

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

**A HOMOLÓG ÉS HETEROLÓG SEJT-SEJT KOMMUNIKÁCIÓ ÉS
KÖVETKEZMÉNYEINEK VIZSGÁLATA TUMOROS
MIKROKÖRNYEZETET MODELLEZŐ MONO- ÉS KOKULTÚRÁKBAN**

TÓTH LÁSZLÓ

Témavezető: Prof. Dr. Ádány Róza

**DEBRECENI EGYETEM
ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
NÉPEGÉSZSÉGÜGYI ISKOLA
MEGELŐZŐ ORVOSTANI INTÉZET**

DEBRECEN, 2001

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS

- 1.1. Sejt-sejt és sejt-matrix kölcsönhatások a tumor progresszió során 4
- 1.2. A tumor stróma képződése és szerepe 5
- 1.3. A malignus sejtek által termelt humorális faktorok szerepe a tumor progresszió folyamatában 7
- 1.4. Gap junction típusú intercelluláris kommunikáció neoplasztikus folyamatokban 9
- 1.5. Tenascin reexpresszió és szabályozása szolid tumorokban 11

2. CÉLKITŰZÉSEK 14

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

- 3.1. Anyagok 15
- 3.2. Sejtek és sejt-kultúra rendszerek 15
- 3.3. Gap junction típusú intercelluláris kommunikáció mérése 17
- 3.4. A sejtproliferáció mértékének meghatározása BrdU inkorporációs módszerrel... .. 18
- 3.5. A tenascin és a fibroblasztok szimultán megjelenítése kettős immunfluoreszcens jelzéssel 19
- 3.6. Digitális képanalízis 20
- 3.7. Statisztikai módszerek 21

4.	EREDMÉNYEK	
4.1.	Tumor kondicionált médium hatása fibroblasztok intercelluláris kommunikációjára és proliferációjára	22
4.2.	Fibroblasztok tenascin termelésének alakulása melanómasejtek hatására... ..	28
5.	DISZKUSSZIÓ	31
6.	ÖSSZEFOGLALÁS	34
7.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	36
8.	IRODALMI HIVATKOZÁSOK	37
9.	A TÉZISEKHEZ FELHASZNÁLT KÖZLEMÉNYEK	44

1. BEVEZETÉS

1.1 SEJT-SEJT ÉS SEJT-MATRIX KÖLCSÖNHATÁSOK A TUMOR PROGRESSZIÓ SORÁN

A sejtek és a sejtközötti állomány magasabb rendű organizációja (a szöveti architektúra kialakulása) és későbbi reorganizációja bonyolult intercelluláris és sejt-matrix kölcsönhatások eredménye. Ezen kölcsönhatások egyensúlyának megváltozása (azaz a szöveti homeosztázis felbomlása) szükségszerűen maga után vonja a kóros körülményekre jellemző struktúra kialakulását, amely rendszerint fontos szerepet játszik az adott betegség progressziójában is. Ilyen, tipikus strukturális és funkcionális átalakulás a malignus folyamatokat kísérő tumor stroma képződése. A tumor stroma kialakulása és dinamikus átépülése a szöveti mikrokörnyezet litikus és szintetikus folyamatainak aktuális eredőjeként valósul meg¹. Ezen kóros szöveti struktúrák létrejöttében a tumorsejteknek a gazdaszervezet környező sejtjeire (elsősorban a fibroblasztokra) gyakorolt hatásai alapvető szerepet játszanak. A malignus sejtek és a gazdaszervezet sejtjei közötti kölcsönhatások több úton (ill. ezek kombinációja révén) jöhetnek létre és fejthetik ki hatásukat: (1) növekedési faktorok és egyéb, a sejtciklust szabályozó anyagoknak a szekréciója ill. ezek parakrin hatásai révén, (2) sejt-sejt és sejt-matrix komponensek kölcsönhatásai révén, (3) a szomszédos sejtek gap junction csatornáin keresztül intracelluláris modulátor vegyületek közvetlen cseréje által².

