, Warlow PM, Sheikh S, Furlan F, Steinberg TH, Civitelli R (2000) Connexin43 deficiency causes delayed ossification, craniofacial abnormalities, and osteoblast dysfunction. *J Cell Biol* 4: 931-944.
145. Lima F, Niger C, Hebert C, Stains JP (2009) Connexin43 potentiates osteoblast responsiveness to fibroblast growth factor 2 via a protein kinase C-delta/Runx2-dependent mechanism. *Mol Biol Cell* 11: 2697-2708.
146. Stains JP, Civitelli R (2005) Gap junctions regulate extracellular signal-regulated kinase signaling to affect gene transcription. *Mol Biol Cell* 1: 64-72.
147. Bellido T, Ali AA, Plotkin LI, Fu Q, Gubrij I, Roberson PK, Weinstein RS, O'Brien CA, Manolagas SC, Jilka RL (2003) Proteasomal degradation of Runx2 shortens parathyroid hormone-induced anti-apoptotic signaling in osteoblasts. A putative explanation for why intermittent administration is needed for bone anabolism. *J Biol Chem* 50: 50259-50272.
148. Chung DJ, Castro CHM, Watkins M, Stains JP, Chung MY, Szejnfeld VL, Willecke K, Theis M, Civitelli R (2006) Low peak bone mass and attenuated anabolic response to parathyroid hormone in mice with an osteoblast-specific deletion of connexin43. *J Cell Sci Pt* 20: 4187-4198.
149. Huo B, Lu XL, Guo XE (2010) Intercellular calcium wave propagation in linear and circuit-like bone cell networks. *Philos Transact A Math Phys Eng Sci* 1912: 617-633.
150. Cherian PP, Siller-Jackson AJ, Gu S, Wang X, Bonewald LF, Sprague E, Jiang JX (2005) Mechanical strain opens connexin 43 hemichannels in osteocytes: a novel mechanism for the release of prostaglandin. *Mol Biol Cell* 7: 3100-3106.
151. Cherian PP, Cheng B, Gu S, Sprague E, Bonewald LF, Jiang JX (2003) Effects of mechanical strain on the function of Gap junctions in osteocytes are mediated through the prostaglandin EP2 receptor. *J Biol Chem* 44: 43146-43156.
152. Xia X, Batra N, Shi Q, Bonewald LF, Sprague E, Jiang JX (2010) Prostaglandin promotion of osteocyte gap junction function through transcriptional regulation of

- connexin 43 by glycogen synthase kinase 3/beta-catenin signaling. *Mol Cell Biol* 1: 206-219.
153. Plotkin LI, Manolagas SC, Bellido T (2002) Transduction of cell survival signals by connexin-43 hemichannels. *J Biol Chem* 10: 8648-8657.
154. Plotkin LI, Aguirre JI, Kousteni S, Manolagas SC, Bellido T (2005) Bisphosphonates and estrogens inhibit osteocyte apoptosis via distinct molecular mechanisms downstream of extracellular signal-regulated kinase activation. *J Biol Chem* 8: 7317-7325.
155. Rochefort GY, Pallu S, Benhamou CL (2010) Osteocyte: the unrecognized side of bone tissue. *Osteoporos Int J Establ Result Coop Eur Found Osteoporos Natl Osteoporos Found USA* 9: 1457-1469.
156. Chen D, Ji X, Harris MA, Feng JQ, Karsenty G, Celeste AJ, Rosen V, Mundy GR, Harris SE (1998) Differential roles for bone morphogenetic protein (BMP) receptor type IB and IA in differentiation and specification of mesenchymal precursor cells to osteoblast and adipocyte lineages. *J Cell Biol* 1: 295-305.
157. Asano H, Toyooka S, Tokumo M, Ichimura K, Aoe K, Ito S, Tsukuda K, Ouchida M, Aoe M, Katayama H, Hiraki A, Sugi K, Kiura K, Date H, Shimizu N (2006) Detection of EGFR gene mutation in lung cancer by mutant-enriched polymerase chain reaction assay. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 1: 43-48.
158. Teitelbaum SL, Ross FP (2003) Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat Rev Genet* 8: 638-649.
159. Zhu J, Jia X, Xiao G, Kang Y, Partridge NC, Qin L (2007) EGF-like ligands stimulate osteoclastogenesis by regulating expression of osteoclast regulatory factors by osteoblasts: implications for osteolytic bone metastases. *J Biol Chem* 37: 26656-26664.
160. Lau YS, Sabokbar A, Gibbons CLMH, Giele H, Athanasou N (2005) Phenotypic and molecular studies of giant-cell tumors of bone and soft tissue. *Hum Pathol* 9: 945-954.

