

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

Doktori tézisek

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

1. BEVEZETÉS

1. 1. Óriássejtes csonttumor

Az óriássejtes csonttumor (GCTB) az Egészségügyi Világszervezet (WHO) osztályozása szerint, intermedier malignitású, helyileg agresszív növekedésű oszteolitikus daganat, amely a primer csonttumorkok 5%-át teszi ki. A GCTB leggyakrabban a hosszú csöves csontok epifizeális régiójában alakul ki, de éretlen csontozatú fiatal betegekben a metafízis régióban is kialakulhat. 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.

A GCTB-t három fő sejtípus alkotja. 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. A GCTB stromasejtek oszteoblaszt fenotípust mutatnak és az általa termelt nukleáris faktor kappa-B-receptor-aktivátor ligand (RANKL) és makrofág kolónia-stimuláló faktor (M-CSF) felelősek az oszteoklasztogenezis folyamatért. Az oszteolízisért a harmadik sejtípus a monocita/makrofág eredetű ugyancsak CD68-pozitív multinukleáris oszteoklaszt típusú óriássejtek felelősek.

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 citogenetikai eltérések közül a telomer asszociációk (TAS) vagy telomerikus fúziók előfordulása gyakori a mononukleáris stromasejtek 85%-ában. A TAS, mint klonális jelenség köztes lépés lehet a további genetikai instabilitás kialakulásában. A GCTB neoplasztikus stromasejtek kromoszómáinak strukturális eltérései mellett azok számbeli klonális eléréseit is leírták, leginkább poliszómia vagy egyedi sejtszintű kiegyensúlyozott aneuszómia formájában.

A GCTB kezelése elsősorban sebészi beavatkozással, a tumor kikaparásával (küret) történik, amely lokális fenol adjuváns kezeléssel társul. A kezelést követően kialakult üreget polimetil-metakrilát (PMMA) alapú csontcementtel töltik ki. A sebészeti kezelés és az adjuváns terápia együttes alkalmazása csökkenti a recidíva kialakulását. Sebészeti beavatkozással nehezen elérhető vagy el nem távolítható daganat esetekben sugárterápiát is

alkalmaznak. A biszfoszfonátokat malignus és benignus folyamatok által okozott csontlebontás gátlására alkalmazzák. A denosumab egy humanizált monoklonális antitest (IgG₂), amely az oszteoblasztok és a csontvelői stroma által termelt szolúbilis vagy membrán kötött RANKL-hoz kötődve gátolja az oszteoklasztogenezist,

1. 2. Epidermális növekedési faktor receptor (EGFR)

Az I-es típusú transzmembrán receptor tirozin-kinázok (RTK) közé sorolható ErbB receptorcsalád fontos szerepet játszik a többsejtű szervezetek fejlődésében, mert a receptor által közvetített jelútvonalak szabályozzák a sejtek proliferációját, túlélését, differenciációját és migrációját. Az EGFR fehérje egy 170 kDa molekulasúlyú transzmembrán glikoprotein, amely három fő doménből épül fel: egy extracelluláris ligand-kötő, egy transzmembrán és egy intracelluláris doménből, amelyek közül az utóbbit egy konzervált katalitikus aktivitással rendelkező protein tirozin kináz aldomén és egy C-terminális szabályozó régió alkot. A ligand receptorhoz való kötődését követő konformációváltozás a receptor dimerizációját, majd az egymás közelébe kerülő tirozin kináz aldomének tirozin oldalláncainak auto- és transzfoszforilációját eredményezi a C-terminális szabályozórészen. 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.

A csontok lebontása, felépítése és megújulása számos hormon, növekedési és transzkripció faktor által szabályozott folyamat. Az EGFR közvetített jelútpályák elsősorban az anabolikus csont anyagcserében vesznek részt.