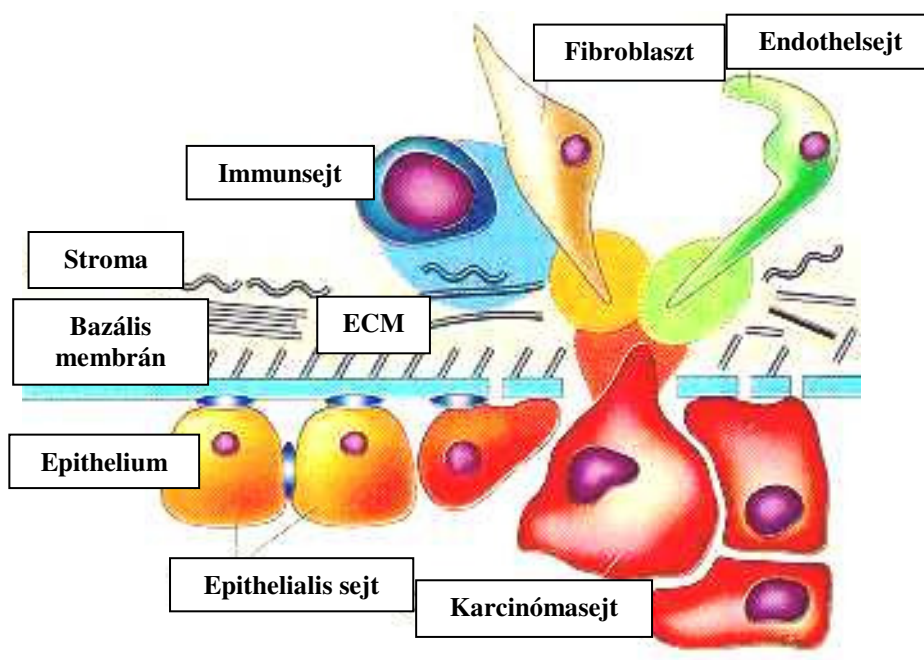
A malignus folyamatok progressziója során nemcsak a neoplasztikus sejtek kontrollálatlan szaporodása következik be, de a szöveti környezet is jellegzetesen átépül, jellemzően oly módon, hogy ezzel elősegíti a tumorsejtek túlélését és későbbi

szóródását is. A tumorszövetben mindig elkülöníthető (bár az elkülönültség mértéke igen variábilis lehet) a tumorsejtek által alkotott parenchyma és a tumor stróma, amely gazdaszervezet eredetű sejtes elemeket és extracelluláris matrixot tartalmaz. Ma már elfogadott hogy a tumor stróma szerkezete, az abban fellelhető sejtes elemek működése erősen befolyásolja a malignus folyamat progresszióját. Ezen élettani folyamatok és kölcsönhatások a jövőben új terápiás targetként szolgálhatnak és az erre épülő ún. strómális terápia a citotoxikus kezeléseket kiegészítve javíthatja ezen betegségek prognózisát³.

1.2 A TUMOR STRÓMA KÉPZŐDÉSE ÉS SZEREPE

A tumorszövetet és annak mikrokörnyezetét vizsgálva, -a normál szövetekkel összehasonlításban-, szolid tumorokban jellegzetes mennyiségi és minőségi eltéréseket figyelhetünk meg mind a sejtes elemek, mind az extracelluláris matrix komponensek összetételében. Ezen eltérések lehetnek általánosak és a tumor hisztotípusára jellemzőek. A sejtes elemek funkcionális és mennyiségi változásaiban általánosan jellemző az immunsejtek (limfociták, dendritikus sejtek, monociták és granulociták), simaizomsejtek, fibroblasztok és endothelsejtek stromalis felszaporodása és reaktivációja^{3,4} (1. ábra). Karcinómákra jellemző egyes proteoglikánok és kollagén típusok (I-es, III-as és IV-es típusú kollagén), valamint a fibronektin és az elasztin fokozott depozíciója a tumor matrixban ill. a tenascin reexpressziója⁵. Vastagbél tumorok strómális régiójában a kondroitinszulfát- és decorin proteoglikán fokozott depozícióját figyelték meg és kimutatták, hogy e két matrix komponens génje a strómális sejtekben hipometilált, amely feltételezhetően fontos szerepet játszik ezen