161. Wang K, Yamamoto H, Chin JR, Werb Z, Vu TH (2004) Epidermal growth factor receptor-deficient mice have delayed primary endochondral ossification because of defective osteoclast recruitment. *J Biol Chem* 51: 53848-53856.
162. Fan VH, Tamama K, Au A, Littrell R, Richardson LB, Wright JW, Wells A, Griffith LG (2007) Tethered epidermal growth factor provides a survival advantage to mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dayt Ohio* 5: 1241-1251.
163. Normanno N, De Luca A, Aldinucci D, Maiello MR, Mancino M, D'Antonio A, De Filippi R, Pinto A (2005) Gefitinib inhibits the ability of human bone marrow stromal cells to induce osteoclast differentiation: implications for the pathogenesis and treatment of bone metastasis. *Endocr Relat Cancer* 2: 471-482.
164. Valente RC, Nascimento CR, Araujo EG, Rumjanek VM (2009) mCD14 expression in human monocytes is downregulated by ouabain via transactivation of epithelial growth factor receptor and activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Neuroimmunomodulation* 4: 228-236.
165. Blume-Jensen P, Hunter T (2001) Oncogenic kinase signalling. *Nature* 6835: 355-365.
166. Kersting C, Gebert C, Agelopoulos K, Schmidt H, van Diest PJ, Juergens H, Winkelmann W, Kevric M, Gosheger G, Brandt B, Bielack S, Buerger H (2007) Epidermal growth factor receptor expression in high-grade osteosarcomas is associated with a good clinical outcome. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 10: 2998-3005.
167. Balke M, Schremper L, Gebert C, Ahrens H, Streitbuerger A, Koehler G, Harges J, Gosheger G (2008) Giant cell tumor of bone: treatment and outcome of 214 cases. *J Cancer Res Clin Oncol* 9: 969-978.
168. Franovic A, Gunaratnam L, Smith K, Robert I, Patten D, Lee S (2007) Translational up-regulation of the EGFR by tumor hypoxia provides a nonmutational explanation for its overexpression in human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 32: 13092-13097.

169. Laderoute KR, Grant TD, Murphy BJ, Sutherland RM (1992) Enhanced epidermal growth factor receptor synthesis in human squamous carcinoma cells exposed to low levels of oxygen. *Int J Cancer J Int Cancer* 3: 428-432.
170. Nishi H, Nishi KH, Johnson AC (2002) Early Growth Response-1 gene mediates up-regulation of epidermal growth factor receptor expression during hypoxia. *Cancer Res* 3: 827-834.
171. Peng X-H, Karna P, Cao Z, Jiang B-H, Zhou M, Yang L (2006) Cross-talk between epidermal growth factor receptor and hypoxia-inducible factor-1alpha signal pathways increases resistance to apoptosis by up-regulating survivin gene expression. *J Biol Chem* 36: 25903-25914.
172. Civitelli R (2008) Cell-cell communication in the osteoblast/osteocyte lineage. *Arch Biochem Biophys* 2: 188-192.
173. Lloyd SAJ, Donahue HJ (2010) Gap Junctions and Biophysical Regulation of Bone Cells. *Clin Rev Bone Miner Metab* 4: 189-200.
174. Buo AM, Stains JP (2014) Gap junctional regulation of signal transduction in bone cells. *FEBS Lett* 8: 1315-1321.
175. Krenacs T, Rosendaal M (1998) Connexin43 gap junctions in normal, regenerating, and cultured mouse bone marrow and in human leukemias: their possible involvement in blood formation. *Am J Pathol* 4: 993-1004.
176. Schajnovitz A, Itkin T, D'Uva G, Kalinkovich A, Golan K, Ludin A, Cohen D, Shulman Z, Avigdor A, Nagler A, Kollet O, Seger R, Lapidot T (2011) CXCL12 secretion by bone marrow stromal cells is dependent on cell contact and mediated by connexin-43 and connexin-45 gap junctions. *Nat Immunol* 5: 391-398.
177. Gonzalez-Nieto D, Li L, Kohler A, Ghiaur G, Ishikawa E, Sengupta A, Madhu M, Arnett JL, Santho RA, Dunn SK, Fishman GI, Gutstein DE, Civitelli R, Barrio LC, Gunzer M, Cancelas JA (2012) Connexin-43 in the osteogenic BM niche regulates its cellular composition and the bidirectional traffic of hematopoietic stem cells and progenitors. *Blood* 22: 5144-5154.

