DOI:10.14753/SE.2012.1746

Stroma-hám interakciók a vastagbél regenerációs és tumorképződési folyamataiban

Doktori értekezés

Valcz Gábor

Semmelweis Egyetem

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Témavezető: Dr. Molnár Béla, Ph.D., a MTA doktora

Hivatalos bírálók: Dr. Zalatnai Attila, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Tóth Erika, Ph.D., főorvos

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Kovalszky Ilona, a MTA doktora, egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Szaleczky Erika, Ph.D., szakorvos
Dr. Szmola Richárd, Ph.D., egyetemi tanársegéd

Budapest

2012

DOI:10.14753/SE.2012.1746

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE 5

1.0. BEVEZETÉS 7

1.1. A vastagbél szövettani felépítése 7

1.2. A gasztrointesztinális őssejtek 8

1.3. A mesenchymális őssejtek és szerepük a bélhám regenerációs folyamataiban 10

1.4. A gasztrointesztinális őssejt niche 11

1.5. A miofibroblasztok, mint az őssejt niche domináns sejtjei 12

1.6. A lymphoid aggregátumok szerepe a hám regenerációjában 13

1.7. A sejtvándorlással járó hám-stroma interakciók a hámregenerációban és a vastagbélrák kialakulása során 14

1.7.1. A CDX2, mint a hámirányú elköteleződés jelzője 15

1.7.2. A Musashi-1 őssejtmarker 16

1.7.3. Az epitheliális - mesenchymális átalakulás szabályozása 16

1.7.4. A TGF-β jelátviteli út 19

1.7.5. A Toll-like receptor 9 jelátviteli út 21

1.7.6. Az osteopontin szerepe a sejtátalakulás folyamatának szabályozásában 22

1.8. A colorectalis adenoma - dysplasia - carcinoma szekvencia 22

2.0. CÉLKITŰZÉSEK 25

3.0. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK 26

3.1. A csontvelői eredetű sejtek kimutatása férfi csontvelővel transzplantált nőbetegekben 26

3.2. A strómába vándorló (Musashi-1+) őssejtek hám-irányú elköteleződésének kimutatása CDX2 hámmarker segítségével 28

DOI:10.14753/SE.2012.1746

3.3. Intraepitheliális α-SMA pozitív sejtek kimutatása 28

3.4. Az E-cadherin expresszió változásának kimutatása immunhisztokémiai módszerrel 29

3.5. TGF-β receptor II kimutatása immunhisztokémia segítségével 30

3.6. TGF-B receptor II mRNS szintű kimutatása microarray chiptechnika segítségével 31

3.6.1. Mintagyűjtés 31

3.6.2. Lézer mikrodisszekció 31

3.6.3. RNS izolálás 32

3.6.4. RNS minőségellenőrzés 32

3.6.5. mRNS expresszió microarray elemzés 33

3.7. A Toll-like receptor 9 kimutatása immunhisztokémia segítségével 34

3.8. Az osteopontin immunhisztokémiai kimutatása 34

3.9. Alkalmazott statisztikai módszerek 35

3.9.1. Génexpressziós microarray esetében alkalmazott statisztikai módszerek 35

3.9.2. Immunhisztokémia vizsgálatok értékelésére alkalmazott statisztikai módszerek 36

4.0. EREDMÉNYEK 37

4.1. Csontvelői eredetű (Y-FISH+) sejtek kimtatása egészséges és enyhe gyulladást mutató területek kriptáinak hámrétegében 37

DOI:10.14753/SE.2012.1746

4.2. Az őssejtek hámirányú elköteleződésének kimutatása CDX2 hámsejt marker és Musashi-1 őssejtmarker segítségével 40

4.3. A CDX2+ sejtek eredetének meghatározása 41

4.4. Az intraepitheliális α-SMA pozitív sejtek arányának változása az ACS során 42

4.5. Az E-cadherin termelődésének változása az ACS során 46

4.6. A TGF-β receptor II fehérje expresszió változása az ACS során 47

4.7. A TGF-β receptor II mRNS szintű expressziós változása az ACS során 49

4.8. A TLR9 expresszió változása a vastagbél ACS során 50

4.9. Az OPN termelődésének változása a vastagbél ACS során 52

5.0. MEGBESZÉLÉS 54

5.1. A csontvelői sejtek szerepe a vastagbélhám regenerációjában 54

5.2. A tranzíciós folyamatok számának növekedése a vastagbélrák kialakulása során 55

5.3. Emelkedett hámsejt osteopontin termelődés az ACS során 58

6.0. A LEGFONTOSABB ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK ÉS MEGFIGYELÉSEK 59

7.0. ÖSSZEFOGLALÁS 61

8.0. IRODALOMJEGYZÉK 63

9.0. SAJÁT PUBLIKÁVIÓK JEGYZÉKE 75

9.1. A témához kapcsolódó publikációk jegyzéke 75

9.2. Egyéb közlemények listája 76

10.0. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS 78

DOI:10.14753/SE.2012.1746

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

α-SMA: α-smooth muscle actin (α-simaizom aktin)

BMP: bone morphogenic protein

CDX2: caudal-related homeobox protein 2

CRC: colorectalis carcinoma (vastagbélrák)

CpG szigetek: citozin-guanin bázispárokban gazdag régiók a genomban

CTGF: connective tissue growth factor (kötőszöveti növekedési faktor)

DNMT1: DNS metiltranszferáz-1

ED-A: extradomain-A

EMT: epithelial-to-mesenchymal transition (epitheliális-mesenchymális átalakulás)

FISH: fluorescens in situ hybridizáció

GALT: gut-associated lymphoid tissue (bélhez kötődő nyirokszövet)

GREM: gremlin

Hes-1: hairy and enhancer of split 1 (őssejt-specifikus fehérje)

IBD: inflammatory bowel disease (gyulladásos bélbetegség)

Lgr5: leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5 (leucinban gazdag ismétlődéseket tartalmazó G-fehérjéhez csatolt receptor 5, őssejt-specifikus fehérje)

MALT: mucosa associated lymphoid tissue (nyálkahártyához kötődő nyirokszövet)

MAPK: mitogén-aktivált protein kináz

MET: mesenchymal-to-epithelial transition (mesenchymális-epitheliális átalakulás)

MLCK: myosin light-chain kinase (miozin könnyű-lánc kináz)

MRTF: myocardin-related transcription factor (miocardin-eredetű transzkripciós faktor)

MSC: mesenchymal stem cell (mesenchymális őssejt)

mTOR: mammalian target of rapamycin

NICD: notch intracellular domain

NMP: nuclear matrix protein

OPN: osteopontin

PDGF-B: platelet-derived growth factor-B (vérlemezke eredetű növekedési faktor-B)

PI3K: phosphatidylinositol 3'-kinase (foszfatidil-inozitol 3'-kináz)

SFRP: secreted frizzled-related protein

SRF: serum response factor

TIAM1: T-cell lymphoma invasion and metastasis-inducing protein 1 (T-sejtes lymphoma és metasztázis gén 1)

TGF-β: transforming growth factor-β

TGF-βRI,-II: transforming growth factor-β receptor I,-II

TLR9: Toll-like receptor 9

ZEB: Zinc finger E-box-binding homeobox fehérje

DOI:10.14753/SE.2012.1746

1.0. BEVEZETÉS

1.1. A vastagbél szövettani felépítése

A vastagbél fő feladatai közé tartozik az egyes anyagok felszívása (víz, gyógyszerek, ionok), valamint a bélsár koncentrálása és továbbítása a végbél felé. A vastagbél anatómiailag a következő részekre osztható: vakbél, felszálló-, haránt-, leszálló vastagbél, szigmabél és végbél (1). Bélüregi határát egyrétegű hengerhám borítja (lamina epithelialis mucosa), amelyet, tight- és adherens kapcsolatokkal szorosan egymáshoz kapcsolódó szekréciót végző enteroendokrin- és kehelysejtek, valamint felszívást végző hámsejtek alkotják (2,3).

Az enteroendokrin sejtek a bélrendszer egész hosszában megtalálható, az alapi részükön kiszélesedő, piramis alakú sejtek, amelyek parakrin vagy endokrin módon ható, hormon- vagy neurotranszmitter-szerű anyagokat termelnek (pl. kolecisztokinin, gasztrin, motilin) (4).

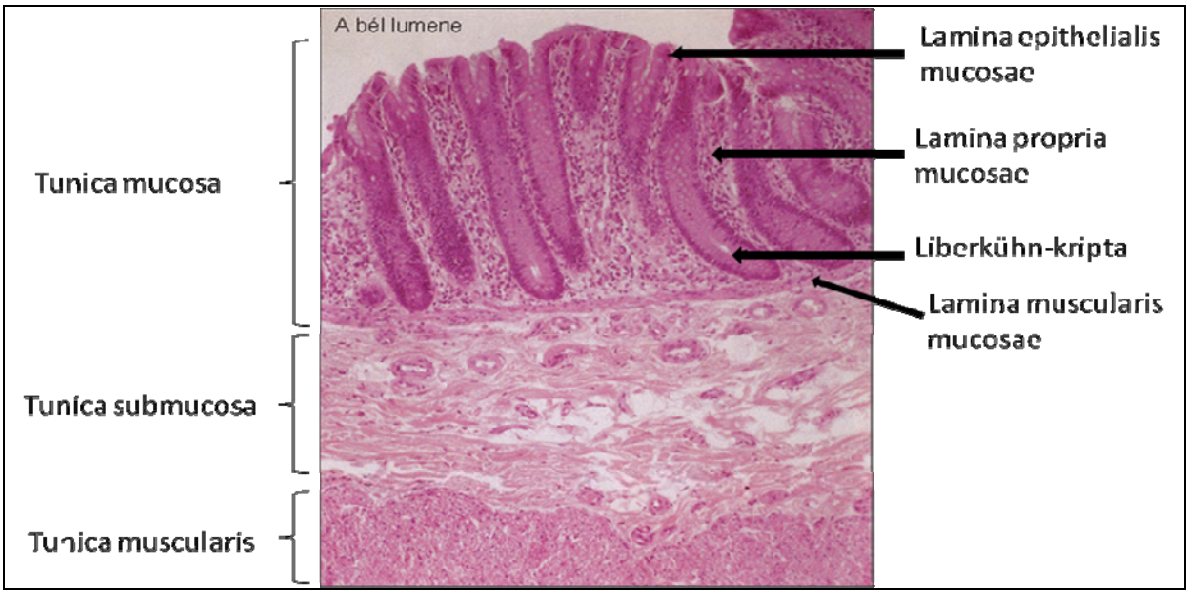
A kehelysejtek jól fejlett Golgi apparátussal és durva endoplazmatikus retikulummal (DER) rendelkező sejtek. Csúcsi részükön mucint tartalmazó vakuólumok találhatóak, amelyek kiürülve védik és csúszóssá teszi a hámfelszínt (1).

Az oszlop alakú, mikrobolyhokkal rendelkező hámsejtekben Na^+/K^+ ATP-áz által vezérelt aktív transzport és passzív felszívódás is történik (1).

A hámréteg kesztyűujj-szerűen betüremkedik az alatta elhelyezkedő, erekben és idegben gazdag kötőszövetes rétegbe (lamina propria mucosae), kialakítva ezzel a vastagbél nyálkahártyájának jellegzetes, csőszerű képződményeit, a Lieberkühn-kriptákat. Ezt a kötőszövetes réteget laza kapcsolatban lévő sejtek (immunsejtek, fibroblasztok, miofibroblasztok) alkotják, a köztük lévő teret pedig az extracelluláris mátrix anyagai töltik ki. A Lieberkühn-kriptákat a kötőszövetes réteg alatt található, vékony, simaizomsejtekből felépülő lemezszerű sejtréteg (lamina muscularis propria) határolja és mozgatja, így elősegítve a kehelysejtek szekrétumának kijuttatását a bélüregbe. Ezt az izomréteget egy újabb, nagyerekben, zsírszövetben és idegekben gazdag kötőszövetes réteg, a tunica submucosa követi. A submucosa alatt található a körkörös- és hosszanti kötegekből álló simaizom réteg (tunica muscularis), ami szerepet játszik a bélsár formálásában és a

DOI:10.14753/SE.2012.1746

perisztaltika révén a bélsár továbbításában. Végül, a vastagbél külső (hasüregi szervek felé eső) felületét tunica serosa/adventia borítja (1. ábra).



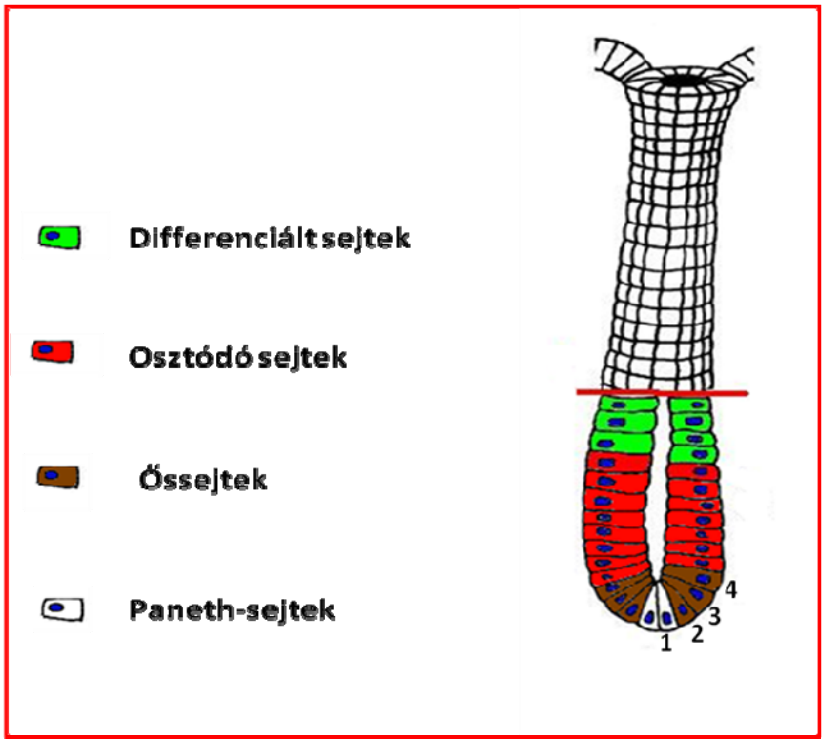
1. ábra. A vastagbél szövettani felépítése. *A vastagbél fala három rétegből áll: nyálkahártyára (tunica mucosae), nyálkahártya alatti kötőszövetes réteg (tunica submucosae) és izomréteg (tunica muscularis). A bélüreg felé eső legbelső réteg (tunica mucosae) három szövettípusra osztható: a hámszövetre (lamina epitheliális), a stroma kötőszövetes rétegére (lamina propria) és a nyálkahártya saját izomrétegére (lamina muscularis). (Módosított ábra, forrás: Röhlich Pál: Szövettan, 1999)*

1.2. A gasztrointesztinális őssejtek

A humán vastagbélben a mirigyhámsejtek életciklusa számottevő: 2-3 nap alatt az egész vastagbélhám megújul. A vastagbél folyamatosan pusztuló sejtjeinek pótlása kripta alapjánál elhelyezkedő őssejtek feladata. Ezek a sejtek nemcsak elkötelezett utódsejteket (leánysejteket) tudnak előállítani, hanem önmagukhoz hasonló másolatokat is. A szöveti őssejtek multipotens, mérsékelten beszűkült potenciájú sejtek, amelyek egy szerv szöveteinek valamennyi sejttípusát képesek előállítani.

A hámsejteket képző szöveti (lokális) őssejtek a mirigyek alapi (bazális) részén helyezkednek el. Ezekből a multipotens sejtekből az aszimmetrikus osztódáskor keletkező leánysejt-előalakok még néhány osztódási szakaszon mennek keresztül, majd szekréciót végző enteroendokrin- vagy kehelysejtekké, valamint a felszívást végző hámsejtekké differenciálódnak (5,6,7,8,9). A teljesen differenciálódott sejtek a béllumen felszíne felé vándorolnak, ahol programozott sejthalál (apoptózis) következtében elpusztulnak, és a bélüregbe kerülnek (2,3,10). Normális körülmények között az őssejteknek csupán kis, kb. 10%-a van a sejtosztódás aktív fázisában (S, G2, M fázis), még nagyobb hányaduk inaktív (alvó) formában van jelen. A hámsejtképzés fokozódása valószínűleg a nyugalmi fázisban lévő szöveti őssejtek aktiválásán keresztül megy végbe. Ez a folyamat az őssejt mikrokörnyezetének, a „niche”-nek megváltozott sejtszámával, illetve ezen sejtek őssejtre ható szabályzó molekulák (pl. Wnt, Bmp) termelésével magyarázható (11). A gasztrointestinális őssejtek kevés citoplazmával és nagy maggal rendelkező, relatív differenciálatlan sejtek. Magjukban diffúz kromatin állomány, nagyméretű, retikulált magvacska és néhány szabad riboszóma található (12). A kripta bazális részén, 1-4 pozícióban helyezkednek el (2. ábra). Pontos számuk meghatározásában jelentős vélemény különbségek alakultak ki a különböző kutatócsoportok között, amely fenotípusuk meghatározásának nehézségeiből adódik. A kriptánkénti számukat 4 és 16 között becsülik (13). Immunhisztokémiai kimutatásukra leggyakrabban Musashi-1, Lgr5 és Hes-1 markereket használják (13,14). Aszimmetrikus osztódásuk révén egy, a multipotens őssejttel megegyező fenotípusú őssejt, valamint egy elkötelezett leánysejt keletkezik, amely végső differenciálódása után szekretáló enteroendokrin-, vagy kehelysejtté differenciálódik, vagy felszívást végző hámsejtekké alakul.

DOI:10.14753/SE.2012.1746



2. Ábra. A Lieberkühn-kripta sematikus felépítése. *A mirigyek alsó régiójában 1-4 pozícióban találhatóak a gasztrointestinális őssejtek (barna sejtek), amelyek leánysejtjei a 4-es pozíció felett a bélüreg felé haladva néhány osztódási fázison mennek keresztül (piros sejtek), majd endokrin-, kehely-, vagy hámsejtté történő végső differenciálódásuk (zöld sejtek) után elpusztulnak, és a bélüregbe kerülnek. Az őssejtektől bazálisan elhelyezkedő Paneth-sejtek (fehér sejtek) a vékonybélre jellemzőek, a vastagbélben nem találhatóak meg.*

1.3. A mesenchymális őssejtek és szerepük a bélhám regenerációs folyamataiban

Nagyobb mértékű szöveti sérülés (pl. gyulladásos bélbetegségek, vagy graft versus host betegség) esetében a szöveti eredetű őssejtek kapacitása már nem elégséges a tökéletes hámregenerációhoz. Ekkor a csontvelői eredetű sejtek, például mesenchymalis őssejtek (mesenchymal stem cells/MSCs) segíthetik a gyógyulást (2,15,16). A mesenchymális őssejtek *in vitro* körülmények között nagy magvú, kis citoplazmával rendelkező, fibroblaszt-szerű, multipotens sejtek, azaz mezodermális, neuroektodermális és endodermális irányba képesek

differenciáciálódni, és amelyek részt vehetnek számos szövet (pl. csont-, porc-, izom-, kötőszövet) regenerációs folyamataiban (15,17). Immunhisztokémiai kimutatásukra CD13, CD29, CD31, CD44, CD54, CD63, CD73, CD105, CD106, CD140b, CD166, Stro1 és Mushasi-1 jelzőket használunk (2,18). Regenerációs képességüket már számos csontvelő transzplantált recipiensen végzett kísérlet igazolta. Ezen kísérletek során a regenerációs folyamatokban részt vevő, donor eredetű, Y-kromoszómával rendelkező sejteket mutattak ki *fluoreszcens in situ hybridizációval* (Y-FISH) (8). Az MSC sejtek számos, a gyógyulásban aktívan résztvevő strómális sejtté differenciálódhatnak (pl. fibroblaszt, miofibroblaszt), vagy a hámrétegbe épülve közvetlenül segíthetik annak gyógyulását (16,19,20,21).

1.4. A gasztrointesztinális őssejt niche

Schofield őssejt niche elmélete (1978) szerint az őssejt életfolyamatait egy specifikus mikrokörnyezet, az úgynevezett „niche" szabályozza (22). A niche-t számos, az őssejt funkcióját (pl. proliferáció és differenciáció) befolyásoló sejttípus, mint a hám-, blasztszerű sejtek (fibroblaszt, miofibroblaszt), immunsejtek (pl. makrofágok, limfociták), simaizomsejtek, valamint a sejtek közötti teret kitöltő extracelluláris mátrix alkotja (23). A mikrokörnyezet és az őssejtek között dinamikus, kétirányú kapcsolatok befolyásolják annak aktivitási (alvó-, aktív állapot) és/vagy szaporodási tulajdonságait (24,25). Az őssejtek utódsejt termelésében számos jelátviteli útvonalnak szerepe van, mint a Wnt, a csontalak-építő fehérje (bone morphogenic protein (BMP)), a Hedgehog (Hh), a transzformáló növekedési faktor-β (TGF-β), vagy a Notch útvonalak (11). Ezeket a jelátviteli útvonalakat a környezeti sejtek (pl. miofibroblasztok és simaizomsejtek) hírvivő molekulák által szabályozzák. Az őssejt szaporodási tulajdonságait főként a Wnt jelátviteli út befolyásolja, amelyet nyugvó, nem szaporodó őssejtben a BMP gátol. A niche miofibroblaszt és simaizom sejtjeiből felszabaduló BMP inhibitorok, mint a gremlin (GREM)-1, -2, vagy a chordin-like (CHRDL) 1 a Wnt útvonal gátlásának feloldásával őssejtosztódást idéznek elő. Ugyankkor egyes Wnt inhibitorok, mint az SFRP1,-2, FZD2, FZD3 és FZD7 nagyobb mennyiségben fordulnak elő a kripta bázisánál (11). Úgy tűnik, hogy ezen szabályzó molekulák egymáshoz viszonyított aránya szabja meg az őssejt éppen aktuális élettani folyamatait. Ezeknek a folyamatoknak a háttere nem kellőképpen ismert, de feltételezhetően az idegrendszer is szerepet játszik az őssejtaktivitás szabályozásában.

DOI:10.14753/SE.2012.1746

1.5. A miofibroblasztok, mint az őssejt niche domináns sejtjei

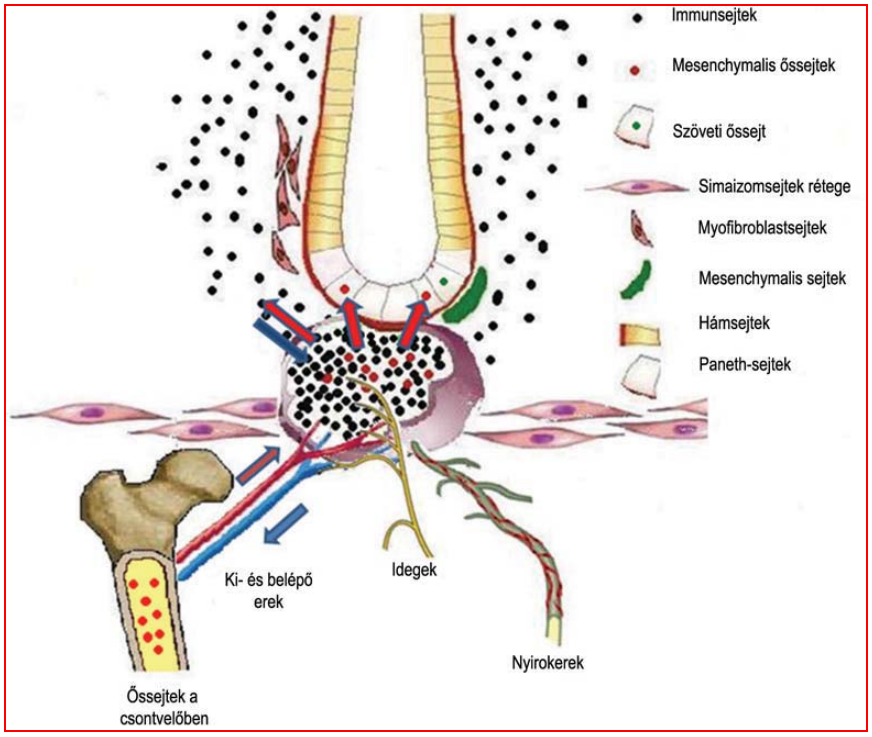
A miofibroblasztok (aktivált fibroblasztok) hosszúkás, vagy csillagszerű morfológiát mutató sejtek, amelyek az egészséges vastagbélben a kripták hámrétege alatt, mint subepitheliális miofibroblaszt (SEMF) sejtek helyezkednek el, és kosárként fogják körül azokat. Fő feladatuk a mirigy váladékának (nyák) kiürítéséhez szükséges mozgás biztosítása, és valószínűleg a vékonybél villusainak ritmikus kontrakcióiban is szerepük van (26). Ezen kívül α-simaizom aktin (α-SMA) elemeik segítségével aktív mozgásra is képesek; összehúzódásuknak szerepe van a sebgyógyulási folyamatokban is. Immunhisztokémiai kimutatásukra az α-SMA-n kívül használatosak további pozitív (pl. fibronectin, vimentin) és negatív (pl. desmin) markerek is (13). Jól fejlett endoplazmatikus retikulumuk és Golgi-hálózatuk nagymértékű szekrétum termelésére utal (27,28). Ezek közül a szekretált szabályzók közül egyesek nélkülözhetetlenek a hámréteg proliferációjának (pl. májsejt eredetű növekedési faktor; HGF) és differenciácójának (pl. TGF-β) szabályozásában. Fontos szerepük van az őssejtaktivitás szabályozásában is azáltal, hogy a miofibroblaszt az őssejt Wnt proliferációs jelátviteli útját szabályozza, szekretált BMP inhibitorok (pl. GREM-1, GREM-2) segítségével.