menyiségi és minőségi változások génexpressziós szabályozásában^{6,7}. A tumor matrix ezen mennyiségi és minőségi eltérései sok esetben olyan jelentősek, hogy a szakirodalom dez-moplázia-ként jellemzi a jelenséget⁸. Ezen folyamatok sejt-kultúra rendszerekben is jól modellezhetők és tanulmányozhatók. Noel és munkatársai az I-es, III-as és IV-es típusú kollagén és a fibronectin fokozott szintézisét figyelték meg emlő adenokarcinóma sejtekkel együtt tenyésztett fibroblaszt kultúrákban, de a jelenség nem volt előidézhető normál emlősejtek és keratinociták ill. fibroblasztok kokultúrájában⁹. Colon karcinóma sejtekkel kondicionált médium hatására a colon fibroblasztok proteoglikán szintézise többszörösére növekedett¹⁰.



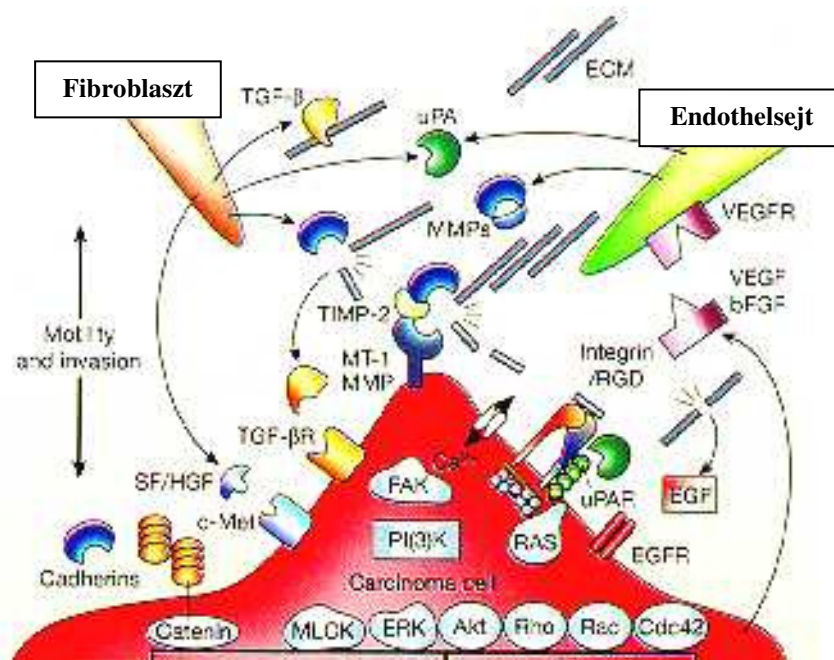
1. ábra: A tumor-gazdaszervezet határfelületén létrejövő celluláris kölcsönhatások
 [Liotta és Kohn nyomán³]

Az extracelluláris matrix ilyen jellegű átépülése és a tumorsejtek mikrokörnyezetében létrejövő fokozott proteolízis együttesen a matrix fellazulásához vezet, ami elősegíti a tumorsejtek vándorlását, lokális invázióját, majd vér- és nyirokrendszerbe jutását. Az extracelluláris matrix és a bazális membrán komponenseinek degradációját matrix metalloproteázok, adamalysin-szerű membrán proteázok, BMP-1-es típusú metalloproteázok és szöveti szerin proteázok (szöveti plazminogén aktivátor, urokináz, trombin és plazmin) végzik^{11,12}. Számos kísérleti eredmény és megfigyelés alapján ma már azt mondhatjuk, hogy a tumorsejtek nem csak kontrollálatlanul szaporodnak a gazdaszervezetben, hanem képesek a szervezet élettani folyamatait is olyan irányba befolyásolni, mellyel kedvező mikrokörnyezetet teremtenek saját túlélésükhöz. A strómális fibroblasztok mellett a tumorsejtek is képesek egyes matrix komponensek szintézisére, azonban a tumorsejtek matrix produkciójának mértéke rendszerint kisebb, mint a strómális sejteké¹³.