1. 3. Connexinek

A direkt sejt-sejt kommunikáció 6 connexin (Cx) fehérjéből felépülő sejtmembrán félcsatornák kapcsolódása révén (gap junction-GJ, vagy réskapcsolat) az extracelluláris tér kizárásával valósul meg szomszédos sejtek között. A connexin csatornákon ionok (K⁺, Ca²⁺) és 1,8 kDa-nál kisebb méretű molekulák, így metabolitok (glükóz) és másodlagos hírvivők (IP₃, cAMP, cGMP) közlekednek a sejtek között. A GJ csatornák fontos szerepet játszanak a szöveti homeosztázis fenntartásában és alapvető élettani funkciókat látnak el. Részt vesznek a

sejtnövekedés folyamatában, a differenciálódásban, az akciós potenciálok sejtek közötti közvetlen terjedésének közvetítésében és az embriógenézis szabályozásában. Emellett az avaszkuláris szövetekben a tápanyagok közvetítésében is részt vesznek.

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. 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. A csatornák a sejtmembránban több száz vagy ezer csatornából álló, geometriailag rendezett aggregátumokba (plakkok) csoportosulnak, és vagy GJ csatornaként vagy félcsatornaként („hemichannel”) működnek.

A Cx43 fehérje és az általa kialakított GJ csatornák fontos szerepe bizonyított a csontfejlődés során, az oszteoblaszt proliferáció és differenciáció szabályozásában. Ugyancsak támogatják az oszteociták adaptációját a mechanikai terhelés és szolúbilis növekedés faktorok által kiváltott ingerek közvetítésével, illetve elősegítik az oszteociták túlélését az apoptózis gátlásán keresztül. A Cx43 fehérjét kódoló GJA1 gén missense mutációja súlyos szisztémás csontfejlődési rendelleniséget az ún. okulodontodigitális diszpláziát (ODDD) okozza. Egérben az indukált ODDD-szerű mutációk osteolízist eredményeznek.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Vizsgáltuk:

1. Az EGFR fehérje expresszió és a tumor recidívakészség, valamint az agresszivitás viszonyát.
2. Az EGFR fehérje megnövekedett termelődése hátterében 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 oszteoklasztok 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 1977-2005 között a Semmelweis Egyetem Ortopédiai Klinikán (SE), illetve 1994-2005 között a Rizzoli Ortopédiai Intézetben (IOR, Bologna, Olaszország) diagnosztizáltak és gyűjtöttek.

3. 2. Szöveti multiblokkok (TMA) készítése

Az archivált szövetmintákból repetitív mintákkal szöveti multiblokkokat (TMA) készítettünk. Az így kapott 4 darab 70 mintát (IOR), illetve 3 darab 80 mintát (SE) tartalmazó TMA blokkból 3-4 μm vastag metszeteket készítettünk.

3. 3. Immunhiszto- és immuncitokémia

A TMA blokkokból készült metszeten EGFR, pEGFR (pY1173 és pY1068), EGF, transzformáló növekedési faktor alfa ($\text{TGF}\alpha$), alfa-simaizom aktin ($\alpha\text{-SMA}$), CD11c, CD163 és tartarát-rezisztens savanyú foszfatáz (TRAP) antigéneket, míg a sejttenyészetekben TRAP, vitronektin receptor (VNR), vimentin és Cx43 fehérjét mutattunk ki immunhiszto- és immuncitokémiai módszerrel. Az előhíváshoz torna-peroxidáz (HRP) enzimmel konjugált anti-nyúl/egér IgG polimert (Novolink polimer) és alkalikus foszfatáz (ALP) enzimmel konjugált anti-egér IgG-t 3,3'-diaminobenzidin (DAB) vagy Permanent Red kromogén-szubsztrát detektáló kit mellett használtunk. Immunfluoreszcens kimutatáshoz Alexa546 (piros), illetve Alexa488 (zöld) fluorokrómmal konjugált anti-egér, illetve anti-nyúl IgG-t használtunk. A sejtmagokat hematoxilinnel, illetve 4',6-diamidino-fenilindollal (DAPI) (kék) festettük meg.

3. 4. Sejttenyésztés, *in vitro* kezelések

A műtéti GCTB és normál csontvelő mintákból stromasejteket izoláltunk majd tenyésztettünk. A humán perifériás vér mononukleáris sejteket (PBMC) heparinizált vénás vérből Ficoll gradiens centrifugálással nyertük. Kontrollként felnőtt humán dermális

fibroblaszt (HDFa), egér koponya eredetű oszteoblaszt (2T3) és humán nem-kissejtes tüdőrák (NSCLC) (H1650, H1975 és H358) sejtvonalakat használtunk.