Kialakulásuk főként helyi fibroblasztokból, őssejtekből, hámsejtekből, különböző szabályzó molekulák (tumor necrosis factor-α/TNF-α, vérlemezke-eredetű növekedési faktor/PDGF és főleg TGF-β) hatására megy végbe. A TGF-β gyulladásos bélbetegségekben és vastagbélrákban is túltermelődik, és így befolyásolja a kialakuló miofibroblasztok mennyiségét (29,30). A TGF-β hatására létrejövő α-SMA termeléshez elengedhetetlenül szükséges az egyik általunk vizsgált fehérje az osteopontin/OPN is (lásd 1.7.6. fejezet) (31,32). Több tanulmány kimutatta, hogy egyes specifikus DNS szakaszok, az úgynevezett nem metilált CpG motívumok (unmethylated CpG motifs) Toll-like-9 receptorhoz (TLR-9) való kötődése ugyancsak aktivált miofibroblasztok kialakuláshoz vezethet (33, 34).

DOI:10.14753/SE.2012.1746

1.6. A lymphoid aggregátumok szerepe a hám regenerációjában

A nyálkahártyához kötődő lymphoid szövet (mucosa associated lymphoid tissue /MALT) formálja a szervezet legnagyobb nyirokszervét (35). Az emésztőrendszerben ezt bélhez kötött lymphoid szövetnek (gut-associated lymphoid tissue/GALT) nevezzük. A GALT különálló lymphoid tüszőkből és aggregátumokból áll, amelyek nagyrészt dendritikus sejtekből, valamint T- és B-lymphocytákból épülnek fel. A tüszők és az aggregátumok száma, átmérője és sűrűsége is megnő a gyulladásos bélbetegségekben (36). Feltételezhető, hogy a lymphoid aggregátumok a regenerációban részt vevő MSC sejtek kilépési és tárolási helyéül szolgálhatnak, amelyek a gyulladásos területre vándorolva immunrendszeri funkciókon kívül a hám regenerációs folyamataiban is részt vesznek (3. ábra) (37,38,39). Erre utal, hogy a Peyer-plakk eltávolításon átesett patkányban a kripták fejlődése rendellenesnek mutatkozott, a sebgyógyulási folyamatok lassabban zajlottak, a hámsejtek proliferációja csökkent (39).



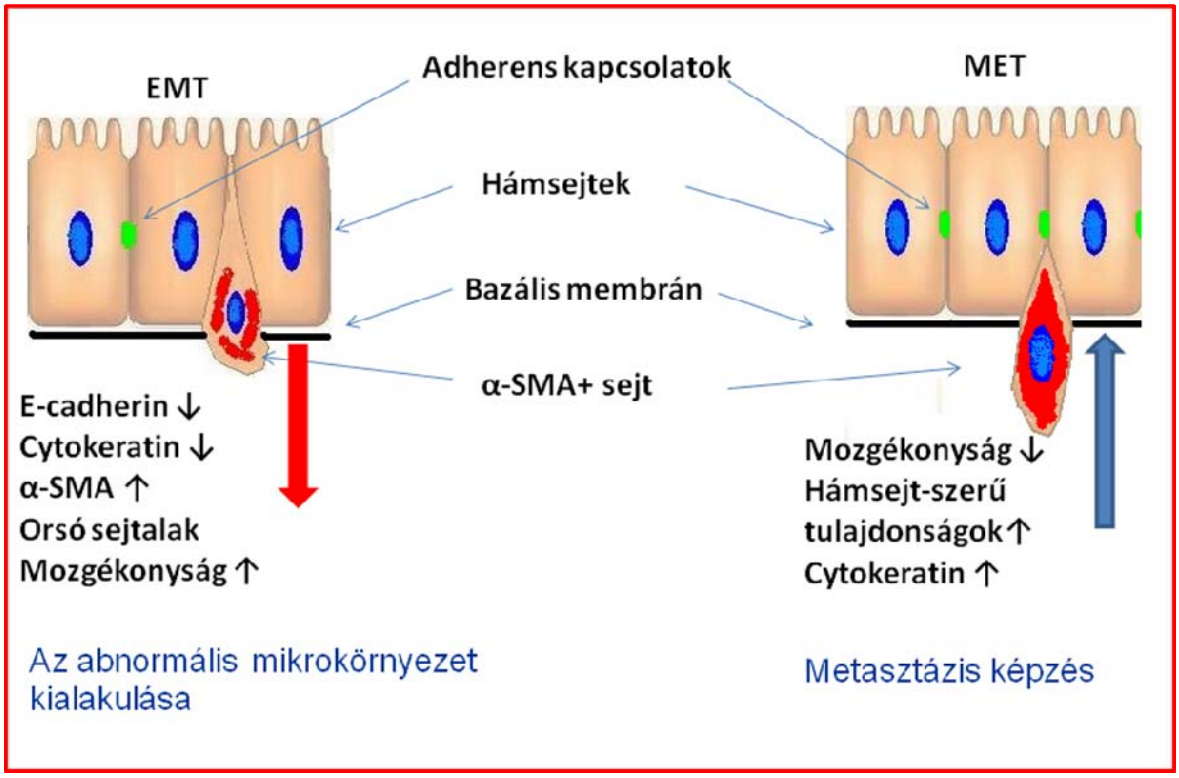
3. ábra. A lymphoid aggregátumok feltételezett szerepe a hámréteg regenerációjában. *Nagyobb mértékű szöveti sérülés hatására a csontvelői eredetű mesenchymális őssejtek strómális sejtekké (fibroblaszt, myofbroblaszt) alakulnak. Ritkább esetben a csontvelői őssejtek hámsejtté alakulhatnak, vagy megtartva őssejt tulajdonságaikat osztódásba kezdhetnek.*

DOI:10.14753/SE.2012.1746

1.7. A sejtvándorlással járó hám-stromastroma interakciók a hámregenerációban és a vastagbélrák kialakulása során

A szervek, szövetek fejlődése, növekedése, valamint egyéb fiziológiás folyamatainak szabályozása nem az egyes sejtek önálló tevékenységének, hanem sok sejt együttes, összerendezett működésének az eredménye. Ezek a folyatok bonyolult kémiai szabályozás alatt állnak, amelyek egyes patológiás esetekben (pl. tumorképződés) megváltozhatnak. A különböző szövetek közötti kommunikációt az információ minősége szerint két csoportra oszthatjuk. Az első csoportba tartozik a szabályozó molekulák (pl. növekedési hormonok, kemokinek, citokinek) közvetítette kapcsolat, míg a másodikba a sejtvándorlással és fenotípus változással járó kapcsolatokat soroljuk. Az utóbbit a vándorlás irányától függően mesenchymális - epitheliális átalakulásnak (mesenchymal to epithelal transition/MET), illetve epitheliális - mesenchymális átalakulásnak (epithelal to mesenchymal transition/EMT) nevezzük (4. ábra) (40). A hám regenerációs folyamataiban a MET a jellemző folyamat, még a vastagbélrákban mind az EMT (abnormális mikrokörnyezet kialakítása, hám eredetű sejtek mozgása), mind pedig a MET (a metasztatizáló sejt hámba épülése) megfigyelhető (41,42). A regenerációs folyamatok során csontvelői eredetű sejtek a hámrétegbe vándorolhatnak, ahol funkcionáló hámsejtté alakulnak. A MET magába foglalja a hámsejt-szerű fenotípus kialakulását (pl. apikális-bazális polaritás, oszlop-szerű sejtalak), hám markerek megjelenését (cytokeratin, E-cadherin), valamint funkcionális változásokat is (pl. transzport folyamatok megjelenését) (2). A hám-stromastroma interakciók másik csoportja szabályozó-molekulákon keresztül valósul meg. A folyamat során a hámsejtekben expresszálódó kémiai hírvivő molekulák (pl. TGF-β, osteopontin) a strómába jutva befolyásolják az ott elhelyezkedő sejtek életfolyamatait.

DOI:10.14753/SE.2012.1746



4. ábra. A fenotípus változással járó sejtátalakulások a vastagbélben. *Az epitheliális - mesenchymális átalakulás során a sejt elhagyja a hámréteget, amelyet megelőz az E-cadherin sejtkapcsoló fehérje termelődésének csökkenése. Kialakul az orsószerű sejtalak és az α-SMA termeléssel összefüggő fokozott mozgékonyság. Az EMT-nek szerepe van a rákos őssejt mikrokörnyezetének kialakításban. A fordított irányú folyamat, a mesenchymális - epitheliális átalakulás során a sejtek beépülnek a hámrétegbe, ezzel párhuzamosan eltűnnek a mesenchymális sejtekre jellemző tulajdonságok (α-SMA termelés, mozgékonyság) és megjelennek egyes hámsejttulajdonságok, mint a cytokeratin és az E-cadherin termelés.*

1.7.1. A CDX2, mint a hámirányú elköteleződés jelzője

A CDX2 (Caudal-related homeobox protein 2) transzkripciós faktor az emlős homeobox (DNS-kötő fehérjét kódoló) gének közé tartozik, ami a vékony- és a vastagbél hámsejtjeinek magjában termelődik (43,44). A CDX2 számos sejtfunkciót befolyásol, mint például a sejt-

sejt kapcsolatok és az oszlopszerű sejtalak kialakítása (45). A CDX2 alkalmas a strómális sejtek korai hámirányú elköteleződésének kimutatására (46), mivel számos hám-specifikus transzkripciós faktor kódolásával és szabályozó molekula aktiválásával (pl. p38 MAPK, GATA-4, hepatocyte nuclear factor-1, Wnt/β-catenin/TCF) szerepe van a hámsejtek differenciációjának és osztódásának szabályozásában (43, 45,47,48).

1.7.2. A Musashi-1 őssejtmarker

A Musashi-1 (MSI1) az mRNS-kötő fehérjék közé tartozik, amelyet a gyümölcslégy (Drosophila) érzékelő rendszerében írtak le először (49). Az MSI1 legfőképpen az idegsejt előalakokban termelődik, de expresszálódik az emlő- és az emésztőrendszer őssejtjeiben is (50,51,52). A vastagbél kriptáinak alsó harmadában, az 1-4 pozícióban jellemző a megjelenése. *Matsumoto és mtsai.* leírták a bélrendszer hámrétegébe épülő csontvelői eredetű őssejtek MSI1 pozitivitását (2). Az MSI1 úgy aktiválja a Notch jelátviteli útvonalat, hogy annak gátlójához, az úgynevezett m-Numb fehérje mRNS-éhez kötődik, és gátolja annak transzlációját. Az MSI1 az MSI2-vel együttműködve a Notch útvonal aktiválásán keresztül fontos szerepet játszik az őssejtek differenciálatlan állapotban való tartásában (50).

1.7.3. Az epitheliális - mesenchymális átalakulás szabályozása

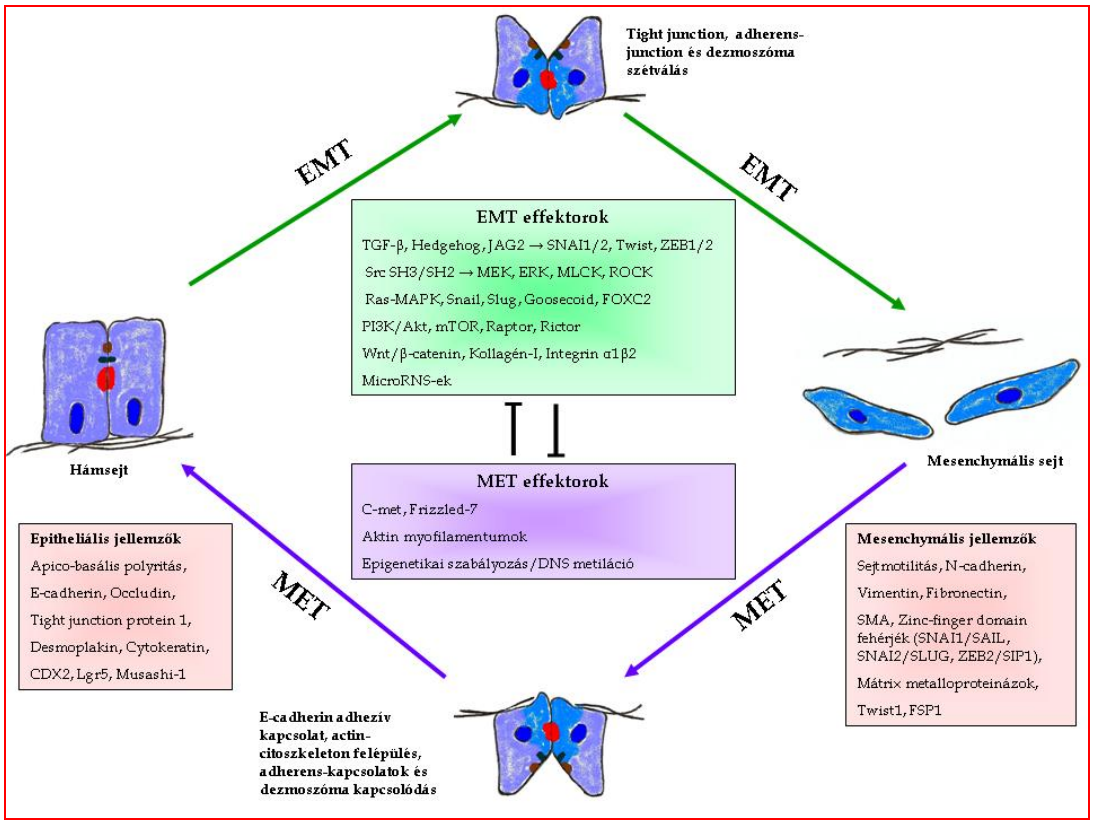
Számos, rák kialakulásához köthető útvonal (pl. növekedési faktor peptidek, Src, Ras, integrin, Wnt/β-catenin, Notch) befolyásolhatja az epitheliális-mesenchymális átalakulást. A transzformáló növekedési faktor-β (TGF-β) az EMT legfőbb szabályozója. A TGF-β közvetlenül aktivál bizonyos transzkripciós faktorokat, mint a SNAI1/2, Twist és a ZEB1/2, amelyek a kulcsszabályozói az EMT folyamatának. Az Src SH3 és SH2 domének egyes enzimekkel (extracelluláris szignál-szabályozott kináz/ERK, MEK/ERK kináz, myosin könnyű lánc kináz/MLCK, Rho-függő fehérje kináz/ROCK) együtt a phosphomyosin felhalmozódását eredményezik a rákos sejtek külső részén és elősegítik mesenchymális fenotípus megjelenését (53). Kimutatták, hogy a Ras-mitogén-aktiválta protein kináz aktivál

két transzkripciós faktort, a Snail-t és a Slug-ot, amelyek elősegítik az EMT-t, részben azáltal, hogy gátolják az E-cadherin átíródását (54). A foszfatidil-inozitol 3'-kináz (PI3K)/Akt tengely aktivációja központi folyamata az EMT-nek (55), ami összeköthető a vastagbélrák fejlődésével és növekedésével. Az mTOR kináz, ami a PI3K/Akt szignálút eleme, szintén szabályozza a vastagbélrák kialakulását (56,57). Az mTOR, Raptor és a Rictor mRNS megnövekedett expressziója a vastagbélrák fejlődése során valószínűsíti, hogy az mTOR szignál összefüggésben állhat a vastagbélrák fejlődésével és az áttétképzéssel (58). Gulhati és mtsai (58) kimutatták, hogy az mTORC1 és az mTORC2 gátlása a ráksejtek csökkentett vándorlási és inváziós képességét okozzák, amelyet a citoszkeleton átrendeződése, valamint a RhoA és a Rac1 csökkenő aktivációja kísér. Az mTORC1 és az mTORC2 gátlása mesenchymális-epitheliális átmenetre jellemző változásokat idéz elő, és lehetővé teszi a metasztázisok kialakulását is. Ezen eredmények alapján az mTORC1 és az mTORC2 a vastagbélrák sejtek mozgékonyságát is befolyásolja a RhoA és a Rac1 szignálútvonalakon keresztül. A Twist E-cadherin inhibítor transzkripciós faktor ugyancsak kiválthatja az EMT-t és részt vehet a metasztázis kialakulásának szabályozásában (59,60). A FOXC2 expressziója egy fontos eleme az embrionális fejlődésnek és feltételezhetően szerepe van az EMT kiváltásában, valamint az áttétképzés szabályozásában is. Az EMT folyamata során a TGF-β1 hatására az érképzést befolyásoló FOX (Forkhead Forkhead/Fox transzkripciós factor) C2 expressziója is megnövekzik (61,62,63).

A legtöbb vastagbélrák olyan mutációt hordoz, amely a Wnt út aktivációjához vezet. Ennek a jelútnak meghatározó szerepe van az őssejt biológiában is (64). A különböző tumorokban a Wnt útvonal aktivációja eltérő mértékű lehet, ami valószínűsíti a mikrokörnyezet szabályozószerepét. A mikrokörnyezetben található 1. típusú kollagén fontos része a tumorsejt-gazdasejt interakcióknak a vastagbélrák kialakulása során (65). Az 1. típusú kollagén csökkenti a CDX2 korai hámmarker termelődését és fokozza a humán vastagbélrákos sejtek tumorképzését xenograft modellekben (66). Az integrin α1β2-nek központi szerepe van az 1. típusú kollagén álltal előidézett EMT-ben (67). A Hedgehog szignál kaszkád, a Wnt, az epitheliális növekedési faktor/fibroblaszt növekedési faktor és a TGFβ/Activin/Nodal/bone morphogenic protein szignál kaszkád is szerepet játszik az EMT kialakulásában az E-cadherin termelésének csökkenésén keresztül (60,68,69). Jóllehet, a Hedgehog szignál kaszkád növeli a SNAI1 termelését, nincs bizonyíték arra, hogy ez direkt transzkripció szabályzásán keresztül valósul meg. Másfelől, a Hedgehog szignál a JAG2

felülszabályozását és a TGF-β1 szekrécióját okozza, nagyfokú mozgékonyságot és inváziós képességet biztosítva a rákos sejteknek (70). A JAG2 szignál hatására, a Notch receptor a Notch intracellular domainhoz (NICD) kapcsolódik. Ezután a magban a NICD összekapcsolódik a CSL transzkripciós faktorral, ami a SNAI1 fokozott termeléséhez vezet (71). A TGF-β1 aktiválva a TGF-β receptort, ami a NF-κB-n keresztül kiváltja a ZEB1 és a ZEB2 transzkripciós faktorokat (72), valamint a mesenchymális markerek (pl. vimentin) SMAD-Sp1 által irányított felülszabályozását. Ezek a tények arra utalnak, hogy a Hedgehog szignál indirekt módon idézi elő az EMT-t, számos szabályozó molekula felülszabályozásával a Notch és TGF-β szignál kaszkádon keresztül (73). A 20-22 bázispár hosszúságú nem kódoló RNS szakaszok, a mikroRNS-ek (miRNS) poszt-transzkripciós szinten szabályozzák a génexpressziót. Egyes kutatások olyan miRNS csoportokat azonosítottak, amelyek mennyisége szignifikáns változáson ment keresztül a TGF-β indukálta EMT-ben. Ez arra utal, hogy ezeknek a miRNS-eknek szerepük van a folyamat szabályozásában (74). A miR-200 család az EMT gátálásában játszik szerepet, mivel gátolja a ZEB1/2 termelését, ami pedig az E-cadherin gén transzkripciójának gátlója (75). LIM 1863 vastagbél karcinóma sejtekben a miR-21 és a miR-31 túltermelődését mutatták ki az EMT folyamán (76). A miR-21 és a miR-31 túltermelése és gátlása nem csak a TGF-β-indukálta morfológiai változásokat befolyásolja, hanem a sejt mozgékonyságát és inváziós képességét is. Ugyancsak kimutatták, hogy a T-sejtes lymphoma és metasztázis gén 1 (TIAM1) direkt célpontja a miR-21-nek és a miR-31-nek, és hogy a TIAM1 gátlása fontos a vándorlást megelőző fázisban és az invázió során. Ezen eredmények alapján a miR-21 és a miR-31 az EMT pozitív szabályozójának tekinthető a vastagbélrákos sejtekben (76) (5. ábra).

DOI:10.14753/SE.2012.1746

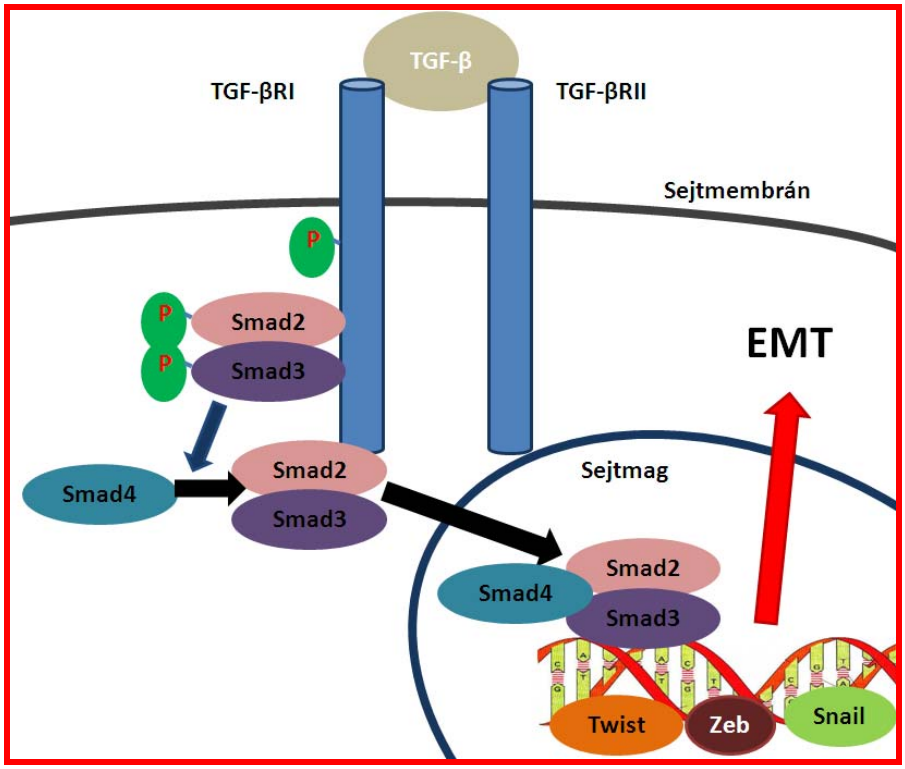


5. ábra. Az EMT és a MET szabályozása vastagbélben.

1.7.4. A TGF-β jelátviteli út

Az epitheliális - mesenchymális átalakulás legfőbb szabályozója a transzforming growth fector-β (TGF-β), azonban egyre több tanulmány szerint az átalakulási folyamatok szabályozásában szerepe van specifikus CpG szigetekben gazdag szakaszokat tartalmazó DNS láncoknak is (33). A TGF-β a TGF-β receptor I-hez (TGF-βRI) kapcsolódik, amely a kapcsolódás után a TGF-βRII-vel heterodimert képez, és kiváltja a Smad2 és Smad3 molekulák foszforilációját. Az aktivált Smad2 és Smad3 a Smad4-gyel heterokomplexet képez, és a sejtmagba vándorol, ahol különböző transzkripciós szabályozófaktorok, mint a Snail (SNAI1, SNAI2/Slug), a ZEB (ZEB1, ZEB2/SIP1), Twist aktiválásán keresztül EMT-t idéz elő (6. ábra) (77). A Smad2 a sejtmagban növeli a DNMT1 DNS metiltranszferáz DNS

kötő aktivitását, ami a hámhoz köthető gének epigenetikus elcsendesítését végzi (78). A Snail molekulák a Smad3-mal az E-cadherin, occludin és claudin gének promoter régiójában lévő E-box szekvenciákhoz kapcsolódva inaktiválják az adherens- (pl. E-cadherin) és tight kapcsolatokat (pl. occludinok és claudin) felépítő fehérjék expresszióját az EMT folyamata során (78).