1.3. A MALIGNUS SEJTEK ÁLTAL TERMELT HUMORÁLIS FAKTOROK SZEREPE A TUMORPROGRESSZIÓ FOLYAMATÁBAN

Ma már jól ismert, hogy a neoplasztikus sejtek makromolekuláris faktorok és enzimek szekvenciális szekréciója révén stimulálják saját szaporodásukat és alakítják át mikrokörnyezetüket. Ezek elsősorban növekedési faktorok, kemoattraktánsok, adhéziót moduláló fehérjék és enzimek ill. azok inhibitorai¹⁴. Ezek a, gyakran mitogén, fehérjék a tumorsejt receptoraihoz kapcsolódva azt autonóm szaporodásra készítetik és sejttípustól, ill. receptorprofiljától függő válaszokat indukálnak a környező szöveti sejtekben is. Ez utóbbiak esetében már nem a mitogén, hanem a metabolikus

válaszreakciók dominálnak. Ilyen tumorsejtek által szekretált növekedési faktorok az epidermális növekedési faktor (EGF), a transforming growth factor- α (TGF- α), a bázikus fibroblaszt növekedési faktor (bFGF), a vérlemezke eredetű növekedési faktor (PDGF), a vascular endothelial growth factor (VEGF), az insulin-like growth factor (IGF), a hepatocyte growth factor (HGF) és a transforming growth factor- β (TGF- β). Az EGF családba tartozó növekedési faktorok (EGF, TGF- α) elsősorban mitogén hatással rendelkeznek. Szintézisük transzmembrán prekuzoron keresztül valósul meg, amely már ezen formájában is aktív és képes a szomszédos sejtek EGF-receptorainak aktiválására. A TGF- β elsődleges szerepe a fibroblasztok aktivációja. Sejtkultúrában elősegíti mind a fibroblasztok proliferációját és azok extracelluláris matrix termelését is képes többszörösére növelni. A PDGF, VEGF és a bFGF elsősorban a tumor angiogenezis és az érpermeabilitás szabályozásában játszik szerepet¹⁵⁻¹⁹.



2. ábra: Humorális kölcsönhatások a tumor invazív zónájában. [Liotta és Kohn nyomán³]

A tumorsejtek által termelt növekedési faktorok nagy száma és a tumorprogresszió részfolyamataiban betöltött sokrétű szerepe alapján azt mondhatjuk, hogy a növekedési faktorokból egy szignalizációs hálózat épül fel, amely képes kontrollálni és alárendeltté tenni a környező normál sejtek működését is. Egyes feltételezések szerint a metasztatizáló tumorsejtklónok szöveti preferenciájában és megtapadásában is fontos szerepe van az adott szövet vagy célszerv által létrehozott növekedési faktor milliőnek.

A tumorsejtek és mikroö környezetük között létrejövő szignalizáció másik típusa a matrix komponensek és azok integrin receptorai által közvetített jelátvitel. A heterodimer struktúrájú integrin fehérjék nem csak, mint „molekuláris ragasztó” rögzítik a sejteket, de képesek számos klasszikus intracelluláris szignálút vonal aktiválására is, és így fontos szerepet játszanak a malignus sejtek túlélésében (pl. az apoptózis kivédésében a fokális adhéziós kináz aktivációja révén) és migrációjában^{20,21}.

1.4 GAP JUNCTION TÍPUSÚ INTERCELLULÁRIS KOMMUNIKÁCIÓ NEOPLASZTIKUS FOLYAMATOKBAN

A gap junctionok olyan, a szomszédos sejteket összekötő fehérjetermészetű csatornák, amelyek lehetővé teszik az 1000 Da-nál kisebb molekulák és ionok cseréjét passzív diffúzió révén és így alapvető szerepet játszanak a sejtproliferáció és differenciáció, ill. a szöveti homeosztázis szabályozásában^{22,23}. Több sejt citoplazmájának ilyen típusú integrációját és a kis molekulatömegű szabályozó anyagoknak a gap junction csatornákon keresztüli kicserélődését nevezzük gap junction típusú intercelluláris kommunikációnak (GJIC). A gap junction csatornák connexin hexamerekből épülnek fel, melyek foszforilációs helyei által a csatornák nyitottsága fiziológiásan szabályozott.