178. Li Z, Zhou Z, Saunders MM, Donahue HJ (2006) Modulation of connexin43 alters expression of osteoblastic differentiation markers. *Am J Physiol Cell Physiol* 4: C1248-1255.
179. Bellido T, Plotkin LI (2011) Novel actions of bisphosphonates in bone: preservation of osteoblast and osteocyte viability. *Bone* 1: 50-55.
180. Park DJ, Wallick CJ, Martyn KD, Lau AF, Jin C, Warn-Cramer BJ (2007) Akt phosphorylates Connexin43 on Ser373, a “mode-1” binding site for 14-3-3. *Cell Commun Adhes* 5: 211-226.
181. Burghardt RC, Barhoumi R, Sewall TC, Bowen JA (1995) Cyclic AMP induces rapid increases in gap junction permeability and changes in the cellular distribution of connexin43. *J Membr Biol* 3: 243-253.
182. Yogo K, Ogawa T, Akiyama M, Ishida N, Takeya T (2002) Identification and functional analysis of novel phosphorylation sites in Cx43 in rat primary granulosa cells. *FEBS Lett* 2: 132-136.
183. Etzerodt A, Moestrup SK (2013) CD163 and inflammation: biological, diagnostic, and therapeutic aspects. *Antioxid Redox Signal* 17: 2352-2363.
184. Asumda FZ, Chase PB (2011) Age-related changes in rat bone-marrow mesenchymal stem cell plasticity. *BMC Cell Biol*: 44.
185. Chanson M, Derouette J-P, Roth I, Foglia B, Scerri I, Dudez T, Kwak BR (2005) Gap junctional communication in tissue inflammation and repair. *Biochim Biophys Acta* 2: 197-207.
186. Schilling AF, Filke S, Lange T, Gebauer M, Brink S, Baranowsky A, Zustin J, Amling M (2008) Gap junctional communication in human osteoclasts in vitro and in vivo. *J Cell Mol Med* 6A: 2497-2504.
187. Petridou S, Masur SK (1996) Immunodetection of connexins and cadherins in corneal fibroblasts and myofibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 9: 1740-1748.

188. Spanakis SG, Petridou S, Masur SK (1998) Functional gap junctions in corneal fibroblasts and myofibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 8: 1320-1328.
189. Baum JR, Long B, Cabo C, Duffy HS (2012) Myofibroblasts cause heterogeneous Cx43 reduction and are unlikely to be coupled to myocytes in the healing canine infarct. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 3: H790-800.
190. Churko JM, Shao Q, Gong X, Swoboda KJ, Bai D, Sampson J, Laird DW (2011) Human dermal fibroblasts derived from oculodentodigital dysplasia patients suggest that patients may have wound-healing defects. *Hum Mutat* 4: 456-466.
191. Asazuma-Nakamura Y, Dai P, Harada Y, Jiang Y, Hamaoka K, Takamatsu T (2009) Cx43 contributes to TGF-beta signaling to regulate differentiation of cardiac fibroblasts into myofibroblasts. *Exp Cell Res* 7: 1190-1199.

10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

10.1. Az értekezés témájában megjelent közlemények

1. **Balla P**, Maros ME, Barna G, Antal I, Papp G, Sapi Z, Athanasou NA, Benassi MS, Picci P, Krenacs T (2015) Prognostic impact of reduced connexin43 expression and gap junction coupling of neoplastic stromal cells in giant cell tumor of bone. *PLoS One* 5: e0125316.
2. **Balla P**, Moskovszky L, Sapi Z, Forsyth R, Knowles H, Athanasou NA, Szendroi M, Kopper L, Rajnai H, Pinter F, Petak I, Benassi MS, Picci P, Conti A, Krenacs T (2011) Epidermal growth factor receptor signalling contributes to osteoblastic stromal cell proliferation, osteoclastogenesis and disease progression in giant cell tumour of bone. *Histopathology* 3: 376-389.

10.2. Az értekezés témájától eltérő témában megjelent közlemények

1. Pásztai-Gere E, Jerzsele Á, **Balla P**, Ujhelyi G, Székács A (2016) Reinforced Epithelial Barrier Integrity via Matriptase Induction with Sphingosine-1-Phosphate Did Not Result in Disturbances in Physiological Redox Status. *Oxid Med Cell Longev*: 9674272.
2. Pásztai-Gere E, McManus S, Meggyesházi N, **Balla P**, Gálfi P, Steinmetzer T (2015) Inhibition of Matriptase Activity Results in Decreased Intestinal Epithelial Monolayer Integrity In Vitro. *PLoS One* 10: e0141077.
3. Rajnai H, Teleki I, Kiszner G, Meggyesházi N, **Balla P**, Vancsik T, Muzes G, Csomor J, Matolcsy A, Krenacs T (2015) Connexin 43 communication channels in follicular dendritic cell development and in follicular lymphomas. *J Immunol Res*: 528098.