6. ábra. Az epitheliális - mesenchymális átalakulás szabályozása a TGF-β/Smad2/Smad3 jelátviteli útvonalon keresztül. *A TGF-β I és II receptorok aktivációja a Smad2 és Smad3 foszforizációját okozza, amelyek a Smad4-hez kötődik. A Smad2/3/4 komplex a sejtmagba transzlokálódnak, és különböző szabályozófaktorok (Twist, Zeb, Snai1) aktiválásával elindítják az EMT-t.*

A sejt-sejt kapcsolóelemek felbomlása direkt módon növelheti az α-SMA expresszióját. Ebben a folyamatban a kapcsolatok felbontásával párhuzamossan, a Ca^{2+} beáramlása a Rho-

ROK jelátviteli útvonalon a myozin könnyű-lánc kináz (MLCK) foszforilációjával szabályozza a myocardin-kapcsolt transkripciós faktor (MRTF) magba történő transzlokációját és a szérum válasz (response) faktoron (SRF) keresztül központi szerepet tölthet be a hám-miofibroblaszt átalakulásban (79).

1.7.5. A Toll-like receptor 9 jelátviteli út

A közelmúltban számos tanulmány jelent meg, amelyek szerint az EMT fő szabályozója, a TGF-β mellett, egyes hipometilált CpG szigeteket tartalmazó DNS szakaszok ugyancsak fontos szabályozó szerepet töltenek be az átalakulásban. A hámsejtek és egyéb subepitheliális fibroblasztok, monocyták miofibroblaszt-szerű sejtekké alakulása Toll-like receptor 9 aktiváción keresztül is megvalósulhat (33,34). *In vivo* kísérletek szerint CpG szakaszok hatására a különböző sejtvonalak (pl. A549 humán alveoláris hám, CD14+ monocyták) fibrocytákra emlékeztető, orsó-alakú sejtekké alakultak, amelyekben α-SMA expressziót is kimutattak (33).

A Toll-like 9 receptorok intracellulárisan, az endoplazmatikus retikulumon helyezkednek el. Ezeket a receptorokat a sejtbe horizontális génátmenettel (géntranszferrel) bejutó, vezikulákba csomagolt, többnyire baktériumokból, vagy vírusokból származó DNS darabok aktiválhatják (80), tehát elsősorban az immunfolyamatokban van szerepük (81). Valószínűsíthető, hogy a TLR9 aktiválása a TGF-β termelés fokozódásával jár. Chow és mtsai szerint a TLR9 aktiváció a csontvelői eredetű makrofágokban a MyD88/IRAK4/TRAF6 jelátviteli úton az NF-κB aktiváción keresztül kiváltja a TGF-β fokozott expresszióját. A TGF-β, mint autokrin/parakrin faktor a Smad3 és Smad4 aktiválásán keresztül kiváltja a vérlemezke-eredetű növekedési faktor-B (PDGF-B) termelését, amely sejtproliferációt szabályozó molekulaként hat a sejtekre (82).

DOI:10.14753/SE.2012.1746

1.7.6. Az osteopontin szerepe a sejtátalakulás folyamatának szabályozásában

Az osteopontin (OPN) egy 44 kDa molekulatömegű, sziálsavban gazdag, kemokin jellegű fehérje. Az OPN számos biológiai funkciója ismert: részt vesz a csontépülési folyamatokban, az érképzésben, gyógyulási folyamatokban, de szerepet játszik néhány betegség kialakulásában is (pl. myocardiális necrosis, autoimmun betegségek, vesefibrózis és vesekőképződés) (83).

Az EMT folyamatában betöltött szerepe azonban nem teljesen ismert. A genetikailag módosított OPN-null egerek szemlencse-hámjában a sérüléssel kiváltott EMT nem, vagy csak nagyon kis mértékben megy végbe. OPN hiányában a TGF-β aktiváció hatására normális körülmények között végbemenő Smad2/3 foszforizációja elmarad, így a komplex nem vándorol a sejtmagba, és nem indulnak meg az EMT folyamatához szükséges átírási folyamatok (84).

Az EMT-n kívül az OPN részt vehet egyéb, myofibroblast fenotípusú sejtek kialakulásával járó folyamatokban. Az OPN nem okoz *per se* fibroblaszt-miofibroblaszt átalakulást, de a jelenléte elengedhetetlen a TGF-β indukálta fenotípus változáshoz. OPN knockout egérben a TGF-β hatására nem indul meg a miofibroblasztos átalakulásra jellemző fehérjék (pl. α-SMA, extradomain-A/ED-A, connective tissue growth factor/CTGF) termelődése (32). A molekula RGD-függő és független (SVVYGLR) adhéziós szakaszokat tartalmaz, amelyeken keresztül különböző integrin receptorokhoz kapcsolódhatnak (85).

1.8. A colorectalis adenoma - carcinoma szekvencia

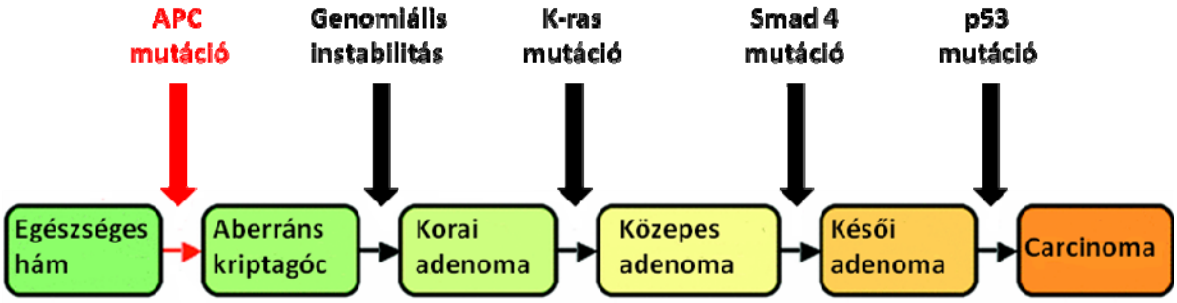
A sporadikus vastagbélrák kialakulásával kapcsolatos legfontosabb elmélet az adenoma - dysplasia - carcinoma szekvencia modell (86). Ennek alapja az, hogy a vastagbélrák egy jóindulatú előalakból, a dysplastikus elváltozásokat mutató adenomából fejlődik ki.

Szövettanilag megkülönböztetünk tubuláris-, villosus- és kevert (tubulovillosus) típusú adenomákat. Az adenomák malignus átalakulásra való hajlama függ a nagyságuktól (általánosságban, a 4 cm-nél nagyobb adenomák 40%-ában alakul ki rák) és szövettani szerkezetüktől (a villosus szerekezet növeli a malignus átalakulás veszélyét) (87). Az adenoma-carcinoma szekvencia azt a folyamatot jelenti, amely során az adenomából *in situ* carcinoma alakul ki. Ezt a folyamatot Vogelstein és mtsai írták le (7. ábra) (88). Az ép vastagbél nyálkahártya környezeti mutagének és az életkor előrehaladásával szaporodó promoter metiláció hatására hyperproliferatív nyálkahártyává alakul, amelyből, meghatározott sorrendben megjelenő mutációk hatására végül vastagbélrák alakul ki (88). Az egyik legkorábbi esemény az APC gén mutációja, amely a sporadikus vastagbél daganatok 75-80%-ában megtalálható. A mutáns APC gén terméke nem tudja megkötni a β-katenint, ami a sejtmagba jutva szabályozatlan, kóros TCF/LEF-függő transzkripció aktiválódást okoz. Az APC gén mutációján kívül szintén a colorectalis carcinogenezis korai eseménye a genom globális hipometilációja, amely számos gén aktivációját és fokozott expresszióját okozza.

Az enyhén dysplastikus adenomából 1-2 cm-es tubulovillózus, közepes dyspláziát mutató adenoma alakul ki. E folyamatban fontos szerepet tulajdonítanak a K-ras onkogén mutációinak, amelyek fokozzák a géntermék aktivitását és a vastagbélrákok mintegy 40-50%-ában fordulnak elő (89,90). Az enyhén dysplastikus adenomából 2 cm-nél nagyobb villosus, súlyosan dysplasztikus adenoma keletkezik, amelynek létrejöttében a DCC (deleted in colon carcinoma) tumor szuppresszor gén deléciója játszik szerepet. Normális esetben a DCC az apoptózis indukciójában és a sejproliferáció gátlásában vesz részt (86,91). Szintén ebben a kromoszóma régióban helyezkedik el további két TGF-β jelátviteli úthoz kapcsolódó tumor szuppresszor gén, a SMAD2 és a SMAD4/DPC4, amelyek funkció kiesését vastagbélrákos sejtvonalakban is leírták (92,93). A súlyosan dysplasztikus adenomából a carcinoma kialakulását elsősorban a p53 tumor szuppresszor mutációja és inaktivációja segíti elő, ami humán daganatokban a leggyakrabban károsodott gén (94). A p53 mutációja 70%-os gyakorisággal következik be az adenoma - carcinoma szekvenciában, közvetlenül az invazív növekedési fázis előtt. A p53 gén terméke egy DNS-kötő fehérje, amely transzkripciós faktorként számos sejtfunkciót szabályoz (pl. apoptózist aktiváló géneket, túlélési szignálokat, a sejtciklus megállítását, az angiogenezist és a daganatos invázió folyamatát) (95, 96, 97). A p53 fehérjét a „genom őrének" is nevezik, mivel a DNS károsodása esetén a sejtciklus G1 és

DOI:10.14753/SE.2012.1746

G2 ellenőrzési pont fehérjéjeként blokkolja a sejtproliferációt, és aktiválja a DNS-javító mechanizmusokat, illetve, ha a javítás nem megfelelő, a programozott sejthalált (98).



7. ábra. A colorectalis adenoma - carcinoma szekvencia (Fearon és Vogelstein (88) alapján).

DOI:10.14753/SE.2012.1746

2.0. CÉLKITŰZÉSEK

Vizsgálataim során a vastagbél nyálkahártya hámrétegében végbemenő sejt fenotípus és egyes, a vastagbélrák kialakulásában részt vevő fehérjék expressziós változásait figyeltem meg.

Célkitűzéseimet az alábbi négy pontban foglaltam össze:

1. A csontvelői eredetű sejtek a vastagbél hámregenerációs folyamataiban betöltött szerepének vizsgálata.
2. A csontvelői eredetű őssejtek korai, stromális elköteleződésének kimutatása CDX2 hámmarker és Musashi-1 őssejtmarker segítségével.
3. A hámrétegben végbemenő sejtátalakulási folyamatok arányának meghatározosa α-simaizom aktin és cytokeratin segítségével a vastagbél adenoma-carcinoma szekvencia során.
4. A sejtátalakulási folyamatokat befolyásoló fehérjék (TGF-βRII, TLR9 és OPN) expressziójának változásának vizsgálata az adenoma-carcinoma szekvencia során.

DOI:10.14753/SE.2012.1746

3.0. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. A csontvelői eredetű sejtek kimutatása férfi csontvelővel transzplantált nőbetegekben

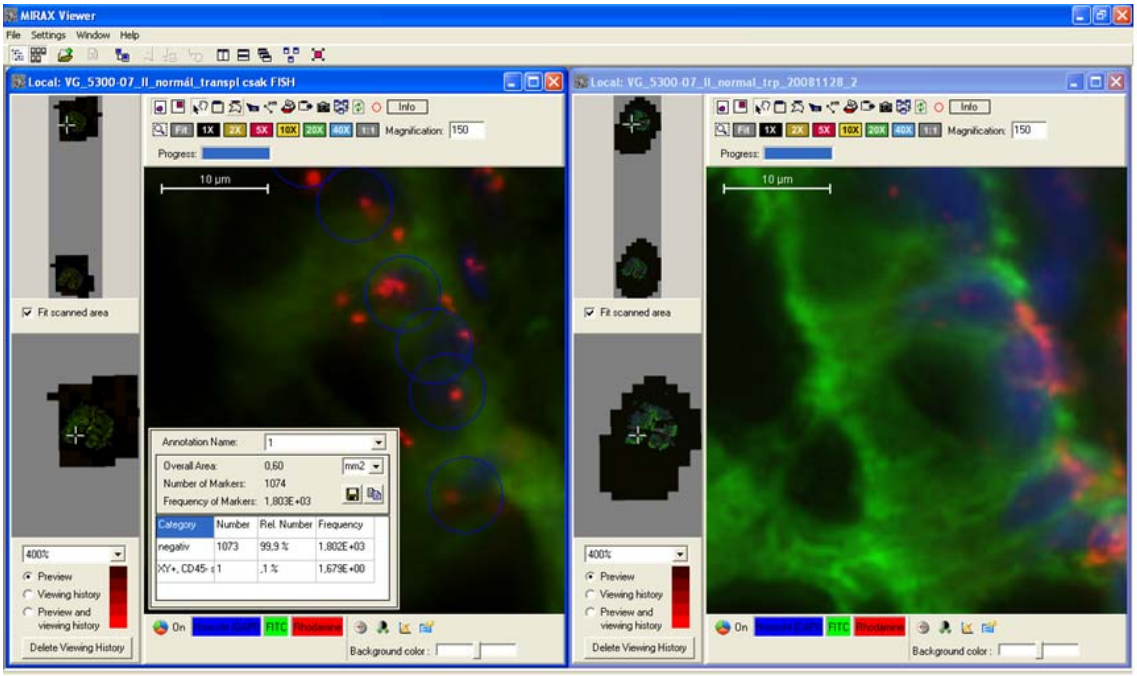
Férfi csontvelővel átültetett nők vastagbéltükrözése során a szigmabélből és a végbélből származó egészséges (n=5) és aspecifikus gyulladást mutató (n=5) biopsziás mintákat használtunk fel. A betegek életkora 34-52 év közé esett. A csontvelő-transzplantációk óta eltelt idő 1 és 11 év között változott, javallatukat akut myeloid leukémia (AML), akut lymphoid leukémia (ALL), krónikus myeloid leukémia (CML), illetve non-Hodgkin lymphoma (NHL) képezte.

Aspecifikus colitis esetében az IBD-re specifikus szövettani eltérések hiányoznak a colitises mintából: a mirigyek szűkek, egyenes lefutásúak, kriptatorzulás nem látható. A gyulladás elsősorban a nyálkahártya luminális 1/3-át érinti. Az aspecifikus colitis nem sorolható be az idült, idiopathiás gyulladásos bélbetegségek közé, ahová a colitis ulcerosa, a Crohn-colitis és az indeterminált colitis is tartozik. Egyéb colitisektől (pl. mikroszkópos colitis, ischaemiás colitis) is eltérő entitás. Nem specifikus gyulladásos kontrollként alkalmaztuk ezeket a mintákat.

A szövettani vizsgálat során a formalinban fixált, paraffinba ágyazott mintákból 4 μm vastagságú metszeteket készítettünk. Deparaffinálást és rehidrálást követően TRIS-EDTA pufferes (pH 9,0) antigénfeltárás következett (mikrohullámú antigénfeltárás, 10 perc, 900 W teljesítmény, majd 40 perc, 300 W teljesítmény). Ezután *fluoreszcens in situ hibridizációs* (FISH) jelölést végeztünk az X- és Y-kromoszómák centromerájára specifikus alfa-szatellita próbakeverékkel (SpectrumOrange, illetve SpectrumGreen jelölés; Vysis, Downers Grove, USA). A denaturációt 85 Cº-on 10 percig, a hibridizációt 37 Cº-on egy éjszakán át végeztük. A mintákat a sejtmagokat megjelölő DAPI-t tartalmazó fedőanyaggal (Vectashield mounting medium with DAPI, Vector Laboratories, Burlingame, USA) fedtük le. Ezután a metszetet digitálisan archiváltuk (Mirax Scan, szoftververzió 1.11.25.0), majd ismételten eltávolítottuk a fedőlemezt és mosást követően 1%-os borjú szérum albumin (BSA) oldat segítségével blokkoltuk a nem-specifikus kötőhelyeket. Ezután monoklonális egér anti-cytokeratin (1:1, Miltényi Biotec, Bergish Gladbach, Németország) és anti-CD45 (clone:2 B11+PD 7/26,

DOI:10.14753/SE.2012.1746

1:100, Leukocyta Common Antigen, M0701, Dako, Glostrup, Dánia) elsődleges ellenanyagokkal inkubáltuk a mintákat, szobahőmérsékleten, 60 percig. A CD45-jelölés esetében másodlagos jelölőanyagként Alexa Fluor 546-ot (1:200, Invitrogen, Carlsbad, USA) alkalmaztunk. További mosást követően magfestést végeztünk (Hoechst No. 33258, 1:1000, Sigma, St. Louis, USA), majd újra lefedtük a tárgylemezeket. A tárgylemezeket digitálisan archiváltuk (Mirax Scan, szoftververzió 1.11.25.0). Ennek eredményeképpen egy tárgylemezről két, különböző információt hordozó digitális tárgylemez készült. A metszetek kiértékelését párhuzamosan, digitális mikroszkóp (Mirax Viewer v.1,11,43,0) segítségével végeztük (8. ábra). A vizsgált személyek előzetes írásbeli felvilágosítást követően beleegyeztek a vizsgálatba, amelyet a 69/2008-as számon engedélyezett a Semmelweis Egyetem Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága.



8. ábra. Az XY-FISH (bal oldal) és az ezután végzett CD45/CK kettős fluoreszcens festés (jobb oldal) kiértékelése Mirax Viewer digitális mikroszkóppal. *A program lehetővé teszi a két virtuális tárgylemez egyszerre történő mozgatását, így az Y-FISH+, CD45- csontvelői eredetű sejtek könnyen elkülöníthetők a CD45+ intraepitheliális lymphocytáktól. A sejtek megjelölését (a kép baloldali fele, kék körök) és pontos leszámolását a programba épített Marker Counter nevű modul tette lehetővé, amely egyben az egyes sejtcsoportok egymáshoz viszonyított arányát is automatikusan kiszámolta (bal oldali tárgymező, bal alsó fele).*

3.2. A strómába vándorló (Musashi-1+) őssejtek hám-irányú elköteleződésének kimutatása CDX2 hámmarker segítségével

A strómába vándorló őssejtek hám-irányú elköteleződésének kimutatása esetében a minták festésre való előkészítése az előző fejezetben leírt módon történt. Az őssejt tulajdonságok kimutatására Musashi-1 (EP1302, Abcam, Cambridge, USA; 1:100) őssejtmarkert és ezzel párhuzamosan CDX2 (Mouse anti-CDX2 antibody, clone: AMT28, Diagnostic Biosystems, San Francisco, USA; 1:100) hámmarkert alkalmaztunk, amelyekhez Alexa Fluor 546 (1:200) és Alexa Fluor 488 (Invitrogen; 1:100) másodlagos ellenanyagokat kötöttünk. A tárgylemezeket digitálisan archiváltuk (Mirax Scan szoftververzió 1.11.25.0). A metszetek kiértékelését digitális mikroszkóp (Mirax Viewer v.1,11,43,0) segítségével végeztük.
Néhány esetben a CDX2 pozitivitást hagyományos, immunperoxidáz módszerrel is kimutattuk. Ilyenkor az antigén feltárás után a peroxidáz gátlására 0.5%-os hidrogén-peroxid és metanol keverékét, jelkonverzió céljából diaminobenzidin-hidrogén-peroxidáz-kromogén-szubsztrát rendszert (Cytomation Liquid DAB + Substrate Chromogen System, K3468, Dako, Glostrup, Dánia) használtunk.

3.3. Intraepitheliális α-SMA pozitív sejtek kimutatása

Kísérletünkhöz rutin vastagbéltükrözés során nyert, szövettanilag ép (n=8), adenoma (n=8) és vastagbélrákos (n=8) biopsziás mintákat használtunk fel, amelyekből 1 mm átmérőjű szöveti microarray (tissue microarrays/TMAs) blokkot készítettünk. A szövettani metszetek jól orientáltak voltak. A formalinban fixált, paraffinba ágyazott mintákból 4 µm vastagságú szeleteket vágtunk. A deparaffináció és rehidráció után az antigén feltáráshoz TRIS-EDTA puffert (pH 9.0) és mikrohullámú sütőt (900W teljesítménnyel 10 percig, majd 340 W teljesítménnyel 40 percig) használtunk. Ezután a mintákat anti-Ki-67 (RM 9106-SO, clone: sp6, Lab-Vision, Alexa Fluor 546-al jelölve) monoklonális és FITC jelölt anti-cytokeratin (CK3-6H5) (Miltényi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany, 1:1 higítás) polyklonális ellenanyagokkal szobahőmérsékleten 60 percig inkubáltuk. A kettős fluoreszcens jelöléstől függően az anti-α-SMA elsődleges ellenanyagot CK festődés esetén (Dako, California, USA

1:1higítás) Alexa Fluor 546-al, vagy Ki-67 festődés esetén AMCA (AMCA-conjugated anti-egér IgG H+L, 715-155-15, Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Growe, Philadelphia, USA) másodlagos ellenanyaggal kezeltük. Egyes esetekben a mintákat nagy teljesítményű konfokális scanning lézer mikroszkóppal (BIO-RAD MRC 1024, Bio-Rad Laboratories, Philadelphia, USA) vizsgáltuk. A tárgylemezeket digitálisan archiváltuk (Pannoramic Scan instrument, szoftver verzió: 1.11.25.0, 3DHistech, Budapest, Magyarország), a kiértékeléshez Pannoramic Viewer digitális mikroszkópot (v:1,11,43,0, 3DHistech, Budapest, Magyarország) használtunk. Az elemzés során 1000-1200 hámsejtet számoltunk le (a minta nagyságától függően) a programba épített jelző/számoló modul segítségével (Marker Counter). A statisztikai elemzéshez egy utas ANOVA tesztet használtunk.

3.4. Az E-cadherin expresszió változásának kimutatása immunhisztokémiai módszerrel

Az E-cadherin immunhisztokémiai kimutatása esetén a TMA mintákon (normális n=8, adenoma n=8, vastagbélrák n=8) az endogén peroxidázt 0.5% hidrogén-peroxid és metanol keverékével blokkoltuk (30 perc, szobahőmérséklet), majd antigén feltárást végeztük (TRIS-EDTA puffer, pH 9) mikrohullámú sütőben (900 W teljesítményen 10 percig, majd 370 W teljesítményen 40 percig). A nem specifikus kötőhelyek blokkolására 1%-os BSA-t használtunk. Az E-cadherin immunhisztokémiai kimutatásához monoklonális ellenanyagot (anti-E-cadherin, ECH-6, 1:1 higítás, 60 perc, Histopathology, Pécs, Magyaroszág) használtunk, majd Histols Detection System (Rabbit and Mouse, Histopathology, Pécs, Magyaroszág) és diaminobenzidin-hidrogén-peroxidáz-kromogén-szubsztrát rendszerrel (Cytomation Liquid DAB + Substrate Chromogen System, K3468, Dako, Glostrup, Dánia) hajtottuk végre a jelkonverziót. A mintákat digitális mikroszkóppal értékeltük ki, az 1. táblázatban megadott pontozási (score-) rendszer szerint.

	+2 score érték	+1 score érték	0 score érték	-1 score érték
E-cadherin	erős membrán és erős citoplazma festődés	erős membrán, közepesen erős citoplazma festődés	közepesen erős membrán, gyenge citoplazma festődés	hiányzó vagy gyenge membrán festődés, citoplazma festődés nélkül

1. táblázat. Az E-cadherin immunhisztokémiai kiértékelésének kritériumai.

3.5. TGF-β receptor II kimutatása immunhisztokémia segítségével

A TMA mintákon (normális n=6, adenoma n=6, vastagbélrák n=6) endogén-peroxidáz blokkolást (0.5% hidrogén-peroxid és metanol keveréke, 30 perc, szobahőmérséklet) és antigén feltárást (TRIS-EDTA puffer, pH 9, mikrohullámú sütőben melegítve 900 W teljesítményen 10 percen keresztül, majd 370 W teljesítménnyel 40 percig) végeztünk. A nem specifikus kötőhelyek blokkolása 1%-os BSA oldattal történt. A TGF-β receptor II immunhisztokémiai kimutatását anti-TGF-BRII polyklonális ellenanyag (Rb-10345-PO, 1:600 higitás, 60 perc, Lab Vision, Fremont, USA) segítségével, nedves kamrában végeztük. Másodlagos ellenanyagként és jelkonverzióra EnVision + HRP (Labeled Polymer Anti-Rabbit, K 4003, Dako, Glostrup, Dánia) és diaminobenzidin - hidrogén-peroxidáz - kromogén - szubsztrát rendszert (Cytomation Liquid DAB + Substrate Chromogen System, K3468, Dako, Glostrup, Dánia) használtunk. A tárgylemezeket digitálisan archiváltuk (Pannoramic Scan instrument, szoftver verzió: 1.11.25.0, 3DHistech, Budapest, Magyarország), a kiértékeléshez Pannoramic Viewer digitális mikroszkópot (v:1,11,43,0, 3DHistech, Budapest, Magyarország) használtunk.