Az oszteoklaszt differenciációs képesség vizsgálat során, a dentin lemezeken és üveg fedőlemezeken tenyésztett PBMC-et M-CSF, RANKL, M-CSF + RANKL, EGF + M-CSF, EGF + RANKL és EGF + M-CSF + RANKL hozzáadásával kezeltük. A dentin lemezeket toluidin kék oldat festés után a reszorpciós területeket határoztuk meg.

A GCTB stromasejt proliferáció vizsgálata során a sejteket 0, 10, 25, 50 és 100 ng/ml végkoncentrációjú EGF hozzáadása mellett tenyésztettük, majd a sejteket CellTiter-Blue® Reagent (Promega) oldattal inkubáltuk. A metabolikusan aktív sejtekben a resazurin-ból keletkező resorufin fluoreszcenciáját mértük, amely intenzitása arányos volt az élő sejtek számával.

A GCTB stromasejtek differenciációs képességét az EGF kezelés hatására az oszteoblasztok ALP enzimaktivitását naftol AS-MX foszfát szubsztrát és Fast Violet B kromogénnel tettük láthatóvá.

3. 5. Fluoreszcens *in situ* hibridizáció (FISH)

Az EGFR gén kópiaszám meghatározását TMA metszeteken kétszínű centromer- és lókuszs-specifikus EGFR/CEP7 próbákat (ZytoVision), az izolált GCTB stromasejtek neoplasztikus eredetét a kromoszóma számbeli és strukturális eltérései alapján a 3-as, 4-es, 6-os és X kromoszómák centromerájára specifikus alfa-szatellita, illetve 11p szubtelomerikus és 11-es kromoszóma centromerájára specifikus alfa-szatellita FISH próbakeverékekkel határoztuk meg.

3. 6. EGFR tirozin-kináz domén mutáció vizsgálata

A TMA blokkokból készült metszetekből történő DNS izolálást követően, az EGFR gén 19-es és 21-es exonjait tartalmazó DNS szakaszokat kétlépcsős – „nested” – PCR-rel amplifikáltuk. A kapott terméket mutáció-dúsító PCR módszerrel reamplifikáltuk, amelynek lényege, hogy a vad típusú génszakaszt, a 19-es exon deléciója és 21-es exon pontmutációja lehetséges előfordulási helyén szelektíven hasítjuk, így az alacsony arányban előforduló mutáns allélt is ki lehet mutatni. A PCR termék tisztítása után, az EGFR 19-es és 21-es exonjainak direkt szekvenálását a BigDye® Terminator v3.1 Sequencing Kit segítségével

végeztük, aminek termékeit automata fluoreszcens kapilláris-elektroforézissel (ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer, Thermo Fisher Scientific) detektáltuk.

3. 7. Génexpresszió vizsgálata

Az RNS izolálást (RNeasy® Mini Kit, Qiagen) és reverz transzkripciót követően real-time PCR-el vizsgáltuk a Cx43, RANKL és OPG gének expresszióját. A génexpressziót a β -aktin gén szintjéhez normalizáltuk.

3. 8. Western blot

A GCTB és csontvelői stromasejt tenyészetekből, illetve a HDFa sejtvonalból izolált fehérjéket poliakrilamid-gélelektroforézissel választottunk szét és PVDF membránra blottoltuk, majd a Cx43 fehérje expresszióját vizsgáltuk. Bemérési kontrollként a β -aktin fehérjét használtuk. Másodlagos ellenanyagként peroxidázzal jelölt anti-nyúl antitestet használtunk, majd a membránokat kemilumineszcens (ECL, Western Blotting Substrate, Pierce) előhívás után lefényképeztük.