4. Teleki I, Szasz AM, Maros ME, Gyorffy B, Kulka J, Meggyeshazi N, Kiszner G, **Balla P**, Samu A, Krenacs T (2014) Correlations of differentially expressed gap junction connexins Cx26, Cx30, Cx32, Cx43 and Cx46 with breast cancer progression and prognosis. *PloS One* 11: e112541.
5. Andocs G, Meggyeshazi N, Balogh L, Spisak S, Maros ME, **Balla P**, Kiszner G, Teleki I, Kovago C, Krenacs T (2015) Upregulation of heat shock proteins and the promotion of damage-associated molecular pattern signals in a colorectal cancer model by modulated electrohyperthermia. *Cell Stress Chaperones* 1: 37-46.
6. Kiszner G, Wichmann B, Nemeth IB, Varga E, Meggyeshazi N, Teleki I, **Balla P**, Maros ME, Penksza K, Krenacs T (2014) Cell cycle analysis can differentiate thin melanomas from dysplastic nevi and reveals accelerated replication in thick melanomas. *Virchows Arch Int J Pathol* 5: 603-612.
7. Meggyeshazi N, Andocs G, Balogh L, **Balla P**, Kiszner G, Teleki I, Jeney A, Krenacs T (2014) DNA fragmentation and caspase-independent programmed cell death by modulated electrohyperthermia. *Strahlenther Onkol Organ Dtsch Rontgengesellschaft A1* 9: 815-822.
8. Krenacs T, Kiszner G, Stelkovics E, **Balla P**, Teleki I, Nemeth I, Varga E, Korom I, Barbai T, Plotar V, Timar J, Raso E (2012) Collagen XVII is expressed in malignant but not in benign melanocytic tumors and it can mediate antibody induced melanoma apoptosis. *Histochem Cell Biol* 4: 653-667.

11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt hálával tartozom témavezetőmnek, Dr. Krenács Tibornak, aki lehetőséget adott, hogy a munkacsoportjában dolgozzak és tudományos tevékenységemet messzemenően támogatta.

Köszönöm Matolcsy András professzor úrnak, hogy lehetővé tette számomra, hogy az általa vezetett intézetben végezhessem kutatómunkámat. Hálás vagyok Kopper László professzor úrnak és Kovalszky Ilona professzor asszonynak, hogy a doktori iskolában tanulhattam és Sági Zoltán professzor úrnak az együttműködő támogatásért.

Köszönettel tartozom a Molekuláris és Digitális Patomorfológiai Laboratórium volt és jelenlegi munkatársainak, Dr. Teleki Ivettnek, Dr. Meggyesházi Nórának, Kiss Évának, Dr. Kiszner Gergőnek, Dr. Maros Máténak és Vancsik Tamásnak az önzetlen szakmai segítségért és azért, hogy munkánk mindig kellemes, baráti légkörben zajlott. Parsch Editnek † nagyon köszönöm a laboratóriumi szakasszisztensi és emberi segítséget.

Köszönöm Szendrői Miklós professzor úrnak, a Semmelweis Egyetem Ortopédiai Klinika igazgatójának és Dr. Perlaki Tamásnak, hogy biztosították a kísérleteim elvégzéséhez szükséges műtéti anyagokat.

Köszönöm Dr. Dezső Katalinnak a dolgozatom házi bírálatát és javaslatait. Köszönöm Csorba Gézáné Maricának † a sejttenyésztésben és a kísérletek kivitelezésében nyújtott pótolhatatlan segítségét. Köszönöm Dr. Barna Gábornak az áramlási citometriás mérésekben, és Dr. Moskovsky Lindának az *in vitro* kísérletek elvégzése során nyújtott segítségét. Köszönettel tartozom Dr. Peták Istvánnak és Dr. Pintér Ferencnek a szekvenálás során nyújtott segítségükért. Köszönöm az I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet minden tagjának, hogy munkámat derűs légkörben, segítségüket élvezve végezhettem.

Végül, de nem utolsó sorban külön köszönettel és hálával tartozom szüleimnek és testvéremnek, hogy mindvégig kitartó türelemmel, szeretettel támogattak és mellettem álltak, ami nélkülözhetetlen volt tanulmányaimhoz és ehhez a munkához is.