DOI:10.14753/SE.2012.1746

3.6. A TGF- β receptor II mRNS szintű kimutatása microarray chiptechnika segítségével

3.6.1. Mintagyűjtés

Vizsgálatainkhoz műtétileg eltávolított, a vastagbél bal oldaláról származó (sigma, rectum), DUKES B stádiumú, közepesen differenciált adenocarcinoma (n=6), low grade adenoma (n=6), valamint a tumor melletti, legtávolabb rendelkezésre álló makroszkópikusan ép (n=6) mintákat gyűjtöttünk. Az eltávolított szövetmintákat tíz percen belül folyékony nitrogénbe helyeztük, majd a felhasználásig -80 °C-on tároltuk. (A rezekátumokról patológiai vélemény is készült, amelyek alapján a mintákat csoportosítottuk). A mintagyűjtés és felhasználás a *TUKEB:2005/037* számú engedély alapján és a betegek beleegyezésével történt.

3.6.2. Lézer mikrodisszekció

A szövetmintákból kriosztátban -20 ^{o}C-on 6 µm vastagságú metszetek készítettünk, melyeket a lézer mikrodisszekcióhoz (LCM) használt, 1 µm polyetilén membrán bevonattal rendelkező tárgylemezre (MembraneSlide 1.0 PEN, Carl Zeiss, Jéna, Németország) kerültek, amelyeket felhasználásig -80 °C-on tároltunk. A metszetek festése etanolos hígítási sorban való fixálás után krezil-kék-acetát alkoholos oldatában történt. Száradás után a vastagbélszövetben található hámsejteket lézer mikrodisszektor (PALM Robot-MicroBeam, Bernried, Németország) segítségével izoláltuk, majd a körbevágott sejtcsoportokat egy nagy impulzusú lövéssel a tárgylemez felett elhelyezett centrifugacső (AdhesiveCap 500 opaque, Carl Zeiss) adhezív kupakjába katapultáltuk. Kupakonként hozzávetőlegesen 1000 sejtet gyűjtöttünk, amelyből 5 biológiai replikátumot készítettünk. A mintákat az izolálási lépésig -20°C-on tároltuk.

DOI:10.14753/SE.2012.1746

3.6.3. RNS izolálás

A mikrodisszekcióval összegyűjtött sejtekből Qiagen RNeasy Micro kittel (Qiagen, Hilden, Németország) a gyártói utasítások szerint teljes RNS-t izoláltunk. A sejtekhez 300 µl RLT puffert adtunk, majd 30 másodperces vortexelés után 300 µl 70%-os alkoholt pipettáztunk a homogenizált lizátumhoz. Az oldatot RNeasy MinElute oszlopra töltöttük, és 15 másodpercig 8 000 g-vel centrifugáltuk. Következő lépésben 350 µl RW1 puffert töltöttünk az oszlopra, majd ismét 15 másodpercig centrifugáltunk 8 000 g-vel. Ezután 80 µl DNase I inkubációs mixet pipettáztunk az oszlop membránjára, és 15 percig inkubáltunk szobahőmérsékleten. Majd újra 350 µl RW1 puffert töltöttünk az oszlopra, amelyet ismét 15 másodperces centrifugálás követett 8 000 g-vel. Következő lépésben 500 µl RPE puffert töltöttünk az oszlopra. 15 másodperces centrifugálás után 500 µl 80%-os alkoholt pipettáztunk az oszlopra, majd 5 percig 25 000 g-vel centrifugáltunk. Végül 14 µl RNase-mentes vízet töltöttünk az oszlop közepére, majd 1 percig, 25 000 g-n centrifugáltunk, és az eluált RNS-t 1,5 ml-es steril gyűjtőcsőbe fogtuk fel. Az izolált RNS-t további felhasználásig -80 °C-on tároltuk.

3.6.4. RNS minőségellenőrzés

Az izolált RNS integritásának vizsgálatát automatizált mikrokapilláris elektroforézis (Agilent BioAnalyzer 2100, Agilent, Palo Alto, Kalifornia, USA) rendszer segítségével végeztük a hozzátartozó RNA 6000 Pico LabChips kit (Agilent) felhasználásával. A minták intaktságát a 18S és 28S riboszomális RNS csúcsok aránya alapján a készülékhez tartozó szoftver (2100 Expert, Agilent) által megállapított RIN (RNA Integrity Number, 1-10 terjedő skála) értékkel jellemezhetjük. A microarray vizsgálatokhoz a 7-es vagy annál nagyobb RIN értékkel rendelkező mintákat vontuk be, amelyekből a teljes izolátumot, azaz 5-50 ng totál RNS-t használtunk fel.

DOI:10.14753/SE.2012.1746

3.6.5. mRNS expresszió microarray elemzés

Amplifikáció és jelölés: A lézer mikrodisszektált mintákban jelenlévő mRNS kis mennyiségéből adódóan a minták sokszorosításához kétkörös in vitro transzkripciót (IVT) (Affymetrix, Santa Clara, Kalifornia, USA) használtunk. Az amplifikáció során első lépésben az RNS templátról egy 5' végén T7 bakteriofág promóter szekvenciát is tartalmazó oligo dT primer használatával cDNS-t szintetizáltunk. A reverz transzkripció során az oligo dT az mRNS polyA farkához kapcsolódik, majd a reakció termékeként egy olyan kettősszálú hibrid molekula keletkezik, amelynek egyik szála az újonnan szintetizált cDNS, a másik pedig az eredeti géntermék. Ezután RNaseH enzim segítségével az eredeti mRNS templátot eltávolítottuk, majd megszintetizáltattuk a cDNS molekula komplementer szálát, amelyről az előzőleg beépített T7 promóter szakaszt felhasználva in vitro transzkripciót kezdhettünk. Így az első kör végére cRNS formában a kiindulási mRNS minta torzítatlan, sokszorosított komplementer szekvenciáját kaptuk, amelyről a második körben random hexamerek felhasználásával cDNS-t készítettünk. Ezt a beépített T7 promóterről kezdett reverz transzkripcióval ismételten kettős szálú DNS-re egészítettük ki. Ezután következett a második IVT kör, amely során beépültek a biotinnal jelölt nukleotidok. Az amplifikálási és jelölési lépések után tehát az eredeti mRNS templáttal komplementer, felsokszorozott és biotinnal jelölt cRNS templát állt rendelkezésünkre.

A jelölt cRNS mintákat magas hőmérsékleten, tömény sóoldatban fragmentáltuk, majd 16 órán keresztül 45°C-on az Affymetrix U133 Plus2.0 típusú teljes genomszintű génexpressziós chipre hibridizáltattuk. Ekkor a mintánkból származó jelölt molekulák a chip felszínére rögzített, ismert pozícióban lévő komplementer szekvenciákhoz kötődtek.

A chipeket Fluidics Station 450 berendezéssel, az EukGE_Ws_2v5 mosási protokollt követve mostuk, majd 10μg/ml streptavidin-phicoerythrin (Molecular Probes) felhasználásával antitest amplifikációs festési módszerrel festettük. A fluoreszcens jeleket Affymetrix Gene Scan 3000 készülék segítségével olvastuk le, amely során a chip felszínéről 570 nm-en való gerjesztés után a detektor 1 μm-es felbontású képet szkennelt. Végül a szoftver egy cella fájlt (CEL file) generált, amelyet bioinformatikai módszerekkel elemeztünk tovább.

3.7. A Toll-like receptor 9 kimutatása immunhisztokémia segítségével

Az endogén-peroxidáz blokkolása (0.5%-os hidrogén peroxid és metanol keveréke, 30 perc, szobahőmérésklet) és az antigén feltárás (TRIS-EDTA puffer, pH 9, mikrohullámú sütőben melegítve 900 W teljesítményen 10 percen keresztül, majd 370 W teljesítménnyel 40 percig) után a TMA minták (normális n=8, adenoma n=8, vastagbélrák n=8) nem specifikus kötőhelyeinek blokkolását 1%-os BSA oldattal végeztük el. A Toll-like receptor 9 immunhisztokémiai kimutatását anti-TLR9 poliklonális ellenanyag (ab85860, 1:800 hígítás, 60 perc, Abcam, Cambridge, USA) segítségével, nedves kamrában végeztem. Másodlagos ellenanyagként és jelkonverzió céljára EnVision + HRP (Labeled Polymer Anti-Rabbit, K 4003, Dako, Glostrup, Dánia) és diaminobenzidin-hidrogén-peroxidáz-kromogén-szubsztrát rendszert (Cytomation Liquid DAB + Substrate Chromogen System, K3468, Dako, Glostrup, Dánia) alkalmaztunk. A tárgylemezeket digitálisan archiváltuk (Pannoramic Scan instrument, szoftver verzió: 1.11.25.0, 3DHistech, Budapest, Magyarország), a kiértékeléshez Pannoramic Viewer digitalis mikroszkópot (v:1,11,43,0, 3DHistech, Budapest, Magyarország) használtunk.

3.8. Az osteopontin immunhisztokémiai kimutatása

A TMA mintákon (normális n=13, adenoma n=13, vastagbélrák n=13) endogén-peroxidáz blokkolást (0.5%-os hidrogén-peroxid és metanol keveréke, 30 perc, szobahőmérséklet) és antigén feltárást (Target Retrieval Solution, S1699, Dako, pH 6 puffer, mikrohullámú sütőben melegítve 900 W teljesítményen 10 percen keresztül, majd 370 W teljesítménnyel 40 percig) végeztünk. A nem specifikus kötőhelyek blokkolása 1%-os BSA oldatot használtunk. Az OPN immunhisztokémiai kimutatását anti-OPN poliklonális ellenanyag (AB1870, 1:200 hígítás, 60 perc, Chemicon) segítségével, nedves kamrában végeztük. Másodlagos ellenanyagként és jelkonverzió céljára EnVision + HRP (Labeled Polymer Anti-Rabbit, K 4003, Dako, Glostrup, Dánia) és diaminobenzidin-hidrogén-peroxidáz-kromogén-szubsztrát rendszert (Cytomation Liquid DAB + Substrate Chromogen System, K3468, Dako, Glostrup,

Dánia) alkalmaztunk. A tárgylemezeket digitálisan archiváltuk (Pannoramic Scan instrument, szoftver verzió: 1.11.25.0, 3DHistech, Budapest, Magyarország), a kiértékeléshez Pannoramic Viewer digitális mikroszkópot (v:1,11,43,0, 3DHistech, Budapest, Magyarország) használtunk. A kiértékelés során használt pontozási rendszert a 2. táblázatban foglaltuk össze.

	+2 score érték	+1 score érték	0 score érték
Osteopontin	erős, diffúz, citoplazmatikus immunreakció	közepesen erős, diffúz, citoplazmatikus immunreakció	gyenge, diffúz citoplazmatikus immunreakció

2. táblázat. Az osteopontin immunhisztokémia kiértékelésének kritériumai

3.9. Alkalmazott statisztikai módszerek

3.9.1. Génexpressziós microarray esetében alkalmazott statisztikai módszerek

A microarray adatok beolvasásához és elemzéséhez R.10.0. programozási nyelvet alkalmaztuk (99). Napjainkban ez az egyik legszélesebb körben alkalmazott integrált szoftvercsomag, amelyet adatkezelési, számítási és grafikai környezetben használnak. A minőségi elemzést a Tumour Analysis Best Practices Working Group ajánlása alapján végeztük. Az intenzitás értékek beolvasását előfeldolgozás követte: GCRMA háttérkorrekciót, quantile normalizációt és median polish összegzést hajtottunk végre. Az előfeldolgozás célja a biológiai szempontból nem lényeges adatok eltávolítása, ezek általában olyan rendszerszintű variációk, amelyek befolyásolják az expressziós szintet. Számuk csökkentése, illetve eltávolítása kiemelkedően fontos, hiszen a különböző minták összehasonlítása csak ezt követően végezhető el. Az adatokat diagnosztikai csoportokba soroltuk (ép, adenoma és CRC) osztályozási kategória szerint soroltuk be. Meghatározásra került a paraméterek átlaga, mediánja és szórása. A kiválasztott, immunhisztokémiai módszerrel is vizsgált marker (TGF-βRII) mRNS szintű expresszióját egyutas ANOVA és Tukey's HSD poszt-teszt alkalmazásával hasonlítottuk össze a diagnosztikai csoportok között. A varianciaelemzés esetében normál eloszlású csoportok középértékeinek összevetése alapján döntjük el, hogy a különböző csoportok közötti eltérés szignifikáns-e vagy sem. Tukey's HSD módszer egy

olyan több lépcsős összehasonlító eljárás, amelyet az ANOVA módszerrel együttesen alkalmaznak annak érdekében, hogy megállapítsák, mely mintacsoportok középértékei mutatnak szignifikáns különbséget.

3.9.2. Immunhisztokémia vizsgálatok értékelésére alkalmazott statisztikai módszerek

Az immunhisztokémiai kiértékelés esetében egyutas ANOVA és Tukey's HSD poszt-teszt módszereket alkalmaztunk, hogy kimutathassuk a különböző diagnosztikai csoportok közötti szignifikáns eltéréseket. Az eredmények megjelenítéséhez boxplotokat és asszociációs plotokat alkalmaztunk. Boxplotok esetében a mediánt és a szórást is ábrázoljuk, míg az asszociációs ploton a standardizált értékeket osztályozzuk és hasonlítjuk össze. A minták immunhisztokémiai festődésének mértékét szemi-kvantitatív skála alkalmazásával jellemeztük (-pontozás) (lásd 1. és 2. táblázat), majd ezeket a -pontszámokat Pearson reziduumok segítségével értékeltük.

	XY-FISH, CD45/CK fehérje	**α-SMA/CK fehérje**	**E-cadherin fehérje**	**TGF-βRII fehérje**	**TGF-βRII mRNS**	**TLR9 fehérje**	**OPN fehérje**
N	**5**	**8**	**8**	**6**	**6**	**8**	**13**
Gy	**5**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**
Ad	**-**	**8**	**8**	**6**	**6**	**8**	**13**
CRC	**-**	**8**	**8**	**6**	**6**	**8**	**13**
Össz	**10**	**24**	**24**	**18**	**18**	**24**	**39**

3. táblázat. A kísérletekben felhasznált, az egyes szövettani állapotokhoz tartozó mintaszám. *A kromoszómák kimutatása XY-FISH-módszerrel, a fehérjék kimutatása immunhisztológiai módszerrel, az mRNS expresszió mérése microarray chiptechnika segítségével történt. Szövettani állapotok: N=normális, Gy: aspecifikus gyulladást mutató, Ad:adenoma, CRC: vastagbélrák, Össz: összes.*

DOI:10.14753/SE.2012.1746

4.0. EREDMÉNYEK

4.1. Csontvelői eredetű (Y-FISH+) sejtek kimutatása egészséges és enyhe gyulladást mutató területek kriptáinak hámrétegében

Szignifikánsan több ($p<0.01$) CD45-, csontvelői eredetű (XY-FISH+), intraepitheliális sejtet találtunk a lymphoid aggregátumokat körülvevő kriptákban. Ezeken a területeken a donor eredetű CD45- sejtek száma szignifikánsan nagyobb volt (1.0685±0.240%), összehasonlítva a normális (0.0178±0.017%) és a diffúz gyulladásos (0.043±0.005 %) területekkel (9. ábra). Nem találtunk szignifikáns különbséget az egészséges és a gyulladásos mintákban található lymphoid aggregátumokat körülvevő kripták CD45-, XY-FISH+ sejtszámában.

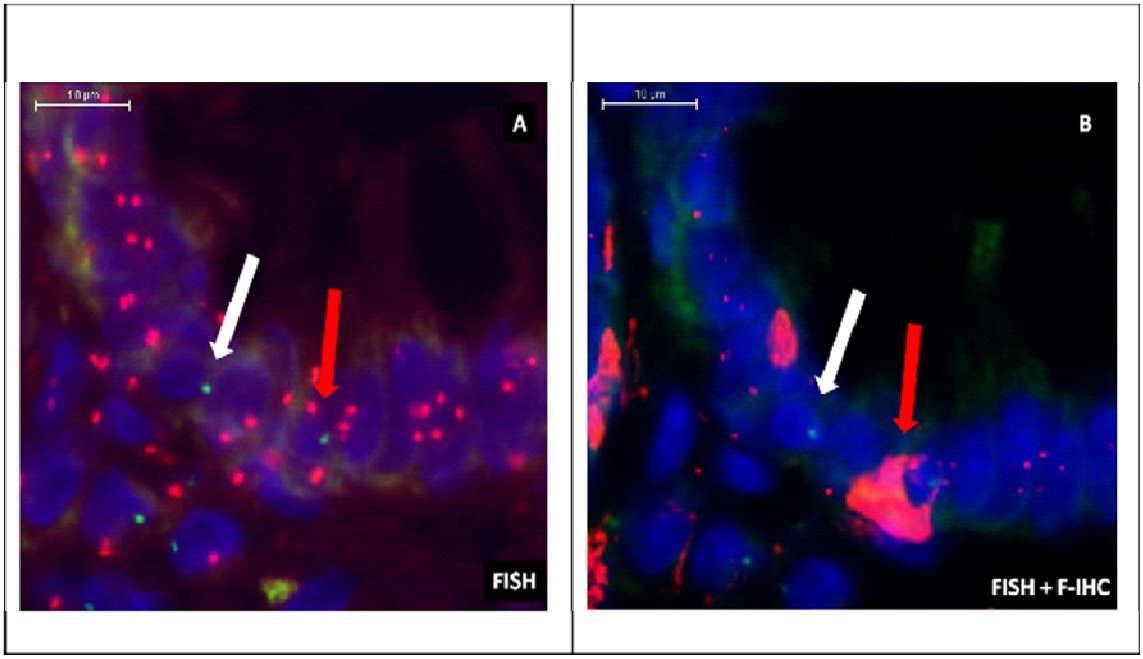
Kismértékű, de statisztikailag szignifikáns ($p<0.05$) különbséget találtunk az egészséges területek kriptáinak hámrétegében található CD45-, XY-FISH+ sejtek arányában (0.017±0.017%) és a gyulladásos sejtek által kialakított diffúz infiltrációt mutató területek XY-FISH+ sejtjeinek száma között (0.043±0.005%).

9. ábra. A CD45-, XY-FISH+ sejtek aránya az összes hámsejthez képest *(egészséges: 0.017±0.017%, diffúz gyulladást mutató területek: 0.043±0.005%, lymphoid aggregátumokat körülvevő kripták: 1.0685±0.240%).*

DOI:10.14753/SE.2012.1746

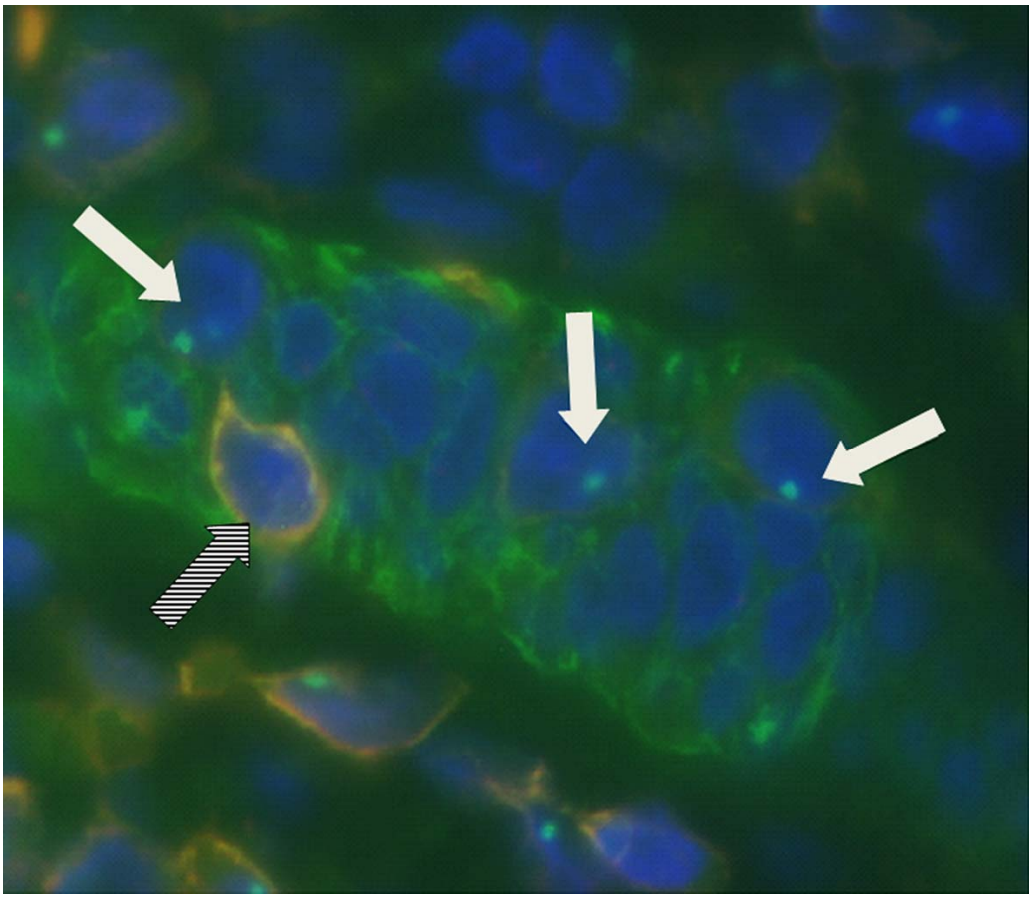
A csontvelői eredetű sejtek 3 különböző formáját figyeltük meg. A leggyakoribb esetben az XY-FISH+ sejtek CD45 lymphocyta marker pozitivitást mutattak (intraepitheliális lymphocyták). Más esetekben a hámban elhelyezkedő XY-FISH+ sejtek csak cytokeratin (CK) (10. ábra), illetve egyes esetekben a CD45 és CK kettős pozitivitást mutattak. Ezen sejtek CK pozitivitása nehezen volt megkülönböztethető a környező hámsejtek CK pozitivitásától. Néhány csontvelői eredetű (Y-FISH+), CD45- sejtet találtunk a XX-FISH+ mirigyek hámjában, tehát a csontvelői eredetű sejtek nem képeztek nagyméretű kolóniákat, illetve nagymértékű repopuláció sem volt megfigyelhető a vastagbélhámban.

Egy esetben találtunk egymás mellett három CD45-, XY-FISH+ sejtet, egy kripta proliferatív régiójában. Ezek a sejtek valószínűleg csontvelői őssejtek helyi szaporodásából származhattak, mert ilyen kis területre történő párhuzamos bevándorlásuk nem valószínű (11. ábra).



10. ábra. Csontvelői (donor) eredetű, Y-FISH+ hámba épülő sejt (fehér nyíl), ami CD45 negativitása alapján különíthető el az intraepitheliális lymphocytáktól (piros nyíl).

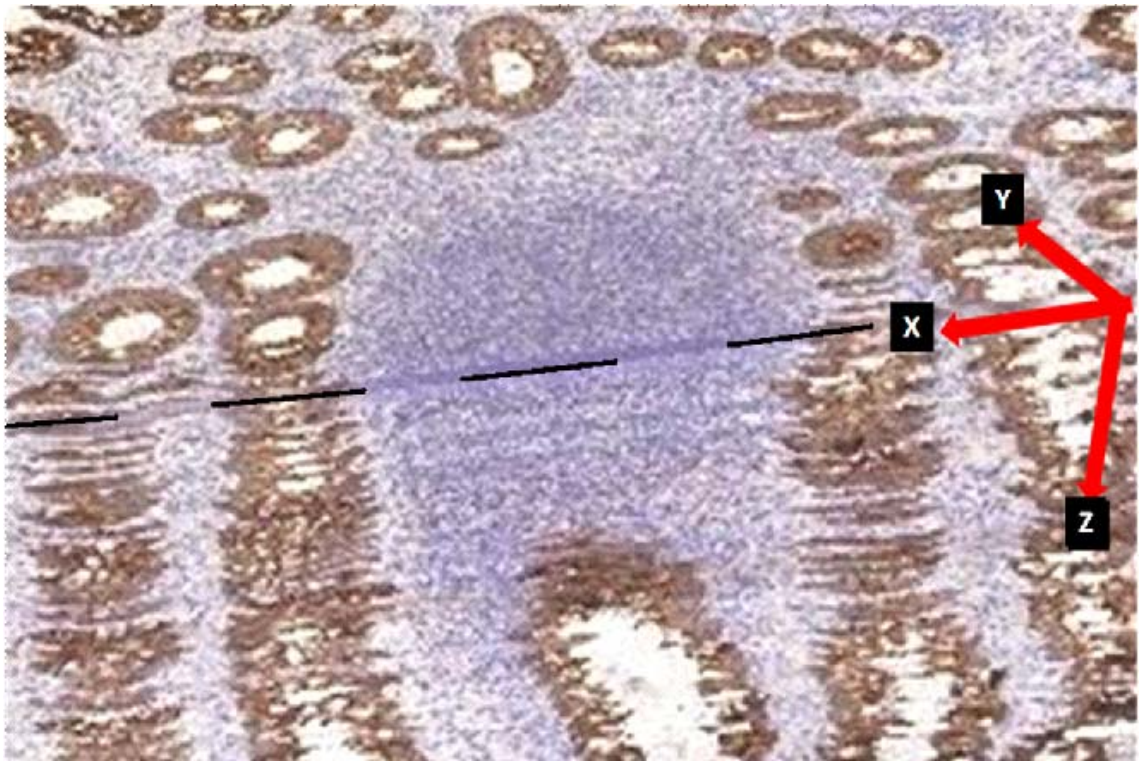
DOI:10.14753/SE.2012.1746



11. ábra. *Három, XY-FISH pozitvitást és CD45 negativitást mutató sejt (fehér nyilak) egy kripta proliferatív régiójában. A sejtek jól elkülöníthetőek a CD45 (piros fluorescens festés) pozitivitást mutató intraepitheliális lymphocytától (satírozott nyíl).*

Közvetlen kapcsolatot találtunk a mirigyek és a lymphoid aggregátumok között, amelyet digitális technikával három dimenzióban modelleztünk (12. ábra).