3. 9. Áramlási „flow” citometria

A sejt-sejt közötti kommunikáció funkcionális vizsgálatát sejtfesték-transzfer módszerrel tanulmányoztuk, ahol a nem fluoreszcens, hidrofób kalcein acetoximetil-észter (kalcein AM) festék az élő sejtekben intracelluláris észterázok hatására, az acetoximetil-észter hidrolízise után hidrofil zöld színű fluoreszcens kalceinné alakul, amely a réskapcsolatokon keresztül képes átjutni az egyik sejtől a másikba. A 1,1'-dioktadecil-3,3,3'-tetra-metilindodikarbocianin (DiI) egy lipofil piros színű fluoreszcens festék, amely a sejtmembrán kettős lipidrétegébe kötődik, így jelezve a kalceinnel jelölt donor sejteket. A kettős jelölt donor sejteket és a nem jelölt akceptor sejteket 1:9 arányban összekevertük, majd 12 óra tenyésztés után a szimpla kalcein pozitív (zöld) sejtek arányát flow-citométerrel határoztuk meg.

3. 10. Digitális mikroszkópia, értékelés és képanalízis

Az immunfestett TMA metszetek digitalizálása Panoramic Scan (3DHISTECH Ltd.) digitális mikroszkóppal 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-

tól 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. A FISH szignálokat Panoramic Viewer software az immunfluoreszcens szignálokat HistoQuant modul software segítségével tanulmányoztuk.

3. 11. Statisztikai értékelés

A statisztikai tesztekhez az SPSS 15.0 és a Statistica 8.0 software-eket használtuk. Az EGFR expresszió és a GCTB progressziós csoportok kapcsolatát kétoldalas Pearson-féle Khi-négyzet (χ^2) próbával és Spearman-féle rangkorrelációs analízissel vizsgáltuk. A Cx43 expresszió kapcsolatát a GCTB klinikoradiológiai stádiumával, illetve a progresszióval a nem-parametrikus Jonkeer-Terpstra és Mann-Whitney U tesztel vizsgáltuk Bonferroni vagy Holm-Hochberg korrelációt alkalmazva. A túléléseket Kaplan-Meier görbéken ábrázoltuk ahol a csoportok közötti szignifikanciát log-rank tesztel, valamint Cox regresszió analízissel határoztuk meg. 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 sejtenyészítés, az immunreakció illetve az mRNS és fehérje expresszió eredmények értékeléséhez párosított Student-féle t-tesztet használtunk. A $p < 0,05$ érték tekintettük szignifikánsnak.

4. EREDMÉNYEK

4. 1. EGFR szerepe GCTB-ben

4. 1. 1. EGFR expressziója GCTB-ben

Az EGFR fehérje expressziót számos EGFR specifikus antitesttel igazoltuk, Az EGFR fehérje 3C6 antitest klónnal való immunreakciója mérsékelt vagy erős sejtmembrán reakció mellett gyenge citoplazma festést mutatott az orsó alakú mononukleáris sejtekben a GCTB esetek 76%-ában (235-ből 176). A 3C6 antitest klón reakciójával kimutatott 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.

A 3C6 antitest klónnal pozitív EGFR GCTB esetek 72%-ában az orsó alakú mononukleáris stromasejtek legalább 20%-a foszforilált (aktivált) tirozin-kináz domén pozitivitást mutatott. Az EGFR fehérje túlermelődése és a receptor tirozin-kináz domének aktiválódása között statisztikailag pozitív korrelációt ($p < 0,05$) igazoltunk.

4. 1. 2. Az EGFR expresszió klinikopatológiai korrelációja

Az EGFR-pozitív esetek szignifikánsan gyakoribbak voltak az agresszív (43-ből 31; 72%) mint a látens (54-ből 27; 50%) klinikoradiológiai csoportban ($p = 0,034$). Egyes agresszív esetekben az EGFR-pozitív stromasejtek a környező vázizmot is infiltrálták.

4. 1. 3. Az EGFR fehérjét expresszáló sejtípus meghatározása

Az EGFR immunreakciót elsősorban a CD163-negatív, de gyakran α -SMA-pozitív neoplasztikus stromasejtekben tudtunk igazolni. A CD163-pozitív monocita/makrofágok alig expresszáltak az EGFR fehérjét, míg a belőlük differenciálódott oszteoklasztok EGFR-negatívak voltak.