A gap junction csatornák előfordulása a különböző szövetekben általánosnak mondható és számos, nem tumoros eredetű, sejtvonal expresszál connexin fehérjéket, ill. mutat kiterjedt intercelluláris kommunikációt sejt kultúrában is. Azon megfigyelések, hogy a legtöbb tumor promoter vegyület (pl. forbolészterek: TPA, PDBu) képes reverzibilisen gátolni a GJIC-t és hogy, malignus sejtvonalak nem, vagy alig expresszálnak connexin fehérjéket arra utalnak, hogy a gap junction csatornák elvesztése és a sejtek közötti kommunikáció megszűnése egyik fontos mozzanata a tumorsejt proliferáció megindulásának²⁴⁻²⁶. Ezt támasztja alá az a megfigyelés is, hogy connexin-43 génnel transzfektált glioblasztóma sejt kultúrákban és connexin-26 génnel transzfektált emlő karcinóma sejtekben a sejtproliferáció csökkenése és a transzformált fenotípus megszűnése észlelhető²⁷⁻²⁹. A szöveti környezetben a GJIC mértékét számos növekedési faktor és hormon képes befolyásolni. A tumorsejtek által nagy mennyiségben szintetizált növekedési faktorok közül az EGF, a PDGF és a HGF/SF csökkenti, míg a TGF- β általában növeli a sejtek közötti kommunikációt³⁰⁻³². Ezen szabályozás elsősorban a connexin fehérjék foszforilációja (protein kináz-A, protein kináz-C) révén valósulhat meg, azonban a csatornát alkotó fehérjék rapid turnover a fehérjebioszintézis általi szabályozást is lehetővé teszi.

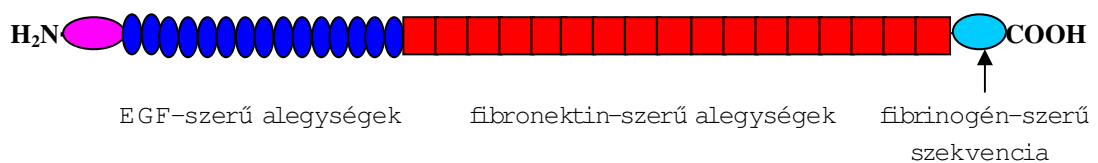
A GJIC a sejtciklus egyes fázisaiban (az S-fázisban, a G₁ és az S fázis határán, valamint a mitózis során) és onkogéntermékek hatására csökken^{22,33,34}. Patkánymáj modellen megfigyelték, hogy a connexin-32 gap junction fehérje expressziója és a sejtproliferáció fordított korrelációt mutat³⁵.

Kokultúra modell kísérletekben eltérő GJIC-vel jellemezhető tumorsejtvonalaknak a környező normál sejtrétegbe történő penetrációs képességét vizsgálva megállapították, hogy a legnagyobb fokú invazivitást azok a tumorsejtek mutatják, amelyek GJIC-ja a

legmagasabb³⁶. Megfigyelték továbbá, hogy intercelluláris kommunikációt mutató, nem transzformált WB-F344 patkány májsejtek gátolják a homológ eredetű Ha-ras és neu onkogénekkal transzformált máj epithelsejtek szaporodását, míg ez a jelenség nem volt megfigyelhető, ha a normál májsejteket GJIC deficiens sejtvonallal helyettesítették³⁷.

1.5. TENASCIN REEXPRESSZIÓ ÉS SZABÁLYOZÁSA SZOLID TUMOROKBAN

A tenascin 1900 kDa tömegű homohexamer struktúrájú glikoprotein. Monomerjei szintén alegység struktúrájúak: 13 EGF-szerű, 9–15 III-as típusú fibronectin és egy C-terminális helyzetű, fibrinogén-szerű doménből épülnek fel (3. ábra). A monomerek N-terminális végükön, centrális globuluson keresztül diszulfid kötésekkel kapcsolódnak össze^{5,38}.



3. ábra: Humán tenascin-monomer domén szerkezete [Hauptmann és mtsai. nyomán³⁸]