DOI:10.14753/SE.2012.1746

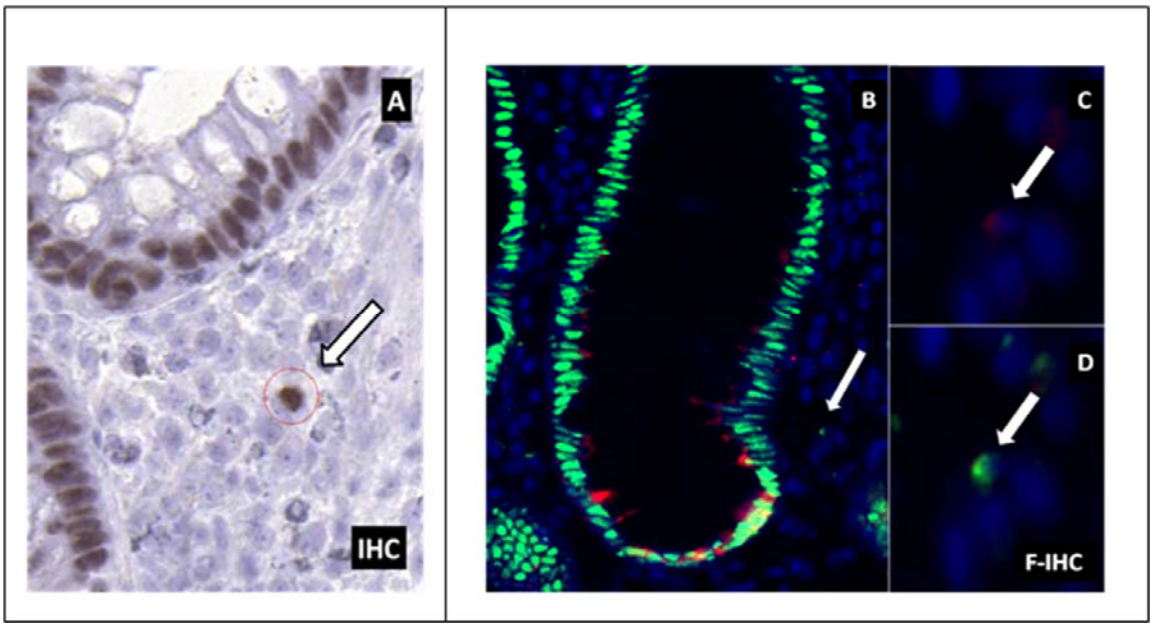


12. ábra. Szöveti 3D rekonstrukció, digitális mikroszkóp segítségével. *A képen jól látható a közvetlen kapcsolat a kripta és a lymphoid aggregátum között (barna: diffúz citoplazmatikus citokeratin festés, kék: hematoxilin sejtmagfestés) Z: a szaggatott vonaltól számított 50db digitális dia.*

4.2. Az őssejtek hámirányú elköteleződésének kimutatása CDX2 hámsejt marker és Musashi-1 őssejtmarker segítségével

A CDX2 immunreakció nagy specificitást mutatott a hámsejtek magjára. Néhány esetben azonban a strómában elszórtan, jól látható CDX2 magpozitivitást mutató sejteket találtunk, amelyek nem voltak kapcsolatban a kriptákkal (13/A. ábra). Ezek a CDX2 pozitív sejtek jól elkülöníthetők voltak a fagocitált hámsejtektől. Ez utóbbi esetben a CDX2 pozitivitás a citoplazmára lokalizálódott, míg a mag nem mutatott immunreakciót. Néhány strómában elhelyezkedő CDX2+ sejtben Musashi-1 immunreakciót is megfigyeltünk (13/B-, 13/C-, 13/D

ábra), de a Musashi-1 pozitivitás a strómális CDX2+ sejtek nagy részénél nem volt kimutatható. Más esetben a strómális sejtek csak Musashi-1 pozitivitást mutattak, citoplazmatikus és/vagy sejtmagi elhelyezkedéssel. Statisztikai számításokat az esetek alacsony száma miatt nem lehetett elvégezni.

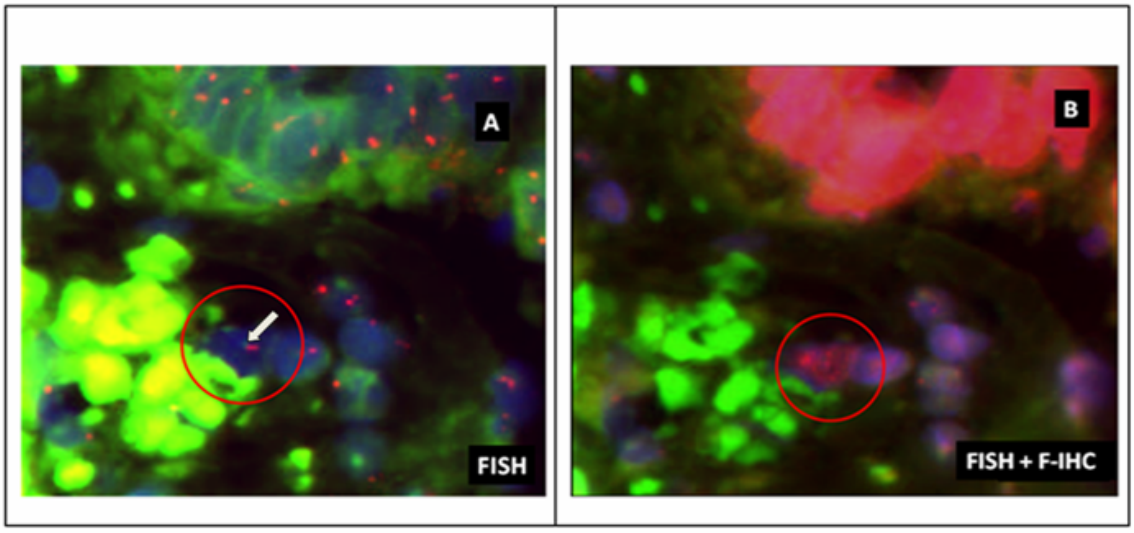


13. ábra. *A: A strómában vándorló, de már hámirányú elköteleződést mutató sejt (fénymikroszkópos kép). B: A strómális vándorlás során a sejt még hordozza az őssejt tulajdonságokat, mint a Musashi-1 fehérje expressziója (piros fluoreszcens festés/ C ábra), de már mutatja a hám irányú elköteleződés jeleit is (CDX2 expresszió, zöld fluoreszcens festés/ D ábra).*

4.3. A CDX2+ sejtek eredetének meghatározása

A CDX2+ sejtek nagy része recipiens eredetű volt (XX-FISH+), bár nagyon kis számban CDX2+, Y-FISH+ dupla pozitív sejteket is előfordultak a strómában (14. ábra). Ezen sejtek kis mennyisége miatt (1-4 darab/metszet) a statisztikai elemzést nem végeztük el.

DOI:10.14753/SE.2012.1746

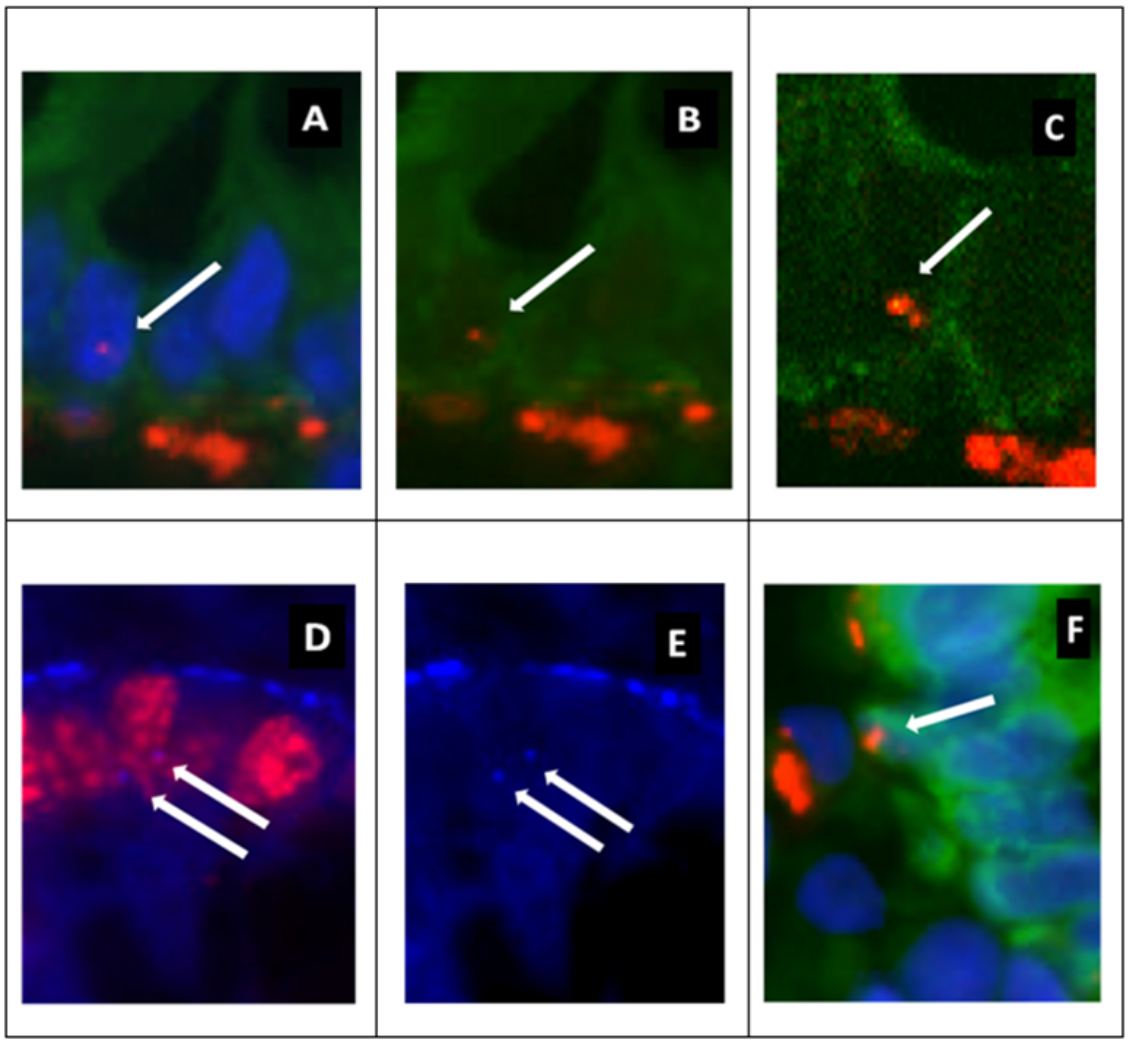


14. ábra. *A: Csontvelő eredetű, Y-FISH+ (zöld pont, fehér nyíllal jelölve) sejt, amely hámirányú elköteleződést mutatott (CDX2-piros fluoreszcens magfestés; B ábra).*

4.4. Az intraepitheliális α-SMA pozitív sejtek arányának változása az ACS során

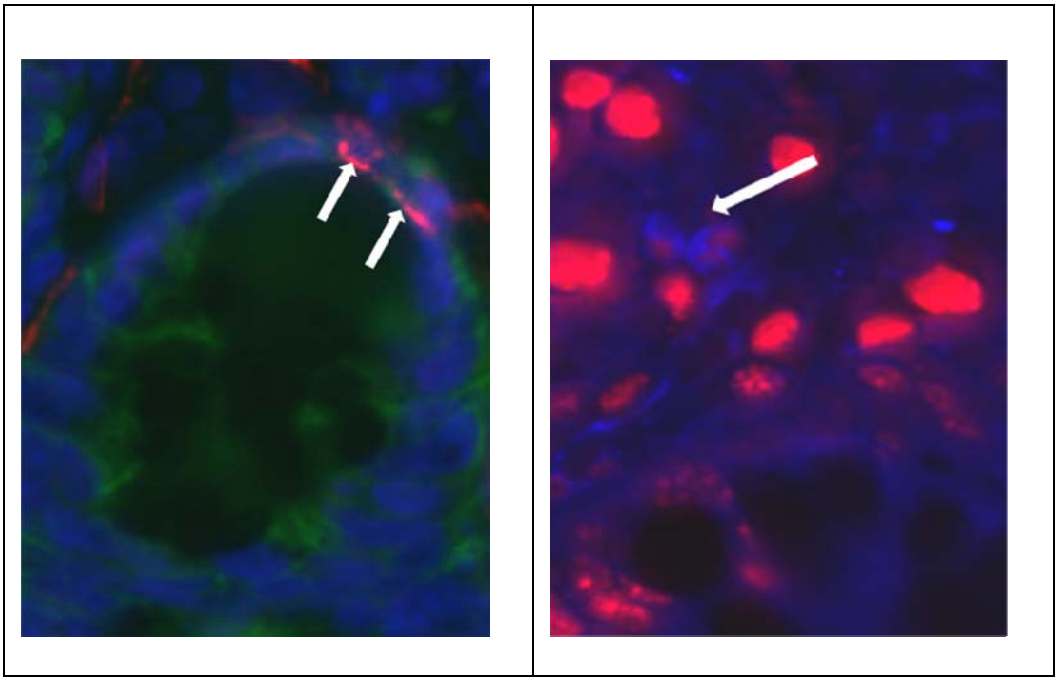
A miofibroblaszt-szerű dedifferentációt eltérő mértékben mutató α-SMA+/CK+ intraepitheliális sejtek igen kis százalékban (1.69-3.34%) fordultak elő. Ezeknek a sejteknek a nagy része gyenge, pontszerű (15/A-, 15/B-, 15/C ábra), vagy többszörös pontszerű (15/D-, 15/E ábra) *de novo* α-SMA expressziót mutatott a maghoz közeli területeken, illetve a magban (15/A-, 15/B-, 15/C ábra). A nagy felbontású konfokális szkenning lézer mikroszkópos felvételek alapján feltételezhető, hogy a magban elhelyezkedő α-SMA tulajdonképpen a citoplazma magbeli betüremkedése (15/C ábra). A pontszerű α-SMA expressziót mutató sejtek hasáb alakúak voltak apico-basolateralis polaritással. Más esetekben az α-SMA expresszió gyenge, vagy erős citoplazma festődést mutatott, ezek a sejtek kerek vagy ovális, nagyméretű maggal rendelkeztek (16/A, 16/B ábra). Néhány esetben a hámréteget elhagyó α-SMA+/CK+ sejteket is megfigyeltünk, amelyek valószínűleg sejtátalakulási folyamaton mentek keresztül (15/F-,17 ábra). Az α-SMA expresszió gyakorisága és lokalizációja hasonló volt az α-SMA/Ki67 és az α-SMA/CK kettős fluoreszcens festés esetén. A α-SMA+/CK+ sejtek aránya szignifikánsan megnövekedett a CRC-s (3.34±1.01%) mintákban, összehasonlítva az egészséges (1.94±0.69%) és az adenomás (1.62±0.78%) mintákkal

($p<0.05$) (18. ábra). A Ki-67 expresszió alapján az intraepitheliális α-SMA+ sejtek nagy része proliferatív fázisban volt mindhárom vizsgálati csoportban (egészséges: 87.7±10.7%; adenoma: 81.4±7%; CRC: 88±2.4%; $p>0.05$). Az egészséges, hosszanti irányú metszetekben az α-SMA+/Ki-67+ sejtek a kripta bazális régiójában nagyobb számban fordultak elő, mint a felsőbb, apikális területeken.



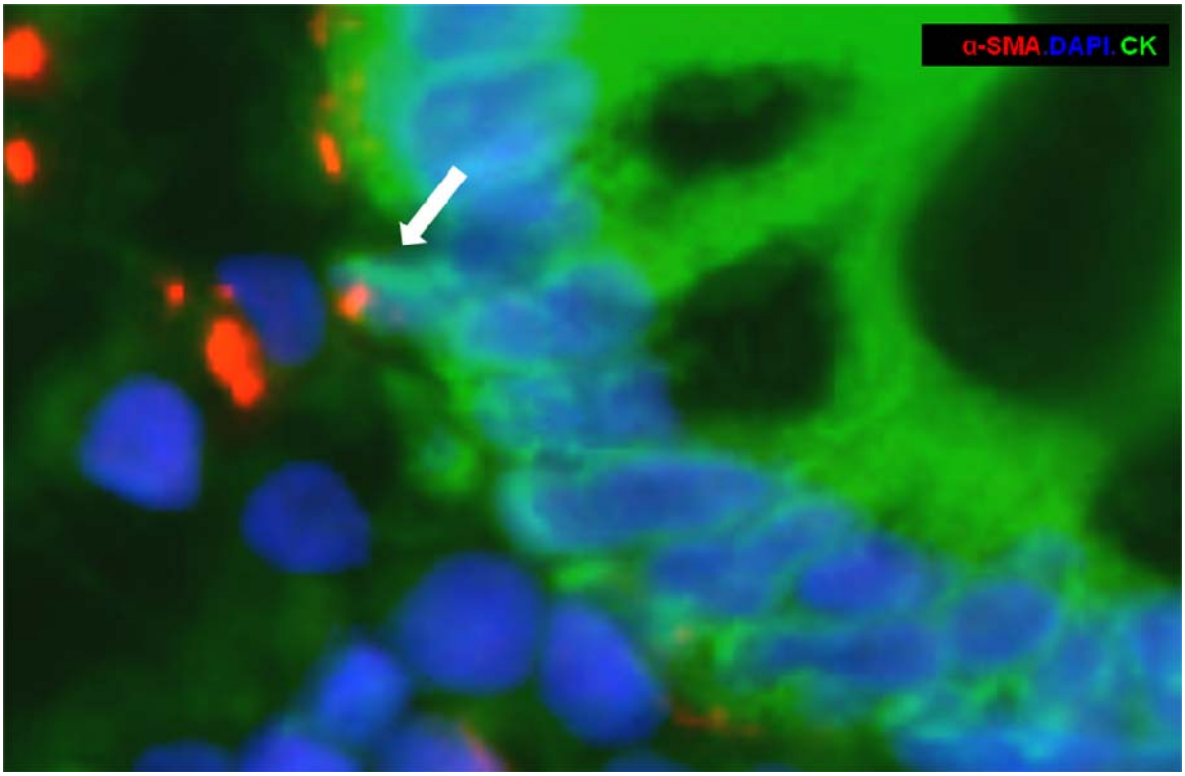
15. ábra. Az α-SMA fehérje expresszójának kimutatása fluoreszcens festéssel. *A sejtek nagy része mag körüli-, vagy a magban elhelyezkedő pontszerű α-SMA expressziót mutatott. A,B,C,F: α-SMA (piros)/CK (zöld); D,E: α-SMA (kék)/Ki67 (piros) fluoreszcens festés.*

DOI:10.14753/SE.2012.1746

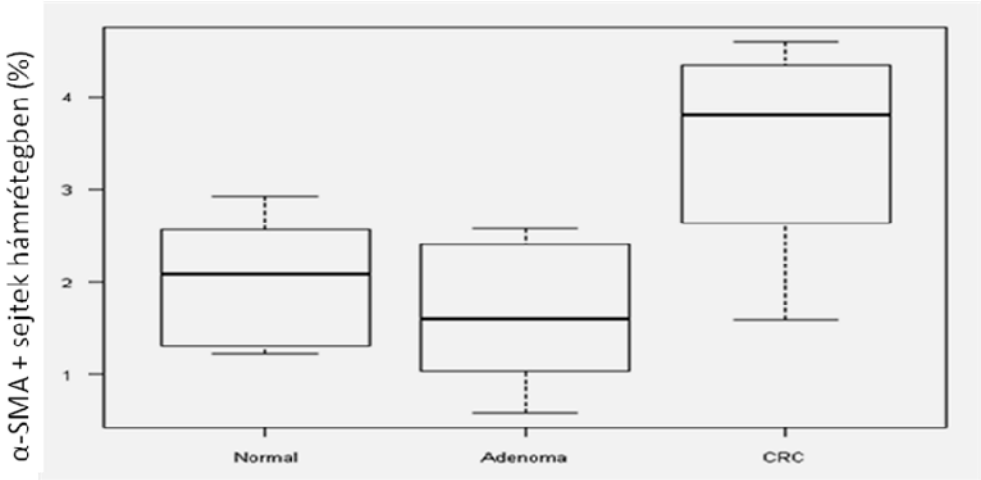


16. ábra. Erős citoplazmatikus festődést mutató intrapitheliális sejtek. *A: α-SMA (piros)/CK (zöld), B: α-SMA (kék)/Ki67 (piros) fluoreszcens festődés.*

DOI:10.14753/SE.2012.1746



17. ábra. *CK (zöld fluoreszcens festés) és α-SMA (piros fluoreszcens festés) kettős pozitivitást mutató sejt (fehér nyíllal jelölve), amely valószínűleg éppen elhagyja a hámréteget (epitheliális - mesenchymális átalakulás).*

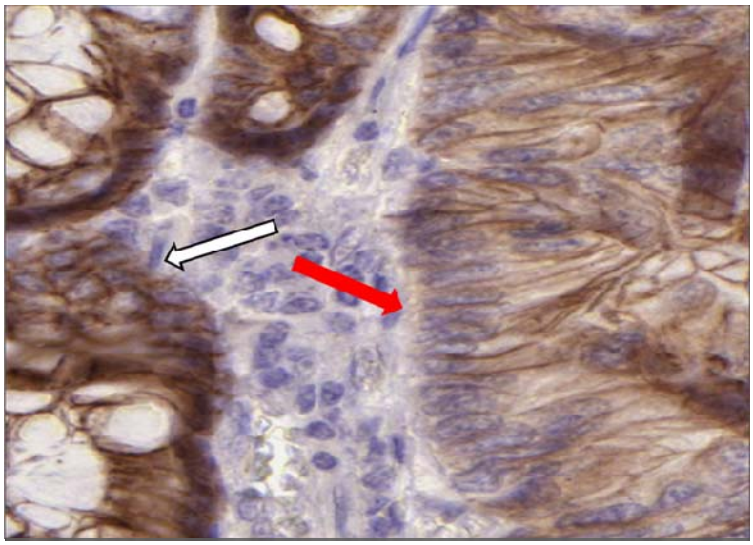


18. ábra. **Az intraepitheliális α-SMA/CK kettős pozitivitást mutató sejtek arányának változása az összes hámsejthez viszonyítva, a vastagbél adenoma-carcinoma szekvencia során.** *(CRC: 3.34±1.01%, adenoma: 1.62±0.78%, és az egészséges: 1.94±0.69%; $p<0.05$).*

DOI:10.14753/SE.2012.1746

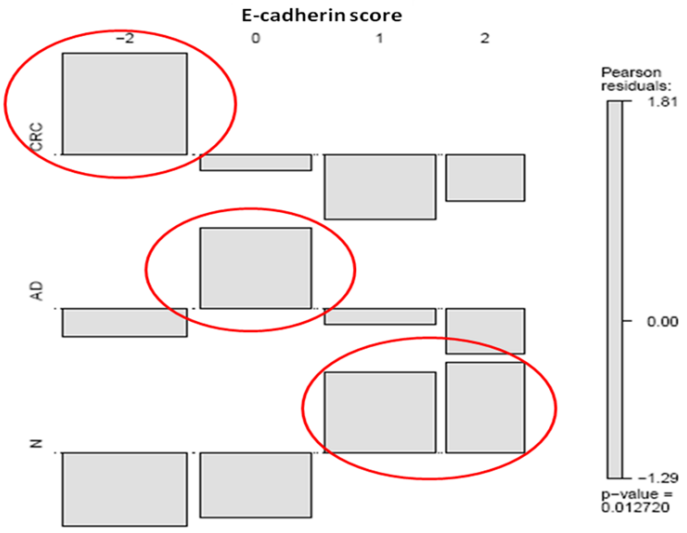
4.5. Az E-cadherin termelődésének változása az ACS során

Az E-cadherin expressziója folyamatos csökkenést mutatott az ACS során ($p<0.05$; 19. ábra). Az egészséges minták a hámsejtekben erős membrán és közepesen erős citoplazma festődést mutattak (a jellemző score érték: +2). Adenomában mind a membrán, mind a citoplazma festődés csökkent, az egészséges mintákhoz viszonyítva (a jellemző score érték: 1 vagy 0). A vastagbélrákos minták nem mutattak citoplazma festődést, a membránfestődés gyenge volt, néha eltűnt (fragmentált festődés) (jellemző score érték: -2) (20. ábra).