4. 1. 4. Az EGFR gén státusz meghatározása

Az EGFR-pozitív GCTB esetekben a mononukleáris sejtek 5-20%-ában a 7-es kromoszóma számbeli eltérései közül tri- vagy tetraszómiáját mutattuk ki viszont az EGFR gén amplifikációja nem volt igazolható.

4. 1. 5. Az EGFR gén tirozin-kináz domén 19-es és 21-es exonjainak mutáció vizsgálata

A GCTB szövetmintákból izolált, majd reverz transzkripcióval DNS-re átírt mRNS-ből sem a 19-es exon deléciója, sem a 21-es exon pontmutációja nem igazolódott.

4. 1. 6. Az EGFR ligandok jelenlétének igazolása

Az EGF immunreakciót a monocita/makrofág és az endoteliális sejtekben mutattuk ki. A stromális sejtek negatívnak bizonyultak mind az EGF-re mind a TGF α -ra. A TGF α immunreakció a monocitákban és oszteoklasztokban adott perinukleáris pozitívítást, míg a stromális sejtekben csak gyenge reakció látszott.

4. 1. 7. Az EGFR expresszió és a TRAP-pozitív oszteoklasztok viszonya

A TRAP-pozitív oszteoklasztok száma szignifikánsan magasabb volt az EGFR-pozitív esetekben (735 ± 237), mint az EGFR-negatív esetekben (581 ± 237) ($p = 0,02$). Erős EGFR fehérje expresszió mellett szignifikánsan nagyobb számban voltak jelen kisebb méretű, TRAP-pozitív oszteoklasztok, mint a negatív és az alacsony EGFR szintű esetekben. A TRAP-pozitív oszteoklasztok átlagos mérete szignifikánsan kisebb volt ($>18\%$) az EGFR-pozitív esetekben, mint az EGFR-negatív esetekben ($p < 0,05$).

4. 1. 8. EGF-kezelés hatása az oszteoklasztogenezisre

A PBMC kezelése EGF és M-CSF kombinációval közel hasonló hatással volt a TRAP- és VNR-pozitív oszteoklasztok keletkezésére, mint a kanonikus M-CSF és RANKL kombináció. Az M-CSF és RANKL együttes hatásával ellentétben, az EGF és M-CSF együttes alkalmazása nem indukálta az oszteoklasztok aktiválását. A VNR- és TRAP-pozitív, multinukleáris 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.

4. 1. 9. Az EGF-kezelés hatása a GCTB stromasejtek proliferációjára és differenciálódására

A tenyésztett GCTB stromasejtek 100 ng/ml EGF hatására a harmadik ($p < 0,05$) és a kilencedik napon emelkedett proliferációs aktivitást mutattak. Az ALP aktivitást, mint oszteoblaszt differenciálódási markert is mértünk. A stromasejtek ALP szintje nem változott szignifikánsan a növekvő EGF koncentráció kezelés hatására.

4. 2. Cx43 expresszió és sejt-kommunikációs csatornák szerepe GCTB-ben

4. 2. 1 Cx43 kifejeződés klinikopatológiai korrelációja

A Cx43 plakkok zömét CD163-negatív neoplasztikus stromasejtek ($81,7 \pm 12,56\%$) expresszálták. Az α -SMA-pozitív GCTB stromasejtekben jelentősen kevesebb Cx43 fehérjét detektáltunk ($32,6 \pm 13,4\%$) mint az α -SMA-negatívokban ($p = 0,017$). Az oszteoklasztokban alig volt Cx43 reakció.

A Cx43 kifejeződés szignifikánsan magasabb volt az oszteoklasztokban gazdag tumort körülvevő reaktív stromában, mint a tumorfészekben. A különbség mind a Cx43-pozitív területhez viszonyítva ($p < 0,001$), mind a Cx43 plakkok számában ($p < 0,016$) szignifikáns volt. A Cx43 fehérje expresszió nem mutatott szignifikáns összefüggést a GCTB rekurrencia gyakoriságával ($p = 0,173$), viszont a tumor klinikoradiológiai stádiumával igen. Szignifikánsan több alacsony (negatív) Cx43 fehérje szintet mutató GCTB eset volt az agresszív csoportban, a látens csoporthoz képest ($p = 0,002$, Bonferroni korrekció: $p < 0,0167$), illetve az aktív csoporthoz viszonyítva ($p = 0,018$, Holm-Hochberg korrekció: $p < 0,025$).