1983 és 1985 között több laboratórium egymástól függetlenül írta le az alábbi neveken: G M E M (glióma mesenchymális extracelluláris matrix), hexabrachion, myotendinous antigén, J1 és citotaktin. Ezen elnevezések egyrészt a molekula szöveti előfordulására (glia, porc), másrészt szerkezetére utalnak. A tenascin elnevezést Chiquet-Ehrismann javaslatára vezették be³⁹. Jelenlétét kimutatták az embriogenezis során a csont és procképződés helyein, az emlőmirigy, a bőr, a fogak, a vese és a központi idegrendszer telepeiben⁶. Már ezen megfigyelések is utaltak arra, hogy a tenascin expressziója jól körülhatárolt és mindig a szervezet valamilyen sejt-vándorlással járó, morfogenetikus folyamatához köthető⁴⁰. Normál, felnőtt szövetekben tenascin expresszió nem, vagy csak nagyon korlátozott mértékben (a vese és a csontszövet, ill. a bőr bizonyos régióiban) figyelhető meg. Sebgyógyulás során a granulációs szövetben³⁹ és erősen proliferáló benignus tumorokban viszont jelentős tenascin akkumuláció figyelhető meg, melyekben a tenascin a folyamatot kísérő fokozott sejt-vándorlás egyik modulátora és szubsztátja lehet⁴¹. A tenascin reexpresszióját és fokozott depozícióját figyelték meg a legtöbb malignus tumor strómális régiójában is^{42,43}. Nagymértékű tenascin expresszió észlelhető gliómákban, vastagbél karcinómákban, a tüdő, a vesék, a bőr, a nyelőcső, a gyomor, a hasnyálmirigy és a petefészkek primer tumoraiban és azok metasztázisaiban⁵. Laryngeális és hypopharyngeális tumorokban intenzív tenascin akkumuláció figyelhető meg a tumorsejtfészkek és a környező normál szövetek határfelületén⁴⁴. Egyes, jellemzően előrehaladott tumoros esetekben a tenascin kimutatható a betegek szérumból is⁴⁵. A tenascint egy olyan onkofetális markernek tekintjük, melynek megjelenése erősen kötődik a szervezet sejt-vándorlással járó folyamataihoz. A tenascin sejt-kultúrában gátolja a sejtek kitapadását^{45,46}. Ezen hisztopathológiai és in vitro megfigyelések alapján feltételezik, hogy a tenascin alapvető szerepet játszik a tumor

progresszió sejtváándorlással járó folyamataiban, vagyis a neoplasztikus sejtek lokális inváziójában és a metasztázisképzésben.

A stromalis sejtek tenascin termelésének szabályozásában alapvető szerepet játszanak a már korábban ismertetett, tumorsejtek által szekretált növekedési faktorok. MCF7 emlőkarcinóma sejtek kondicionált médiuma szignifikánsan növelte fibroblasztok tenascin és fibronectin termelését. További vizsgálatok a TGF- β növekedési faktor szerepét tisztázták az indukció létrejöttében⁴⁷. Az EGF és a TGF- α növekedési faktorok szintén képesek tenascin szintézist indukálni sejt kultúra modellrendszerekben⁴⁸. Ezen növekedési faktorok által mediált hatások mellett azonban egyéb autokrin és parakrin szabályozó mechanizmusok szerepe sem zárható ki a tenascin termelés szabályozásában a neoplasztikus folyamatok kapcsán.

2. CÉLKITŰZÉSEK

A daganatprogresszió és invázió kapcsán játszódó tumorsejt-fibroblaszt kölcsönhatások tanulmányozására homológ és heterológ sejt-kultúra modellrendszereket hoztunk létre melyeken a gap junction típusú intercelluláris kommunikációt és a tenascin depozíciót tanulmányoztuk.

Vizsgálatainkkal az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

A. Tumorsejtekkel kondicionált médium hatására

- 1.1. – hogyan változik egér fibroblasztok GJIC-ja,
- 1.2. – hogyan változik a fibroblasztok proliferációja,
- 1.3. – az intercelluláris kommunikáció és a proliferáció változása milyen összefüggést mutat.

B. Fibroblaszt-melanóma sejt kultúrákban

- 1.4. – észlelhető-e tenascin gén reexpresszió a tenyésztés során,
- 1.5. – a tenascin depozíció mutat-e sajátos eloszlást, ill. milyen viszonyban van a kultúra sejtjeivel,
- 1.6. – a tenascin fokozott produkciójában milyen jelátviteli mechanizmus(ok) játszhat(nak) szerepet.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1 ANYAGOK