19. ábra. Eltérő E-cadherin expresszió a vastagbélrákos (piros nyíl) és az azt körülvevő egészséges kripta hámsejtek (fehér nyíl) között.

DOI:10.14753/SE.2012.1746

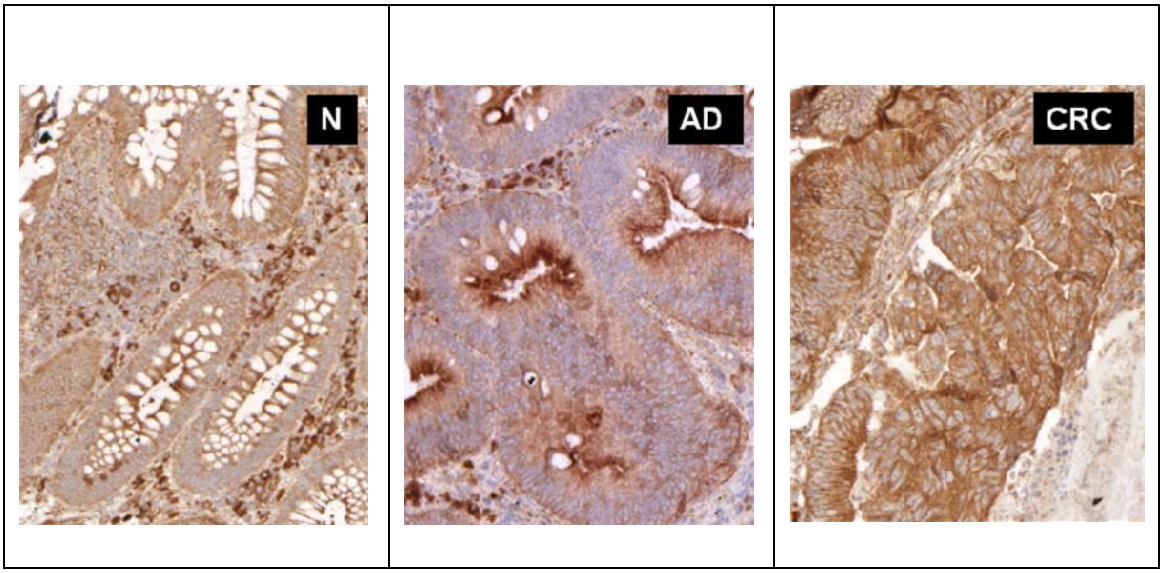


20. ábra. Az E-cadherin expresszió változása az ACS során. *CRC: jellemző score érték: -2, AD (adenoma): jellemző score érték: +1, N (normális/egészséges): jellemző score érték: +2 és +1. Az oszlop diagrammok a Pearson reziduumok magasságát, szélességét és az értékeket arányosan fejezik ki. A bar chartok jelzik, hogy a megfigyelt esetszám magasabb, vagy alacsonyabb-e, mint a várható (p=0.01272).*

4.6. A TGF-β receptor II fehérje expresszió változása az ACS során

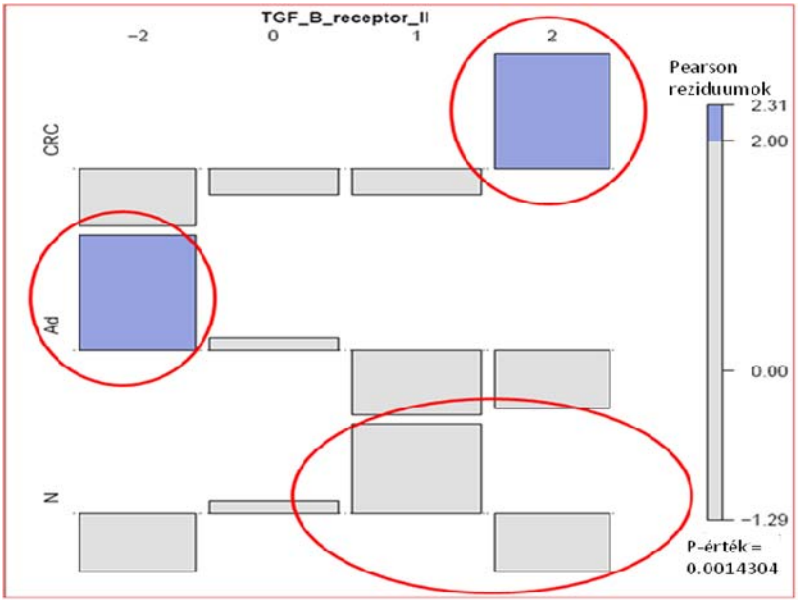
A TGF-βRII expressziója a hámban és néhány stromális sejtben is kimutatható volt. Normális hámban a TGF-βRII termelődés közepes erősségű volt. Ezekben a mintákban nemcsak a sejtmembrán, hanem jelentős citoplazmatikus fehérje termelés is kimutatható volt (21. ábra/N). A jellemző score érték 0 és +1 volt. Adenomában a citoplazmatikus TGF-βRII expresszió a sejtek apikális felére korlátozódott, esetenként hiányzott, a membránfestődés gyenge, szakadozott volt, ritkán teljesen el is tűnt (21. ábra/AD), a jellemző score érték -2 volt. Vastagbélrákban a normális és az adenoma hámnál szignifikánsan ($p<0.05$) erősebb citoplazma- és membránfestődés volt megfigyelhető (21. ábra/CRC). Eredményeinket asszociációs plot-on ábrázoltuk (22. ábra).

DOI:10.14753/SE.2012.1746



21. ábra. A TGF-βRII fehérje expressziós változása a vastagbél adenoma - carcinoma szekvencia során. *N: normális/egészséges minta, AD: adenoma, CRC: vastagbélrák.*

DOI:10.14753/SE.2012.1746

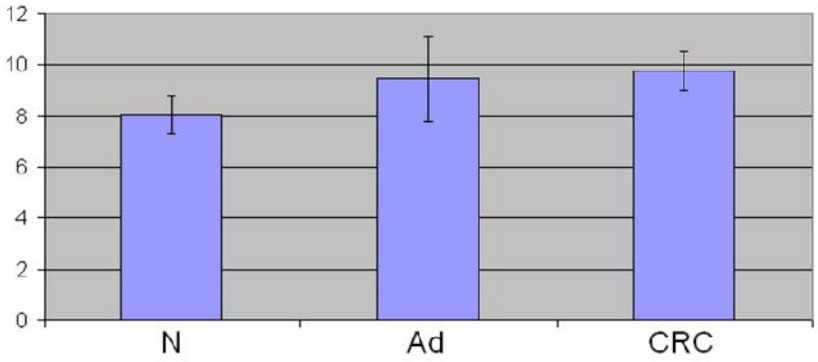


22. ábra. A TGF-βRII expresszió változása az ACS során, asszociációs plotton ábrázolva. *CRC: jellemző score érték: +2, AD (adenoma): jellemző score érték: -2, N (normális/egészséges): jellemző score érték: +1 és 0. Az oszlop diagrammok a Pearson reziduumok magasságát, szélességét és az értékeket arányosan fejezik ki. Az oszlop diagrammok jelzik, hogy a megfigyelt esetszám magasabb, vagy alacsonyabb-e, mint a várható (p=0.00143).*

4.7. A TGF-β receptor II mRNS szintű expressziós változása az ACS során

Az aktivált TGF-βRII fehérjeszintű kimutatásának megerősítésére mRNS expressziós vizsgálatokat végeztünk. A független mintákon elvégzett microarray vizsgálatok eredménye szerint adenoma és vastagbélrákos mintákban emelkedett szintű TGF-βRII mRNS termelés volt megfigyelhető a normális mintákhoz képest (23. ábra). A normális és a vastagbélrákos, valamint a normális és az adenoma minták között is szignifikáns ($p<0.05$) különbség volt megfigyelhető.

DOI:10.14753/SE.2012.1746

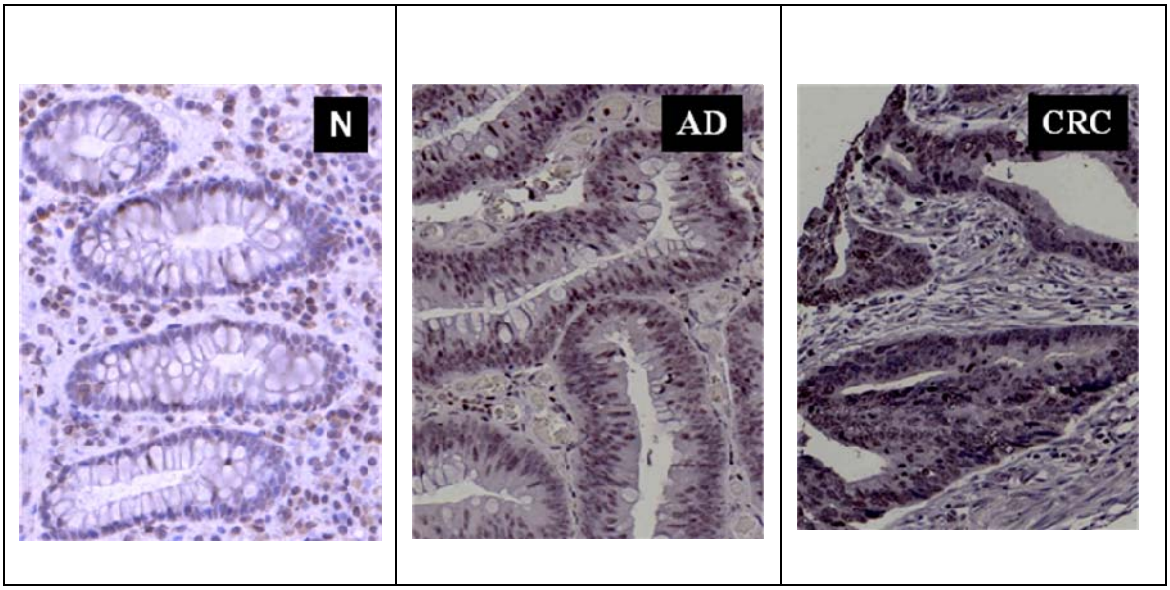


23. ábra. A TGF-βRII mRNS szintű expressziós változása a vastagbél adenoma - carcinoma szekvencia során. *N: normális/egészséges minta, AD: adenoma, CRC: vastagbélrák***.**

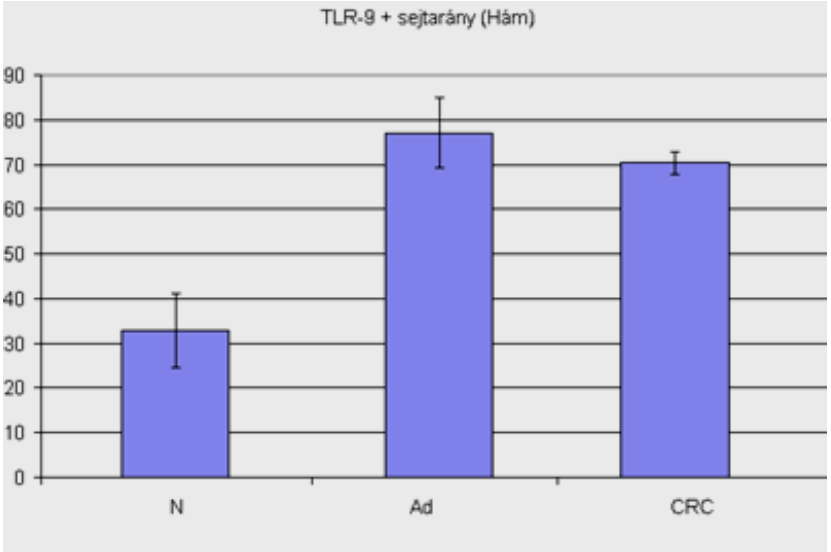
4.8. A TLR9 expresszió változása a vastagbél ACS során.

A TLR9 a citoplazmában, pontosabban az endoplazmatikus retikulum felszínén fejeződik ki. Normális mintáinkban e specifikus elhelyezkedés nem volt látható, a fehérje a citoplazmatikus festődés mellett magpozitivitást is mutatott (24. ábra/N). Egészséges mintákban az immunpozitivitást mutató sejtek aránya 32,92±8,314% volt. A normális mintákhoz hasonlítva, mind adenomában (70,34±2,49%) (24. ábra/AD), mind vastagbélrákban (68,25±2,43%) (24. ábra/CRC) szignifikáns ($p<0.05$) TLR9 expresszió mutatkozott (25. ábra). Adenoma és CRC mintákban a receptor expressziója a mag körüli régióra korlátozódott, intenzitása kisebb volt, mint az egészséges mintákban, de általánosságban majdnem minden sejtben észleltünk immunreakciót.

DOI:10.14753/SE.2012.1746



24. ábra. A TLR9 kifejeződésének változása a vastagbél adenoma - carcinoma szekvencia során. *Normális (N) mintákban csak néhány sejt mutat TLR9 pozitivitást, a magban és a mag körüli régióban. Adenomában (AD) és carcinomában (CRC) a sejtek többségében a TLR9 pozitivitás a mag körüli régióra korlátozódott.*

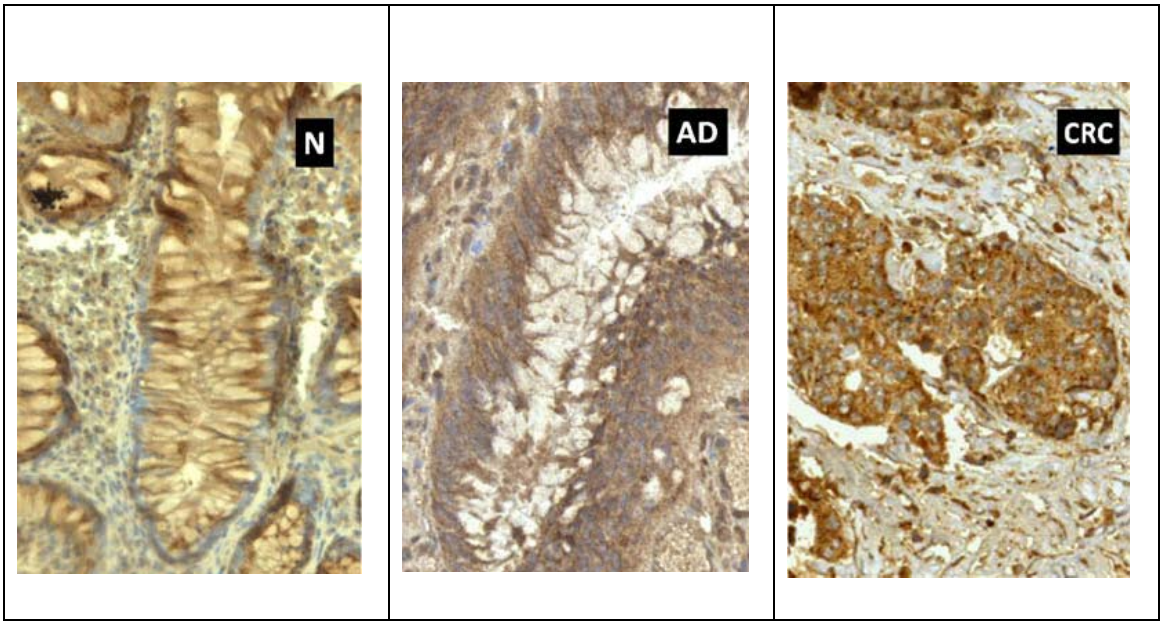


25. ábra. A TLR9+ sejtarány (az összes hámsejthez viszonyítva) változása az adenoma - carcinoma szekvencia során. *N:normális, AD:adenoma, CRC: vastagbélrák.*

DOI:10.14753/SE.2012.1746

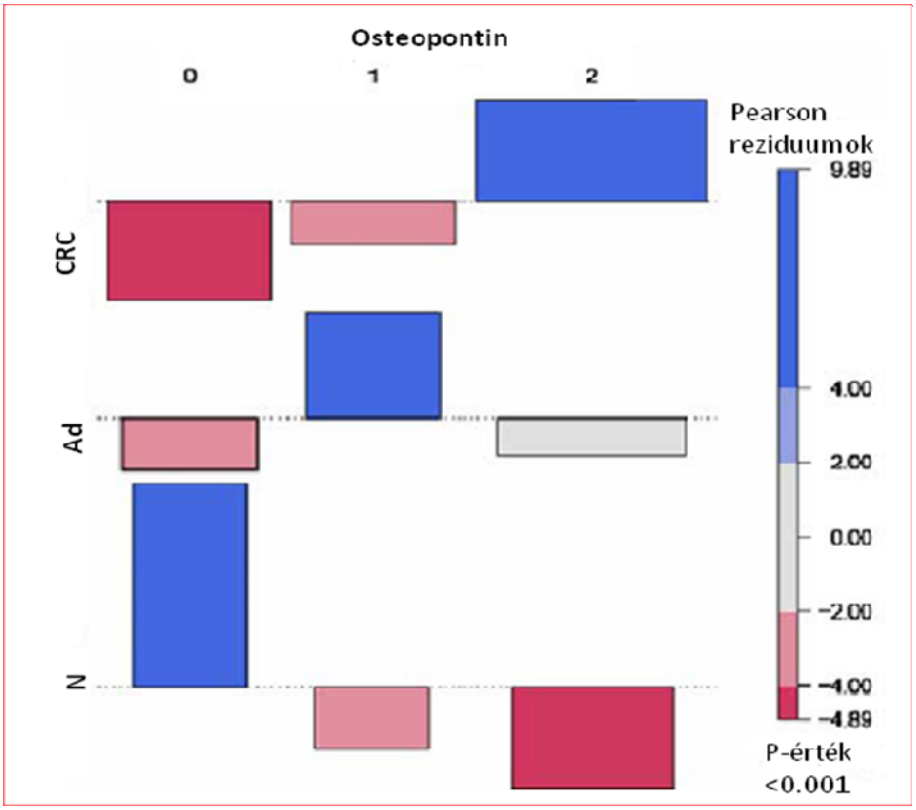
4.9. Az OPN termelődésének változása a vastagbél ACS során.

A vastagbélrák kialakulásának minden szövettani stádiumában az OPN expresszió a hámsejtek sejtplazmájára korlátozódott, a magban nem találtunk kimutatható immunreakciót. Egészséges mintákban gyenge, diffúz citoplazma expresszió volt megfigyelhető, a jellemző score érték 0 (26. ábra/N). Adenomában a citoplazmatikus OPN expresszió mérsékelt erősödést mutatott, a jellemző score érték 1 (26. ábra/AD), míg a vastagbélrákban erős citoplazmatikus OPN expresszió volt megfigyelhető (score: 2; 26. ábra/CRC). Eredményeinket asszociációs ábrán tüntettük fel ($p<0.05$; 27. ábra). Számos strómális sejt (főleg makrofágok és limfociták) mérsékelt OPN expressziót mutatott.



26. ábra. Növekvő hámsejt osteopontin fehérje termelődés a vastagbélrák kialakulása során. *N: normális, AD: adenoma és CRC: colorectalis carcinoma.*

DOI:10.14753/SE.2012.1746



27. ábra. A vastagbél hámsejtjeinek citoplazmatikus osteopontin (OPN) expressziójának változása asszociációs ábrán feltüntetve. *N: normális, AD: adenoma, CRC: vastagbélrák. A kontingencia táblázatok közötti megfigyelt és a várható gyakoriságok különbségeit (Pearson's reziduumok) téglalapokkal ábrázoljuk. Az oszlop diagrammoka Pearson reziduumok magasságát, szélességét és az értékeket arányosan fejezik ki. Az oszlop diagrammok jelzik, hogy a megfigyelt szám magasabb, vagy alacsonyabb-e, mint a várhat (p<0.05).*

DOI:10.14753/SE.2012.1746

5.0. MEGBESZÉLÉS

A vastagbélhám regenerációs folyamatinak megismerése kulcsfontosságú lehet mind a fekélyképződéssel, mind a tumorgenezissel járó állapotok pontos megértésében. A gyulladásos, fekélyképződéssel járó állapotokban olyan célmolekulák és jelátviteli folyamatok ismerhetők meg, amelyek segítségével hamarabb érhető el a nyálkahártya gyógyulás. A daganatképződés során pedig a kisiklott regeneratív folyamatok gátlásával célzott daganatellenes kezelések alapjait tárhatjuk fel.

Vizsgálataimban a vastagbélhám regenerációjában és a tumorképzésében is egyaránt fontos szerepet játszó hám-stroma kapcsolatokat vizsgáltam meg immunhisztokémiai, génexpressziós és kromoszóma elemzési technikákkal.

5.1. A csontvelői sejtek szerepe a vastagbélhám regenerációjában

A csontvelői eredetű CD45 negatív sejtek részt vesznek a vastagbélgyulladás akut fázisát követő gyógyulási folyamatokban (2,100). Vizsgálatainkban kimutattuk, hogy a csontvelői eredetű (CD45-, XY-FISH+) sejtek szignifikánsan nagyobb arányban fordulnak elő a lymphoid aggregátumokat körülvevő kripták hámrétegében. Feltételezhető, hogy a lymphoid aggregátumok nemcsak az immunfolyamatokban játszanak fontos szerepet, hanem a hámregenerációs folyamatokban részt vevő csontvelői eredetű őssejtek vándorlásának is állomásai. Ezt látszik alátámasztani, hogy szoros kapcsolatot találtunk a lymphoid aggregátumok és a születő kripták között, amelyet 3 dimenziós rekonstrukcióval is szemléltettünk.

Normális vastagbélhámban és enyhe gyulladás esetén a vastagbél hámrétegében a csontvelői eredetű CD45- sejtek nem repopulálták a kriptát, ami arra utal, hogy ha a vastagbelet nem éri nagyobb mértékű sérülés, akkor a lokális, szöveti őssejtek képesek a megfelelő utódsejt

termelésre, évekkel a csontvelő transzplantáció után is. Más, nem csontvelői eredetű őssejtek, mint a zsírszöveti őssejtek is részt vehetnek a hámréteg regenerációjában (101). Valószínűsíthető, hogy ezek a sejtek jelentek meg a megfigyeléseinkben, mint stromális XX-FISH+, CDX2+ sejtek.

Az intraepiteliális CD45-, XY-FISH+ ritkán formáltak csoportokat, ebből eredően osztódásuk ritka folyamat, vagyis ezen sejtek ritkán tartják meg őssejt karakterisztikájukat (pl. Musashi-1 őssejt marker-termelés) (2). Egy esetben találtunk egy kisebb CD45-, XY-FISH+ sejtekből álló csoportot, amely valószínűleg a hámba vándorló csontvelői őssejt szaporodásából származott (párhuzamos beáramlásuk ilyen kis területre nem túl valószínű). A proliferatív sejtek számát valószínűleg a mikrokörnyezetben található sejtekből (pl. miofibroblasztok, simaizomsejtek) származó szabályozó molekulák, mint a proliferációs Wnt szignál inhibitor BMP antagonisták (gremlin 1, gremlin 2 és chordin-like 1) szabályozzák (11). Ezek a molekulák elősegíthetik a csontvelői őssejtek hámban való szaporodását, így azok hatékonyabban vehetnek részt a hám regenerációs folyamataiban.

Számos *in vitro* tanulmány szerint a szöveti mikrokörnyezet egyes faktorai (pl. szolubilis differenciációs szignálok) és a nyomásviszonyok által indukált sejtalak változások szabályozhatják az őssejtek elköteleződését (102,103,104). Kimutattuk, hogy a Musashi-1+ őssejtek már a strómális vándorlásuk során hámirányú elköteleződést (CDX2 pozitivitás) mutathatnak, feltehetően az eltérő nyomásviszonyok és parakrin szabályzók hatására. A CDX2, mint számos hámfunkciót (pl. érés, kripta felépítése) szabályozó fő transzkripciós faktor megjelenése mellett más molekulák (pl. sejtfelszíni receptorok) is megjelenhetnek a vándorlás során (41), amelyek szerepet játszhatnak az őssejtek vándorlásának és elköteleződésének szabályozásában. Ezeknek a szabályzó mechanizmusoknak további megismerése elsődleges fontosságú lehet az őssejt terápiák szempontjából.