0-8-ig terjedő skálán osztályozva a magasabb Cx43 fehérjeszint ($n = 123$) szignifikánsan jobb progressziómentes túléléssel (PFS) társult ($p = 0,024$).

4. 2. 2. A stromasejtek neoplasztikus természetének igazolása FISH módszerrel

A betegek mintáiból izolált, majd tenyésztett GCTB stromasejtek többsége különböző mértékű poliszómiát mutatott a 3-as, 4-es, 6-os és X kromoszómákra. Egyedi sejtek szintjén aneuszómiákat is megfigyeltünk, így a 4-es kromoszóma triszómiája és a 11-es kromoszóma tetraszómiája mellett a 11-es kromoszóma rövid karján elhelyezkedő telomer régió veszteségét is detektáltuk.

4. 2. 3. Connexin43 fehérje expresszió GCTB stromasejtekben

A Cx43 fehérje a GCTB stromasejtekben döntően az endoplazmatikus retikulum (ER)-Golgi régióban megrekedt. A kontroll HDFa sejtvonalon és a csontvelői stromasejtekben a Cx43 reakció egyenletes eloszlást mutatott gyakran a sejtmembránhoz kötve. A sejtmembránhoz kötött Cx43 frakció szignifikánsan magasabb volt a kontroll HDFa sejtvonalon ($p < 0,01$) és a csontvelői stromasejtekben ($p < 0,05$), mint a GCTB stroma sejtekben.

4. 2. 4. Cx43, RANKL és OPG mRNS expresszió GCTB stromasejtekben

GCTB stromasejtekben a Cx43 mRNS szint szignifikánsan alacsonyabb volt ($p < 0,01$), mint a kontroll HDFa sejtvonalon. Az oszteoklasztogenikus RANKL mRNS szintje nem volt detektálható a csontvelői stromasejtekben, míg HDFa sejtvonalon szignifikánsan alacsonyabb ($p < 0,01$) volt, mint a GCTB stromasejtekben. Ezzel szemben az oszteoklasztogenezist gátló OPG mRNS szintje szignifikánsan alacsonyabb volt GCTB stromasejtekben, mint a csontvelői stromasejtekben, vagy HDFa sejtvonalon ($p < 0,001$).

4. 2. 5. Cx43 foszforiláció vizsgálata GCTB stromasejtekben Western blot módszerrel

GCTB stromasejtekben a Cx43 fehérje expressziója szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a kontroll csontvelői stromasejtekben vagy HDFa sejtvonalon ($p < 0,05$). Ráadásul, a HDFa sejtvonalon és a csontvelői stromasejtekben a 43 kDa méretnek megfelelő sáv felett két plusz sáv volt megfigyelhető, ami a GCTB stromasejtekben esetében hiányzott. ALP kezelés a két extra sávot eltüntette, ami igazolta foszforilált fehérje természetüket (P_1 és P_2).

4. 2. 6. A Cx43 kommunikációs csatornák funkcionális vizsgálata áramlási citometriával

A GCTB stromasejtekben szignifikánsan alacsonyabb festéktranszfer mértünk, mint a kontroll sejtekben. A metabolikus kapcsolatot jelző kalcein fluoreszcenciája eredetileg jelöletlen sejtekben átlagosan a GCTB stromasejtek 0,98%-ában, míg a kontroll HDFa sejtvonalon 7,13%-ában, illetve a csontvelői stromasejtek 4,6%-ában fordult elő. A kontroll HDFa sejtvonalon és csontvelői stromasejtekben a festéktranszfer legalább hétszer nagyobb volt, mint a GCTB stromasejtekben mért transzfer értékhez képest ($p < 0,001$).

5. 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 fehérje szint háttérében sem génamplifikáció, sem a tirozin kináz 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.

6. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

6. 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.

6. 2. Az értekezés témájától eltérő témában megjelent közlemények

1. Pászti-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. Pászti-Gere E, McManus S, Meggyesházi N, **Balla P**, Gálfí 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.