A Lucifer Yellow CH fluoreszcens marker-festék, a Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) tápfolyadék, a Triton X-100 (TRX-100) detergens, a 5-bromo-2'-deoxiuridin (BrdU) és az anti egér IgG-fluoreszcein izotiocianát (FITC) a Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) terméke. A fetális borjúsavót (FBS) a Bioproduct KFT-től (Gödöllő, Magyarország) szereztük be. Az egér anti-BrdU immunsavó a Boehringer Mannheim (Mannheim, Németország), a cellulóz észter dializáló membrán (MWC0: 500, Spectra Por®) a Serva (Heidelberg, Németország,) cégek termékei. A nyúl anti-humán tenascin immunsavót a Chemicon (Temecula, CA, USA), a prolil-4-hidroxiláz enzim ellen termeltetett egér anti-humán fibroblaszt monoklonális antitestet a DAKO A/S (Glostrup, Dánia), a FITC-el konjugált ló anti-egér IgG-t és a biotinált kecske anti-nyúl szérumot illetve a Texas red-streptavidint és a DAPI-t (4,6-diamidino-2-fenilindol) tartalmazó Vectashield médiumot a Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA) állította elő. A műanyag slide flaskákat a Nalge Nunc International-tól (Roskilde, Dánia), míg a 0.2 μ m pórusmérésű Acrodisc steril szűrőket a Pall Corporation-tól (Ann Arbor, MI, USA) szereztük be.

3.2 SEJTEK ÉS SEJTKULTÚRA RENDSZEREK

SEJTEK

A WiDr, az Int 407 és a HFFF2 sejtvonalak a European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC, Salisbury, UK) gyűjteményéből származnak. A HT-168-M1 metasztatikus melanóma sejtvonal az A2058 jelű standard melanóma sejtvonal erősen

metasztatikus szubklónja amelyet egér máj metasztázis modellben Ladányi Andrea és munkacsoportja állított elő és karakterizált⁴⁹. A Balb/c 3T3 egér fibroblaszt sejtvonal Dr. H. Yamasakitól (IARC, Lyon, Franciaország) származott. A sejteket standard módon 10 % fetális borjú savót tartalmazó DMEM tápfolyadékban 37°C-on 5 % CO₂-ot tartalmazó atmoszférában tenyésztettük és hetente kétszer passzáltuk.

Az egyes sejtvonalak jellemző adatai:

- WiDr, epitheliális morfológiájú, humán colon adenokarcinóma sejtvonal. ECCAC No.: 85111501
- Int 407, epitheliális morfológiájú, embrionális bélhám eredetű sejtvonal. ECCAC No.: 8505051004
- Balb/c 3T3, egér embrionális fibroblaszt sejtvonal. ECCAC No.: 90030803
- HT-168 M1, az A2058 jelű (ECCAC No.: 91100402) humán melanóma sejtvonal erősen metasztatikus szubklónja.
- HFFF2, humán embrionális fibroblaszt sejtvonal. ECCAC No.: 86031405

TUMOR ÉS NORMÁL SEJTEKKEL KONDICIONÁLT MÉDIUM ELŐÁLLÍTÁSA

WiDr, Int 407 és HT-168 M1 sejteket oltottunk 75 cm² felületű tenyésztőedénybe a sejtek sorrendjének megfelelően 1.5×10^6 , 2.1×10^6 és 2×10^5 sejtszámmal. A sejteket 10 % fetális borjú savót tartalmazó DMEM tápfolyadékban a kultúra konfluenssé válásáig (5 napig) tenyésztettük. Ezután a tápfolyadékot leszívtuk és 1 órán át 1500g fordulatszámmal centrifugáltuk a sejtörmelék eltávolítása céljából, majd 1 napig 10-20X-os mennyiségű DMEM+10 % FBS tápfolyadékkal szemben dializáltuk, hogy visszapótoljuk az elhasznált tápanyagokat a tápfolyadékba. Párhuzamosan sejtmentes

kontroll tápfolyadékot készítettünk, amelyet a tenyésztési körülmények között inkubáltunk, majd a kondicionált médiumokkal azonos módon kezeltünk. Az így kapott tumor- és normál sejtekkel kondicionált és kontroll médiumot használtuk a továbbiakban a fibroblasztok kezelésére.