5.2. A tranzíciós folyamatok számának növekedése a vastagbélrák kialakulása során

A vastagbélrákos mintákban az α-SMA/CK kettős pozitív sejtek számának szignifikáns növekedését tapasztaltuk az adenoma- és az egészséges mintákhoz viszonyítva. Az α-

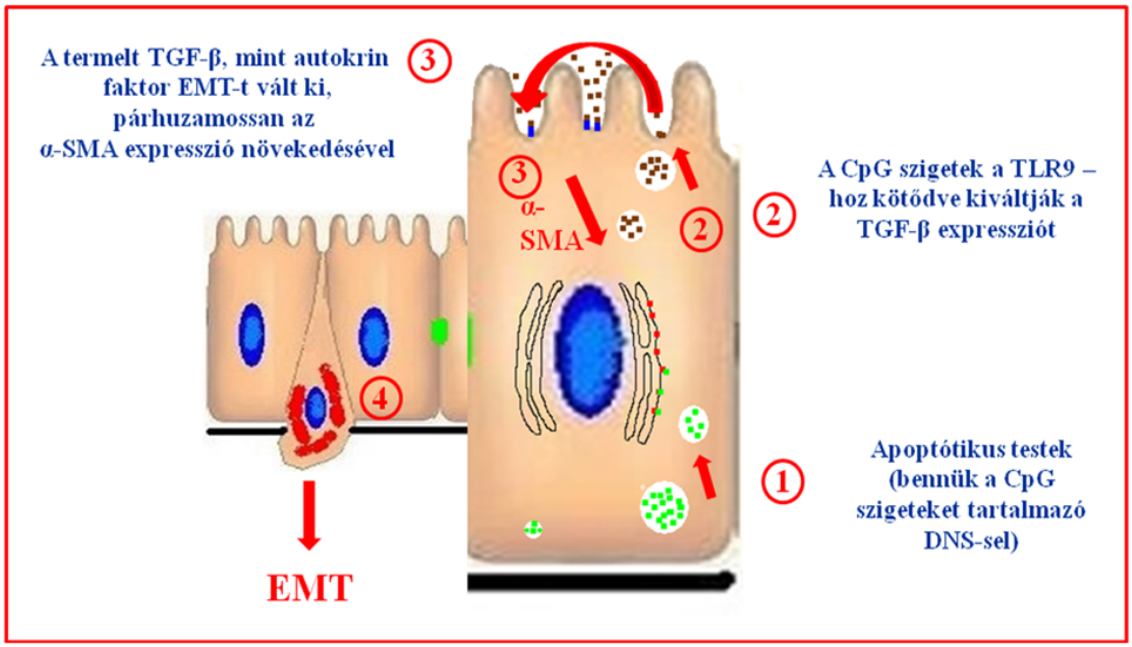
SMA+/CK+ sejteknek a nagy része gyenge, pontszerű α-SMA expressziót mutatott, amely a magban, vagy a mag körül régióban lokalizálódott. Az ilyen típusú expresszió kezdődő epitheliális-mesenchymális tranzícióra utal. Az α-SMA expressziós mintázata ezekben a sejtekben nagy hasonlóságot mutatott a *Storch és mtsai* által leírtakhoz (105), ennek alapján a magban található α-SMA+ foltok a citoplazma kesztyűujjszerű betüremkedéseiben alakulnak ki. Így ezek az α-SMA-kötegek részt vehetnek a sejtmag és a sejt alakjának megváltoztatásában, amelyek aktiválhatnak egyes sejtmagi transzkripciós szabályozókat, mint nuclear matrix protein/NMP-1,-2 (106). E hipotézis szerint nem csak a külső erők okozhatnak úgynevezett mechano-transzdukciós átalakulást (107,108,109), hanem a sejten belül keletkezett erők is létrehozhatják azt. Az α-SMA+ kötegek, mint a mechanikai átalakító rendszernek a közbülső részei befolyásolhatják a későbbi α-SMA expressziót a MAP kináz p38 aktivációján keresztül. A hámsejtekben a fragmentált migrációs apparátus megnövekedett kifejeződése (pontszerű α-SMA expressziós mintázat) a tumor kialakulása során azt sugallja, hogy az EMT nem igényel nagymértékű aktív sejtmozgást. Valószínűleg a környező hámsejtek által létrehozott összeszorító hatás „préseli ki" a hámrétegből ezeket a sejteket. A nagyfokú, aktív mozgáshoz szükséges α-SMA expresszió csak a későbbi fázisban, a stromális vándorlás során alakulhat ki. Néhány intraepiteliális sejt erős citoplazmatikus α-SMA expressziót mutatott, amelyek valószínűleg mesenchymális-epitheliális átalakulásból származhatnak.

Az intraepitheliális α-SMA+ sejtek nagy része (körülbelül 83%-a) Ki-67 pozitivitást mutatott mindhárom vizsgált csoportban. Ez az eredmény hasonlatos a *Ng és mtsai* által közölt eredményekhez, miszerint az α-SMA pozitív epitheliális sejteknek a 60-80%-a proliferatív fázisban volt veseeltávolításon átesett patkányokban (110). A carcinoma kialakulása során a fokozott α-SMA expresszió és a proliferáció együttes megnövekedése és az E-cadherin expresszió csökkenése jól magyarázható egyes tumorképződéssel kapcsolatba hozható jelátviteli pályák (pl. PI3K/Akt, MAPK, Wnt) által kiváltott GSK-3β fehérje gátlással, amely a Snail és β-catenin magbeli felhalmozodását okozza (111). A sejtmagban elhelyezkedő Snail az E-box motívumokhoz való kötődésével csökkenti az E-cadherin expresszióját (112). A sejtmagban elhelyezkedő β-catenin befolyásolja a proliferációt és az EMT-t is (42).

Bár adenomában csökkenő E-cadherin expressziót találtunk az ép vastagbélhámhoz képest, ezt nem követte emelkedő számú EMT-t mutató átalakuló intraepitheliális sejtszám növekedés. Ez az eredmény összefüggésben lehet a TGF-β1, mint az EMT fő szabályozójnak hasonló mértékű termelődésével az ACS során (30). A vastagbélrákos minták nagymértékben

mutatták a sejt-sejt kapcsolatok megbomlását, ami a Rho/ROK útvonalon keresztül a serum response factor (SRF) túltermelésével kiváltja az α-SMA termelését (79,113).

A TGF-β receptor II fehérje termelésődése paralell módon követte az α-SMA+ sejtek arányának változását. Ebből következőleg az átalakulás fő szabályozója lehet ez a jelfogó. A Toll-like receptor 9 expressziója már adenomákban szignifikáns emelkedést mutatott, azonban ezt nem követte az α-SMA+ sejtek arányának megnövekedése. Ennek az egyik oka lehetett az, hogy azok a CpG sziget tartalmú DNS szakaszok, amelyek a vastagbélrákban kiszabadulnak a rákos sejtekből (114), adenomában még nem aktiválják a receptort. A TLR9 aktivációja TGF-β termelésével jár (115), ezért feltételezhető, hogy a TGF-β ezekben a folyamatokban csak közbenső, hírvivő szerepet tölt be, és autokrin módon szabályozza az EMT folyamatát (28. ábra).



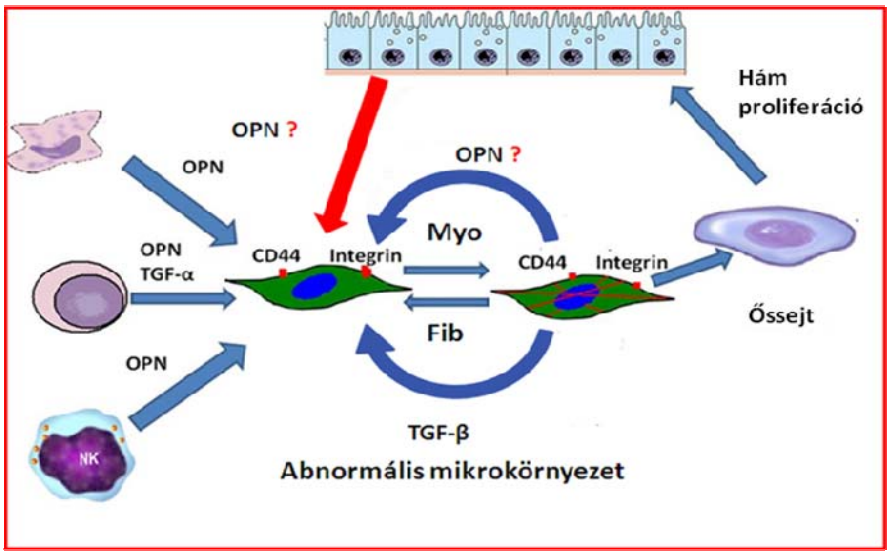
28. ábra. A CpG szigetekben gazdag DNS darabok szerepe az EMT folyamatának szabályozásában. *A CpG szigetekben gazdag DNS (1) által aktivált TLR9 fokozott TGF-β (2) termelést okozhat, amely, mint autokrin faktor aktiválja a TGF-β recptorokat, ami α-SMA termelésen keresztül (3) kiválthatja az epitheliális-mesenchymális átalakulást (4).*

DOI:10.14753/SE.2012.1746

5.3. Emelkedett hámsejt osteopontin termelődés az ACS során

A hámeredetű OPN szerepe, mint extra- és intracelluláris szabályozó molekula még nem teljesen tisztázott. Feltételezhetően fontos szerepe lehet a fibroblaszt-miofibroblaszt és a fibroblaszt-hám átalakulások szabályozásában (31,84). A vastagbélrák kialakulása során a miofibroblasztok emelkedő száma negatív korrelációt mutat a gyulladásos sejtek számával (30), tehát a növekvő számú átalakuláshoz szükséges OPN más forrásból származik. Elképzelésünk szerint a hámsejtekben termelődő OPN apoptosis, necrosis vagy aktív szekréció utján jelenik meg a stromában és ott befolyásolja a miofibroblasztok számát (29. ábra). *Hawinkels és mtsai* szerint a miofibroblasztok növekvő száma korrelál a TGF-β mennyiségével az adenoma-carcinoma szekvencia során (30). Ezen két szabályozó ligand fokozódó termelése a stromális mikrokörnyezet megváltoztatásával együtt az eltérő őssejt aktiváció révén hathat a hámsejtek szaporodására és a malignus átalakulásra.

Az osteopontin különböző ellenanyagokkal történő gátlása új terápiás lehetőségek megjelenéséhez vezethet (116). Az OPN gátlása csökkenti a tumornövekedést és metasztázis képzést (117,118).



29. ábra. Az OPN feltételezett szerepe a rákos mikrokörnyezet kialakításában. *A hám eredetű OPN megjelnhet a kötőszövetes rétegben, ahol a fibroblasztok CD44 és integrin receptorjaihoz kapcsolódva eltolhatja a fibroblaszt-miofibroblaszt arányt, ami a mikrokörnyezet megváltozásához vezethet.*

DOI:10.14753/SE.2012.1746

6.0. A LEGFONTOSABB ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK ÉS MEGFIGYELÉSEK

- a csontvelői őssejtek hámba épülése nem túl gyakori folyamat, még enyhe gyulladás esetén sem, a hámban ritkán szaporodnak, többnyire egyesével helyezkednek el

- a lymphoid aggregátumok részt vehetnek a vastagélhám regenerációs folyamataiban, mint a csontvelői eredetű őssejtek bevándorlásának cél állomásai.

- a csontvelői eredetű őssejtek viszonylag korán, a kötőszöveti rétegben való vándorláskor már elköteleződnek hámirányban, amit a CDX2 hámmarker megjelenése alátámaszt. Ez az elköteleződés valószínűleg a mikrokörnyezet megváltozott nyomásviszonyainak és szabályzó molekula összetételének eredménye.

- a sejtátalakulási folyamatok már a normális vastagbélhámban is megjelennek, arányuk azonban vastagbélrákban megnő. Az ilyen sejtátalakulási folyamatokra legtöbbször pontszerű, a magban, vagy a mag közelében elhelyezkedő α-simaizom aktin expresszió jellemző. A citoplazmális, diffúz α-simaizom aktin termelődés jóval ritkábban látható. Ezek a folyamatok nem igényelnek α-simaizom aktinhoz kötött aktív sejtmozgást. Valószínűleg a fokozott proliferációból eredő megnövekedett hámrétegbeli nyomásnak nagyobb szerepe van ezeknek a sejteknek a kötőszöveti rétegbe juttatásában.

- a pontszerű, magban elhelyezkedő α-SMA expresszió kezdődő epitheliális - mesenchymális átalakulásra utal, amely a mag morfológiájának megváltozásával újabb átírási folyamatokat indíthat el (úgynevezett mechano-tranzíciós folyamat).

- a vastagbélhámban elhelyezkedő α-SMA pozitivitást mutató sejtek nagy része osztódási fázisban van, amit a Ki-67 pozitivitás is alátámaszt.

- a TGF-β receptor II fehérje termelődése párhuzamosan változik a sejtátalakulási folyamatok gyakoriságával, ami újabb bizonyítéka annak, hogy az EMT fő szabályozója a TGFBRII.

- a TLR9 receptorok fokozódó termelődése már adenomákban is megjelenik, ám ezt nem követi az intraepitheliális α-SMA sejtarány növekedése, amelynek az lehet az oka, hogy nem

DOI:10.14753/SE.2012.1746

jelennek meg azok a CpG szigetekben gazdag DNS lánc darabok, mint ligandok, amelyek a vastagbéltumorokban aktiválhatják ezeket a receptorokat.

DOI:10.14753/SE.2012.1746

7.0. ÖSSZEFOGLALÁS

A stroma-hám interakciókat két nagy csoportra oszthatjuk: a sejtvándorlással és fenotípus változással járó folyamatokra (ide tartozik a mesenchymális-epitheliális és epitheliális-mesenchymális átalakulás), valamint a szabályozómolekulák mozgásával (vándorlásával) járó folyamatokra. Ezek a folyamatok részt vesznek a regenerációban, de szerepet játszanak a stromális mikrokörnyezet kialakításában és az áttétképzésben is.

A vastagbél regenerációjában a csontvelői eredetű őssejtek is részt vehetnek, amelyek a kötőszövetbe való vándorlás után stromális sejtekké (pl. fibroblaszt, miofibroblaszt) alakulhatnak, vagy mesenchymális-epitheliális átalakulással a vastagbél hámrétegébe épülve segíthetik annak gyógyulását. Munkám során megvizsgáltam a csontvelői őssejtek vastagbél hámba épülésének jellegzetességeit. Megállapítottam, hogy a csontvelői eredetű sejtek többnyire egyesével épülnek a hámrétegbe, ritkán osztódnak. A lymphoid aggregátumok közvetlen környezetében lévő mirigyekben tapasztalt megemelkedett intraepitheliás csontvelői eredetű sejtarány arra utalhat, hogy a nyiroksejt aggregátum ezen sejtek vándorlásának egy közbülső állomása lehet. A csontvelői eredetű sejtek korán, már a kötőszöveti vándorlásuk során (valószínűleg a mikrokörnyezetből származó kémiai hírvívők hatására) elköteleződnek epitheliális irányba.

A vastagbélrák kialakulása során az előzővel ellentétes irányú folyamat, döntően a TGF-β receptor II (TGF-βRII) és a Toll-like receptor 9 (TLR9) által szabályozott epitheliális-mesenchymális átalakulás (EMT) is végbemegy. Megfigyeltük, hogy a hámrétegben a mesenchymális átalakulást mutató α-simaizom-aktin+ (α-SMA+) sejtek aránya az összes hámsejthez viszonyítva megemelkedik vastagbélrákban. Ezen sejtek nagyrésze Ki-67+ osztódási fázisban volt. Az immunhisztokémiai vizsgálataink alapján a vastagbél tumoros folyamataiban a növekvő arányú EMT fő szabályzója a TGF-βRII, amelynek ligandja lehet a TLR9 aktiváció hatására felszabaduló TGF-β, mint autokrin faktor.

DOI:10.14753/SE.2012.1746

SUMMARY

The stromal-epithelial interactions can be divided into two main types: processes with cell migration and phenotypic changes and migration of the regulator ligands. These processes take part in the regeneration of colonic epithelium, but they play a role both in establishing stromal microenvironment and metastasis formation.

The bone marrow-derived stem cells may play a role in the repair processes of the colonic epithelium. These cells can differentiate into stromal cells (e.g. fibroblast, myofibroblast) or they can migrate to the epithelial layer (mesenchymal to epithelial transition/MET). I studied the characteristics of epithelial forming capacity of bone marrow-derived cells (BMDCs). I showed that the bone marrow-derived stem cells rarely proliferate (do not compose clusters), they appear alone in epithelial layer. I found increased intraepithelial BMDC number adjacent to lymphoid aggregates. This may refer to that the lymphoid aggregates may be a stand point in the migration of BMDCs. They differentiate into epithelial-like cells early by the effect of regulators of microenvironment.

During colorectal carcinogenesis the epithelial to mesenchymal transition/EMT also takes place by activation both of TGF-β receptor II and Toll-like receptor 9 (TLR9). Increased percentage of intraepithelial cells with α-smooth muscle actin/α-SMA expression (as a sign of EMT) was found during colorectal carcinoma formation. High percentage of α-SMA+ cells were in proliferative (Ki-67) cell phase. According to these immunohistology studies TGF-β receptor II may play a crucial role in EMT, whereas its ligand TGF-β can serve as an autocrine factor through TLR9 activation in colorectal tumorigenesis.

DOI:10.14753/SE.2012.1746

8.0. IRODALOMJEGYZÉK

1. Ross MH, Pawlina W. Histology A Text and Atlas, Sixth edition. Wolters Kluver/Lipincott Williams & Wilkins 2011

2. Matsumoto T, Okamoto R, Yajima T, Mori T, Okamoto S, Ikeda Y, Mukai M, Yamazaki M, Oshima S, Tsuchiya K, Nakamura T, Kanai T, Okano H, Inazawa J, Hibi T, Watanabe M. Increase of bone marrow-derived secretory lineage epithelial cells during regeneration in the human intestine. Gastroenterology. 2005;128:1851-67.

3. Van der Flier LG, Clevers H. Stem cells: Self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. Annu Rev Physiol. 2009;71:241-60.

4. Röhlich Pál. Szövettan. Semmelweis Orvostudományi Egyetem Képzéskutató, Oktatástechnológiai és Dokumentációs Központ. 1999; 271-6.

5. Brittan M, Wright NA. Gastrointestinal stem cells. J Pathol. 2002;197:492-509.

6. Marshman E, Booth C, Potten CS. The intestinal epithelial stem cell. Bioessays. 2002;24:91-8.

7. Cheng H, Leblond CP. Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. I. Columnar cell. Am J Anat. 1974;141,461–74 .

8. Okamoto R, Watanabe M. Prospects for regeneration of gastrointestinal epithelia using bone-marrow cells. Trends Mol Med. 2003;9:286-90.

9. Wong MH. Regulation of intestinal stem cells. J Investig Dermatol Symp Proc. 2004;9:224-8.

10. Ricci-Vitiani L, Pagliuca A, Palio E, Zeuner A, De Maria R. Colon cancer stem cells. Gut. 2008;57:538-48.

11. Kosinski C, Li VS, Chan AS, Zhang J, Ho C, Tsui WY, Chan TL, Mifflin RC, Powell DW, Yuen ST, Leung SY, Chen X. Gene expression patterns of human colon tops and basal

crypts and BMP antagonists as intestinal stem cell niche factors. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007;104:15418-23.

12. Karam SM. Lineage commitment and maturation of epithelial cells in the gut. Front Biosci. 1999;4:286-98.

13. Yen TH, Wright NA.The gastrointestinal tract stem cell niche. Stem Cell Rev. 2006;2:203-12.

14. Garrison AP, Helmrath MA, Dekaney CM. Intestinal stem cells. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2009;49:2-7.

15. Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. Int J Biochem Cell Biol. 2004;36:568-84.

16. Okamoto R, Yajima T, Yamazaki M, Kanai T, Mukai M, Okamoto S, Ikeda Y, Hibi T, Inazawa J, Watanabe M. Damaged epithelia regenerated by bone marrow-derived cells in the human gastrointestinal tract. Nat Med. 2002;8:1011-7.

17. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. Nature. 2002;418:41-9.

18. Jackson L, Jones DR, Scotting P, Sottile V. Adult mesenchymal stem cells: differentiation potential and therapeutic applications. J Postgrad Med. 2007;53:121-7.

19. Brittan M, Hunt T, Jeffery R, Poulsom R, Forbes SJ, Hodivala-Dilke K, Goldman J, Alison MR, Wright NA. Bone marrow derivation of pericryptal myofibroblasts in the mouse and human small intestine and colon. Gut. 2002;50:752-7.

20. Hayashi Y, Tsuji S, Tsujii M, Nishida T, Ishii S, Nakamura T, Eguchi H, Kawano S. The transdifferentiation of bone-marrow-derived cells in colonic mucosal regeneration after dextran-sulfate-sodium-induced colitis in mice. Pharmacology. 2007;80:193-9.

21. Krause DS**,** Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, Neutzel S, Sharkis SJ.Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow–derived stem cell. Cell. 2001;105:369-77.

22. Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. Blood Cells. 1978;4:7–25.

23. Shaker A, Rubin DC. Intestinal stem cells and epithelial-mesenchymal interactions in the crypt and stem cell niche. Transl Res. 2010;156:180-7.

24. Zeki SS, Graham TA, Wright NA. Stem cells and their implications for colorectal cancer. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2011;8:90-100.

25. Discher DE, Mooney DJ, Zandstra PW. Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells. Science. 2009;324:1673-7.

26. Womack WA, Kvietys PR, Granger DN. Villous motility. In: Handbook of Physiology. The Gastrointestinal System. Motility and Circulation. Bethesda, MD: Am. Physiol. Soc. 1989;6:. 975–986.

27. Mifflin RC, Pinchuk IV, Saada JI, Powell DW. Intestinal myofibroblasts: targets for stem cell therapy.Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2011;300:684-96.

28. Powell DW, Mifflin RC, Valentich JD, Crowe SE, Saada JI, West AB Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease. Am J Physiol. 1999;277:C1-9.

29. Babyatsky MW, Rossiter G, Podolsky DK. Expression of transforming growth factors alpha and beta in colonic mucosa in inflammatory bowel disease. Gastroenterology. 1996;110:975-84.

30. Hawinkels LJ, Verspaget HW, van der Reijden JJ, van der Zon JM, Verheijen JH, Hommes DW, Lamers CB, Sier CF. Active TGF-beta1 correlates with myofibroblasts and malignancy in the colorectal adenoma-carcinoma sequence. Cancer Sci. 2009;100:663-70.

31. Kohan M, Breuer R, Berkman N. Osteopontin induces airway remodeling and lung fibroblast activation in a murine model of asthma. Am J Respir Cell Mol Biol. 2009;41:290-6.

32. Lenga Y, Koh A, Perera AS, McCulloch CA, Sodek J, Zohar R. Osteopontin expression is required for myofibroblast differentiation. Circ Res. 2008;102:319-27.

33. Trujillo G, Meneghin A, Flaherty KR, Sholl LM, Myers JL, Kazerooni EA, Gross BH, Oak SR, Coelho AL, Evanoff H, Day E, Toews GB, Joshi AD, Schaller MA, Waters B, Jarai G, Westwick J, Kunkel SL, Martinez FJ, Hogaboam CM. TLR9 differentiates rapidly from slowly progressing forms of idiopathic pulmonary fibrosis. Sci Transl Med. 2010;2:57-82.

34. Meneghin A, Choi ES, Evanoff HL, Kunkel SL, Martinez FJ, Flaherty KR, Toews GB, Hogaboam CM. TLR9 is expressed in idiopathic interstitial pneumonia and its activation promotes in vitro myofibroblast differentiation. Histochem Cell Biol. 2008;130:979-92.

35. Heel KA, McCauley RD, Papadimitriou JM, Hall JC.Peyer's patches. J Gastroenterol Hepatol. 1997;12:122-36.

36. Sipos F, Muzes G, Galamb O, Spisák S, Krenács T, Tóth K, Tulassay Z, Molnár B. The possible role of isolated lymphoid follicles in colonic mucosal repair. Pathol Oncol Res. 2010;16:11-8.

37. Acheson DW, Luccioli S. Microbial-gut interactions in health and disease. Mucosal immune responses. Best Pract Res Clin Gastroenterol. 2004;18:387-404.

38. Forchielli ML, Walker WA. The role of gut-associated lymphoid tissues and mucosal defence. Br J Nutr. 2005;93:41-8.

39. Saxena SK, Thompson J S, Sharp J G. Role of organized intestinal lymphoid aggregates in intestinal regeneration. Invest Surg. 1997;10:97-103.

40. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. J Clin Invest. 2009;119:1420-8.

41. Sipos F, Muzes G, Valcz G, Galamb O, Tóth K, Leiszter K, Krenács T, Tulassay Z, Molnár B. Regeneration associated growth factor receptor and epithelial marker expression in lymphoid aggregates of ulcerative colitis. Scand J Gastroenterol. 2010;45:440-8.

42. Brabletz T, Hlubek F, Spaderna S, Schmalhofer O, Hiendlmeyer E, Jung A, Kirchner T. Invasion and metastasis in colorectal cancer: epithelial-mesenchymal transition,

mesenchymal-epithelial transition, stem cells and beta-catenin. Cells Tissues Organs. 2005;179:56-65.

43. Groisman GM, Amar M, Meir A. Expression of the intestinal marker Cdx2 in the columnar-lined esophagus with and without intestinal (Barrett's) metaplasia. Mod Pathol. 2004;17:1282-8.

44. Moskaluk CA, Zhang H, Powell SM, Cerilli LA, Hampton GM, Frierson HF Jr. Cdx2 protein expression in normal and malignant human tissues: an immunohistochemical survey using tissue microarrays. Mod Pathol. 2003;16:913-9.

45. Crissey MA, Guo RJ, Funakoshi S, Kong J, Liu J, Lynch JP. Cdx2 levels modulate intestinal epithelium maturity and Paneth cell development. Gastroenterology. 2011;140:517-528.

46. Suh E, Traber PG An intestine-specific homeobox gene regulates proliferation and differentiation. Mol Cell Biol. 1996;16:619-25.

47. Escaffit F, Paré F, Gauthier R, Rivard N, Boudreau F, Beaulieu JF. Cdx2 modulates proliferation in normal human intestinal epithelial crypt cells. Biochem Biophys Res Commun. 2006;342:66-72.

48. Houde M, Laprise P, Jean D, Blais M, Asselin C, Rivard N. Intestinal epithelial cell differentiation involves activation of p38 mitogen-activated protein kinase that regulates the homeobox transcription factor CDX2. J Biol Chem. 2001;276:21885-94.

49. Nakamura M, Okano H, Blendy JA, Montell C. Musashi, a neural RNA-binding protein required for Drosophila adult external sensory organ development. Neuron. 1994 ;13:67-81.

50. Okano H, Imai T, Okabe M. Musashi: a translational regulator of cell fates, J Cell Sci. 2002;115:1355–59.

51. Potten CS, Booth C,. Tudor GL, Booth D, Brady G, Hurley P, Ashton G, Clarke G, Sakakibara S, Okano H. Identification of a putative intestinal stem cell marker and early lineage marker; Musashi1. Differentiation. 2003;71:28-41.

52. Clarke RB, Spence K, Anderson E, Howell A, Okano H, Potten CS. A putative human breast stem cell population is enriched for steroid receptor-positive cells, Dev Biol. 2005;277:443-456.

53. Avizienyte E, Brunton VG, Fincham VJ, Frame MC. The SRC-induced mesenchymal state in late-stage colon cancer cells. Cells Tissues Organs. 2005;179:73-80.

54. Waerner T, Alacakaptan M, Tamir I, Oberauer R, Gal A, Brabletz T, Schreiber M, Jechlinger M, Beug H. ILEI: a cytokine essential for EMT, tumor formation, and late events in metastasis in epithelial cells. Cancer Cell. 2006;10:227-39.

55. Gulhati P, Bowen KA, Liu J, Stevens PD, Rychahou PG, Chen M, Lee EY, Weiss HL, O'Connor KL, Gao T, Evers BM. mTORC1 and mTORC2 regulate EMT, motility, and metastasis of colorectal cancer via RhoA and Rac1 signaling pathways. Cancer Res. 2011;71: 246-56.

56. Rychahou PG, Jackson LN, Silva SR, Rajaraman S, Evers BM. Targeted molecular therapy of the PI3K pathway: therapeutic significance of PI3K subunit targeting in colorectal carcinoma. Ann Surg. 2006;243:833-42.

57. Rychahou PG, Kang J, Gulhati P, Doan HQ, Chen LA, Xiao SY, Chung DH, Evers BM. Akt2 overexpression plays a critical role in the establishment of colorectal cancer metastasis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008;105:20315-20

58. Gulhati P, Cai Q, Li J, Liu J, Rychahou PG, Qiu S, Lee EY, Silva SR, Bowen KA, Gao T, Evers BM. Targeted inhibition of mammalian target of rapamycin signaling inhibits tumorigenesis of colorectal cancer. Clin Cancer Res. 2009;15:7207-16.

59. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. Nat Rev Cancer. 2002;2:442-54.

60. Lee JM, Dedhar S, Kalluri R, Thompson EW. The epithelial-mesenchymal transition:new insights in signaling, development, and disease. J Cell Biol 2006;172:973-81.

61. Sano H, Leboeuf JP, Novitskiy SV, Seo S, Zaja-Milatovic S, Dikov MM, Kume T. The Foxc2 transcription factor regulates tumor angiogenesis. Biochem Biophys Res Commun. 2010;392:201-6.

62. Hader C, Marlier A, Cantley L. Mesenchymal-epithelial transition in epithelial response to injury: the role of Foxc2. Oncogene. 2010;29:1031-40.

63. Hugo HJ, Kokkinos MI, Blick T, Ackland ML, Thompson EW, Newgreen DF. Defining the E-cadherin repressor interactome in epithelial-mesenchymal transition: the PMC42 model as a case study. Cells Tissues Organs. 2011;193:23-40.

64. Reya T, Clevers H. Wnt signalling in stem cells and cancer. Nature. 2005;434:843-50.

65. Brabletz T, Spaderna S, Kolb J, Hlubek F, Faller G, Bruns CJ, Jung A, Nentwich J, Duluc I, Domon-Dell C, Kirchner T, Freund JN. Down-regulation of the homeodomain factor Cdx2 in colorectal cancer by collagen type I: an active role for the tumor environment in malignant tumor progression. Cancer Res. 2004;64:6973-77.

66. Del Buono R, Pignatelli M, Hall PA. Control of differentiation in a rectal adenocarcinoma cell line: the role of diffusable and cell-associated factors. J Pathol. 1991;164:59-66.

67. Kirkland SC. Type I collagen inhibits differentiation and promotes a stem cell-like phenotype in human colorectal carcinoma cells. Br J Cancer. 2009;101:320-26.

68. van den Brink GR, Bleuming SA, Hardwick JC, Schepman BL, Offerhaus GJ, Keller JJ, Nielsen C, Gaffield W, van Deventer SJ, Roberts DJ, Peppelenbosch MP. Indian Hedgehog is an antagonist of Wnt signaling in colonic epithelial cell differentiation. Nat Genet. 2004;36:277-82.

69. Bailey JM, Singh PK, Hollingsworth MA. Cancer metastasis facilitated by developmental pathways: Sonic hedgehog, Notch, and bone morphogenic proteins. J Cell Biochem. 2007;102:829-39.

70. Yoo YA, Kang MH, Kim JS, Oh SC. Sonic hedgehog signaling promotes motility and invasiveness of gastric cancer cells through TGF-beta-mediated activation of the ALK5-Smad 3 pathway. Carcinogenesis. 2008;29:480-90.

71. Sahlgren C, Gustafsson MV, Jin S, Poellinger L, Lendahl U. Notch signaling mediates hypoxia-induced tumor cell migration and invasion. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008;105:6392-97.

72. Chua HL, Bhat-Nakshatri P, Clare SE, Morimiya A, Badve S, Nakshatri H. NFkappaB

represses E-cadherin expression and enhances epithelial to mesenchymal transition of mammary epithelial cells: potential involvement of ZEB-1 and ZEB-2. Oncogene 2007;26:711-24.

73. Katoh Y, Katoh M. Hedgehog signaling, epithelial-to-mesenchymal transition and miRNA. Int J Mol Med. 2008;22:271-75.

74. Zavadil J, Narasimhan M, Blumenberg M, Schneider RJ. Transforming growth factor-beta and microRNA: mRNA regulatory networks in epithelial plasticity. Cells Tissues Organs. 2007;185:157-61.

75. Loboda A, Nebozhyn MV, Watters JW, Buser CA, Shaw PM, Huang PS, Van't Veer L, Tollenaar RA, Jackson DB, Agrawal D, Dai H, Yeatman TJ. EMT is the dominant program in human colon cancer. BMC Med Genomics. 2011;4:9.

76. Cottonham CL, Kaneko S, Xu L. miR-21 and miR-31 converge on TIAM1 to regulate migration and invasion of colon carcinoma cells. J Biol Chem 2010;285:35293-302

77. Taylor MA, Parvani JG, Schiemann WP. The pathophysiology of epithelial-mesenchymal transition induced by transforming growth factor-beta in normal and malignant mammary epithelial cells. J Mammary Gland Biol Neoplasia. 2010;15:169-90.

78. Papageorgis P, Lambert AW, Ozturk S, Gao F, Pan H, Manne U, Alekseyev YO, Thiagalingam A, Abdolmaleky HM, Lenburg M, Thiagalingam S. Smad signaling is required to maintain epigenetic silencing during breast cancer progression. Cancer Res. 2010;70:968-78.

79. Fan L, Sebe A, Péterfi Z, Masszi A, Thirone AC, Rotstein OD, Nakano H, McCulloch CA, Szászi K, Mucsi I, Kapus A. Cell contact-dependent regulation of epithelial-myofibroblast transition via the rho-rho kinase-phospho-myosin pathway. Mol Biol Cell. 2007;18:1083-97.

80. Latz E, Schoenemeyer A, Visintin A, Fitzgerald KA, Monks BG, Knetter CF, Lien E, Nilsen NJ, Espevik T, Golenbock DT. TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. Nat Immunol. 2004;5:190-8.

81. Schetter C, Vollmer J. Toll-like receptors involved in the response to microbial pathogens: development of agonists for toll-like receptor 9. Curr Opin Drug Discov Devel. 2004;7:204-10.

82. Chow EK, O'connell RM, Schilling S, Wang XF, Fu XY, Cheng G.TLR agonists regulate PDGF-B production and cell proliferation through TGF-beta/type I IFN crosstalk. EMBO J. 2005;24:4071-81.

83. Rangaswami H, Bulbule A, Kundu GC. Osteopontin: role in cell signaling and cancer progression. Trends Cell Biol. 2006;16:79-87

84. Saika S, Shirai K, Yamanaka O, Miyazaki K, Okada Y, Kitano A, Flanders KC, Kon S, Uede T, Kao WW, Rittling SR, Denhardt DT, Ohnishi Y. Loss of osteopontin perturbs the epithelial-mesenchymal transition in an injured mouse lens epithelium. Lab Invest. 2007;87:130-8.

85. Ito K, Kon S, Nakayama Y, Kurotaki D, Saito Y, Kanayama M, Kimura C, Diao H, Morimoto J, Matsui Y, Uede T. The differential amino acid requirement within osteopontin in alpha4 and alpha9 integrin-mediated cell binding and migration. Matrix Biol. 2009;28:11-9.

86. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell. 1990;61:759-67.

87. Tulassay Zs. A vastagbélrák megelőzése és kezelése. Springer. 2004;70-71.

88. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL. Genetic alterations during colorectal-tumor development. N Engl J Med. 1988;319:525-32.

89. Span M, Moerkerk PT, De Goeij AF, Arends JW. A detailed analysis of K-ras point mutations in relation to tumor progression and survival in colorectal cancer patients. Int J Cancer. 1996;69:241-5.

90. Ranaldi R, Gioacchini AM, Manzin A, Clementi M, Paolucci S, Bearzi I.Adenoma-carcinoma sequence of colorectum. Prevalence of K-ras gene mutation in adenomas with increasing degree of dysplasia and aneuploidy. Diagn Mol Pathol. 1995;4:198-202.

91. Hedrick L, Cho KR, Fearon ER, Wu TC, Kinzler KW, Vogelstein B. The DCC gene product in cellular differentiation and colorectal tumorigenesis. Genes Dev. 1994;8:1174-83.

92. Riggins GJ, Kinzler KW, Vogelstein B, Thiagalingam S. Frequency of Smad gene mutations in human cancers. Cancer Res. 1997;57:2578-80.

93. Eppert K, Scherer SW, Ozcelik H, Pirone R, Hoodless P, Kim H, Tsui LC, Bapat B, Gallinger S, Andrulis IL, Thomsen GH, Wrana JL, Attisano L. MADR2 maps to 18q21 and encodes a TGFbeta-regulated MAD-related protein that is functionally mutated in colorectal carcinoma. Cell. 1996;86:543-52.

94. Caron de Fromentel C, Soussi T. TP53 tumor suppressor gene: a model forinvestigating human mutagenesis. Genes Chromosomes Cancer. 1992;4:1-15.

95. Szentirmay Z, Csuka O. A vastagbélrák molekuláris patológiája, A vastagbélrák megelőzése és kezelése, szerkesztő: Tulassay Zs. Springer Tudományos Kiadó, 2004

96. Oren M, Rotter V. Introduction: p53-the first twenty years. Cell Mol Life Sci. 1999;55:9-11

97. May P, May E. Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. Oncogene. 1999;18:7621-36.

98. Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. Nature. 1992;358:15-6.

99. Richard A. Becker, John M. Chambers and Allan R. Wilks, The New S Language. Chapman & Hall, New York, 1988.

100. Komori M, Tsuji S, Tsujii M, Murata H, Iijima H, Yasumaru M, Nishida T, Irie T, Kawano S, Hori M.Involvement of bone marrow-derived cells in healing of experimental colitis in rats. Wound Repair Regen. 2005;13:109-18.

101. Brzoska M, Geiger H, Gauer S, Baer P. Epithelial differentiation of human adipose tissue-derived adult stem cells. Biochem Biophys Res Commun. 2005;330:142-50.

102. Stabenfeldt SE, Munglani G, García AJ, LaPlaca MC. Biomimetic microenvironment modulates neural stem cell survival, migration, and differentiation. Tissue Eng Part A. 2010;16:3747-58.

103. Yamashita A, Nishikawa S, Rancourt DE. Microenvironment modulates osteogenic cell lineage commitment in differentiated embryonic stem cells. PLoS One. 2010;5:e9663.

104. Kilian KA, Bugarija B, Lahn BT, Mrksich M.Geometric cues for directing the differentiation of mesenchymal stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010;107:4872-7.

105. Storch KN, Taatjes DJ, Bouffard NA, Locknar S, Bishop NM, Langevin HM. Alpha smooth muscle actin distribution in cytoplasm and nuclear invaginations of connective tissue fibroblasts. Histochem Cell Biol. 2007;127:523-30.

106. Thomas CH, Collier JH, Sfeir CS, Healy KE. Engineering gene expression and protein synthesis by modulation of nuclear shape. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99:1972-7.

107. Wang J, Zohar R, McCulloch CA Multiple roles of alpha-smooth muscle actin in mechanotransduction. Exp Cell Res. 2006;312:205-14.

108. Wang J, Chen H, Seth A, McCulloch CA. Mechanical force regulation of myofibroblast differentiation in cardiac fibroblasts. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2003;285:1871-81.

109. Gomez EW, Chen QK, Gjorevski N, Nelson CM.Tissue geometry patterns epithelial-mesenchymal transition via intercellular mechanotransduction. J Cell Biochem. 2010;110:44-51.

110. Ng YY**,** Huang TP, Yang WC, Chen ZP, Yang AH, Mu W, Nikolic-Paterson DJ, Atkins RC, Lan HY. Tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation in progressive tubulointerstitial fibrosis in 5/6 nephrectomized rats. Kidney Int. 1998;54:864-76.

111. Zhou BP, Deng J, Xia W, Xu J, Li YM, Gunduz M, Hung MC. Dual regulation of Snail by GSK-3beta-mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition. Nat Cell Biol. 2004;6:931-40.

112. Batlle E, Sancho E, Francí C, Domínguez D, Monfar M, Baulida J, García De Herreros A. The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. Nat Cell Biol. 2000;2:84-9.

113. Masszi A, Di Ciano C, Sirokmány G, Arthur WT, Rotstein OD, Wang J, McCulloch CA, Rosivall L, Mucsi I, Kapus A. Central role for Rho in TGF-beta1-induced alpha-smooth

muscle actin expression during epithelial-mesenchymal transition. Am J Physiol Renal Physiol. 2003;284:911-24.

114. Frattini M, Gallino G, Signoroni S, Balestra D, Battaglia L, Sozzi G, Leo E, Pilotti S, Pierotti MA. Quantitative analysis of plasma DNA in colorectal cancer patients: a novel prognostic tool. Ann N Y Acad Sci. 2006;1075:185-90.

115. Di JM, Pang J, Pu XY, Zhang Y, Liu XP, Fang YQ, Ruan XX, Gao X.Toll-like receptor 9 agonists promote IL-8 and TGF-beta1 production via activation of nuclear factor kappaB in PC-3 cells. Cancer Genet Cytogenet. 2009;192:60-7.

116. Weber GF. The metastasis gene osteopontin: a candidate target for cancer therapy. Biochim Biophys Acta. 2001;1552:61-85.

117. Dai J, Li B, Shi J, Peng L, Zhang D, Qian W, Hou S, Zhao L, Gao J, Cao Z, Zhao J, Wang H, Guo Y. A humanized anti-osteopontin antibody inhibits breast cancer growth and metastasis in vivo. Cancer Immunol Immunother. 2010;59:355-66.

118. Thalmann GN, Sikes RA, Devoll RE, Kiefer JA, Markwalder R, Klima I, Farach-Carson CM, Studer UE, Chung LW. Osteopontin: possible role in prostate cancer progression. Clin Cancer Res. 1999;5:2271-7.

DOI:10.14753/SE.2012.1746

9.0. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

9.1. A témához kapcsolódó publikációk jegyzéke

Angol nyelvű elsőszerzős cikkek:

1. Valcz G, Krenács T, Sipos F, Patai AV, Wichmann B, Leiszter K, Tóth K, Balogh Z, Csizmadia A, Hagymási K, Masszi T, Molnár B, Tulassay Z. Lymphoid aggregates may contribute to the migration and epithelial commitment of bone marrow-derived cells in colonic mucosa. J Clin Pathol. 2011;64:771-5 **IF:2,475.**

2. Valcz G, Sipos F, Krenács T, Molnár J, Patai AV, Leiszter K, Tóth K, Solymosi N, Galamb O, Molnár B, Tulassay Z. Elevated osteopontin expression and proliferative/apoptotic ratio in the colorectal adenoma-dysplasia-carcinoma sequence. Pathol Oncol Res. 2010;16:541-5. **IF:1,483**.

3. Valcz G, Krenács T, Sipos F, Leiszter K, Tóth K, Balogh Z, Csizmadia A, Muzes G, Molnár B, Tulassay Z. The role of the bone marrow derived mesenchymal stem cells in colonic epithelial regeneration. Pathol Oncol Res. 2011;17:11-6. **IF:1,483**.

4. Valcz G, Sipos F, Krenács T, Molnár J, Patai AV, Leiszter K, Tóth K, Wichmann B, Molnár B, Tulassay Zs. Increase of α-SMA+ and CK+ cells as an early sign of epithelial-mesenchymal transition during colorectal carcinogenesis, Pathol Oncol Res. (nyomtatás előtt, DOI 10.1007/s12253-011-9454-z) **IF:1,483** (2010).

Angol nyelvű társszerzős cikkek:

1. Sipos F, **Valcz G**, Molnár B. Physiologic and pathologic role of local and immigrating colonic stem cells. World J Gastroenterol. 2011 (elfogadva, nyomtatás előtt). **IF: 2.24**

2. Sipos F, Muzes G, **Valcz G**, Galamb O, Tóth K, Leiszter K, Krenács T, Tulassay Z, Molnár B. Regeneration associated growth factor receptor and epithelial marker expression in lymphoid aggregates of ulcerative colitis. Scand J Gastroenterol. 2010;45:440-8. **IF:1,966**

Magyar nyelvű elsőszerzős cikkek:

1. Valcz G, Krenács T, Sipos F, Wichmann B, Tóth K, Leiszter K, Balogh Z, Csizmadia A, Hagymási K, Müzes G, Masszi T, Molnár B, Tulassay Z. A csontvelői eredetű őssejtek megjelenése az ép vastagbélhámban és a gyulladást követő hámregenerációban. Orv Hetil. 2009;150:1852-7.

2. Valcz G, Krenács T, Molnár B, Tulassay Z. A myofibroblastok szerepe a vastagbél gyulladásos és daganatos folyamataiban. Orv Hetil. 2009;150:597-602

3. Valcz G, Sipos F, Krenács T, Spisák S, Tóth K, Molnár B, Tulassay Z. Az őssejtek jellemzése, mozgása és terápiás lehetőségei a humán vastagbélben. Magy Belorv Arch. 2009;62:272-278.

9.2. Egyéb közlemények listája

1. Leiszter K, Galamb O, Sipos F, Tóth K, **Valcz G**, Patai VA, Molnár J, Molnár B, Tulassay Z. Az öregedés mikroszkópos és molekuláris jelei a vastagbélben, valamint ezek lehetséges szerepe az időskori vastagbélrák kialakulásában. Orv Hetil. 2010;151:885-92.

2. Leiszter K, Galamb O, Sipos F, Spisák S. Tóth K, **Valcz G**, Kalmár A, Műzes Gy, Molnár J, Molnár B, Tulassay Z. Az öregedés jelei az emésztőrendszerben. Magy Belorv Arch. 2010;63:19-24.

3. Tóth K, Galamb O, Spisák S, Wichmann B, Sipos F, **Valcz G**, Leiszter K, Molnár B, Tulassay Z.The Influence of Methylated Septin 9 Gene on RNA and Protein Level in Colorectal Cancer. Pathol Oncol Res. 2011;17:503-9. . **IF: 1.483**

DOI:10.14753/SE.2012.1746

4. Janzsó G, **Valcz G**, Thuma A, Szoke B, Lendvai Z, Abrahám H, Kozicz T, Halasy K. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide- immunopositive neuronal elements in the lateral septum: rostrocaudal distribution in the male rat. Brain Res. 201029;1362:40-7. **IF:2,63**

5. Galamb O, Spisák S, Sipos F, Tóth K, Solymosi N, Wichmann B, Krenács T, **Valcz G**, Tulassay Z, Molnár B. Reversal of gene expression changes in the colorectal normal-adenoma pathway by NS398 selective COX2 inhibitor. Br J Cancer. 2010;102:765-73. **IF:4,83**

Az elsőszerzős cikkek impakt faktora: 6,86

Összes impakt faktor: 21,996

DOI:10.14753/SE.2012.1746

10.0. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Értekezésem végén szeretném köszönetemet kifejezni mindazoknak, akik munkám során szakmai és személyes támogatásukkal segítségemre voltak:

- programvezetőmnek, Prof. Dr. Tulassay Zsolt egyetemi tanárnak, akadémikusnak, aki munkám során végig segített és támogatott;
- témavezetőmnek, Dr. Molnár Bélának akinek áldozatos segítőkészsége és támogatása által elsajátíthattam a helyes kutatói szemléletmódot;
- Dr. Sipos Ferencnek, aki mindig pontos, precíz tudásra nevelt és akinek révén megismerhettem a publikálás szabályait;
- Dr. Krenács Tibornak, aki bevezetett a szövettan és az immunhisztokémia cseppet sem egyszerű világába;
- Kónyáné Farkas Gabriella szakasszisztenseknek, hogy a gyakorlati munkám során értékes segítséget nyújtott;
- Prof. Masszi Tamás egyetemi tanárnak és Dr. Hagymási Krisztinának a csontvelőtranszplantált betegek vizsgálatában nyújtott segítségükért;
- Dr. Solymosi Norbertnek és Dr. Wichmann Barnának a statisztikai elemzésekben nyújtott segítségükért;
- Dr. Galamb Orsolyának és Kalmár Alexandra Ph.D. hallgatónak a chip analízishez nyújtott segítségéért;
- Balogh Zsofiának és Csizmadia Annamáriának az ivari kromoszómák kimutatásában nyújtott segítségükért;
- Dr. Tóth Kingának, Dr. Leszter Katalinnak, Dr. Patai Árpádnak, valamint Berczik Máriának támogatásukért és a barátságukért.
- a Sejtanalitikai Laboratóriumban dolgozó összes munkatársamnak támogatásukért;
- és végül, de legkevésbé sem utolsó sorban Édesanyámnak és Édesapámnak, hogy megteremtették azt az anyagi és erkölcsi alapot, amely nélkül munkámat nem végezhettem volna el.