SEJT TENYÉSZTÉS MONO- ÉS KOKULTÚRÁKBAN

Melanómasejteket (1.75×10^4) és fibroblasztokat (3.5×10^4) külön-külön (monokultúrákban) és együtt (kokultúrákban) tárgylemezként használható felületű tenyésztőedényekbe oltottunk és a sejteket a konfluens állapot eléréséig (5 napig) tenyésztettük. Immunhisztokémiai megjelenítést követően a tárgylemezen lévő monolayerben vizsgáltuk a tenascin depozíció mértékét és eloszlását. Kontrollként a fibroblaszt és melanóma monokultúrákat és a jelátvitel módjának tanulmányozása céljából melanóma sejtekkel kondicionált médiumban tenyésztett fibroblaszt monokultúrákat vizsgáltunk.

3.3 GAP JUNCTION TÍPUSÚ INTERCELLULÁRIS KOMMUNIKÁCIÓ MÉRÉSE

A tumorsejtek által kiválasztott humorális mediátorok hatását a fibroblasztok intercelluláris kommunikációjára és proliferációjára szubkonfluens Balb/c 3T3 kultúrákon vizsgáltuk, melyeket tumor (WiDr) sejtekkel és normál (Int 407) sejtekkel kondicionált médiumokkal, valamint kontroll médiummal kezeltünk. Az intercelluláris kommunikáció és ezzel párhuzamosan a sejtproliferáció alakulását a kultúrák posztkonfluens fázisáig követtük nyomon.

A sejtek közötti gap junction típusú intercelluláris kommunikáció szintjét a Lucifer Yellow CH fluoreszcens festék mikroinjektálását követően, sejtről-sejtre történő terjedésének mértéke alapján határoztuk meg. A sejtekbe üvegapilláris segítségével, Zeiss (Oberkochen, Németország) Axiovert 135 típusú mikroszkóphoz csatlakoztatott mikromanipulátor és Eppendorf mikroinjektor (Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Németország) segítségével injektáltuk a fluoreszcens marker-festéket (10% 0,33 M-os lítium klorid oldatban) és 10 perc elteltével meghatároztuk a festéket tartalmazó szomszédos sejtek számát. A mikroinjektáláshoz használt üvegapillárist horizontális pipettahúzó eszköz (Sutter Instrument, Novato, CA) segítségével állítottuk elő. Mivel a Lucifer Yellow CH csak a gap junction csatornákon keresztül képes a szomszédos sejtekbe jutni, terjedésének mértéke a csatornák fiziológiai állapotának függvénye.

3.4 A SEJTPROLIFERÁCIÓ MÉRTÉKÉNEK MEGHATÁROZÁSA BrdU INKORPORÁCIÓS MÓDSZERREL

A Balb/c 3T3 sejtek proliferációjának alakulását a sejtek S-fázisa során a bromodeoxyuridin (BrdU) DNS-be történt beépülésének mértéke alapján határoztuk meg. A sejteket 1 órán át tenyésztettük 10 $\mu\text{mol/l}$ BrdU-t tartalmazó tápfolyadékban majd a beépült BrdU-t indirekt immunhisztokémiai reakcióval jelenítettük meg. 70 %-os etanol fixálást követően a sejteket denaturáltuk 0.5% Triton X-100 detergenst tartalmazó 2.5 mol/l-es sósavoldattal majd PBS mosást követően az aspecifikus kötőhelyeket 0.1 % Triton X-100-at tartalmazó 1.5 %-os Carnation tejporoldattal blokkoltuk (10 perc). A sejteket PBS pufferrel mostuk és egér anti-BrdU ellenanyaggal (1:500) 1 órán át inkubáltuk. A beépült BrdU-t FITC-el jelölt nyúl anti-egér

immunoglobulinnal (1:1000) jelöltük. A sejtmagok feltüntetésére propidium-jodid (1:20, 7s) utánfestést alkalmaztunk. Ezután mikroszkóp alatt meghatároztuk azon sejtfrakció arányát, amely BrdU-t épített be a tenyésztés során. Ezt az arányszámot használtuk a továbbiakban a sejtproliferáció jellemzésére.

3.5 A TENASCIN ÉS A FIBROBLASZTOK SZIMULTÁN MEGJELENÍTÉSE KETTŐS IMMUNFLUORESZCENS JELZÉSSEL

A kokultúrák és a monokultúrák monolayerén indirekt immunhisztokémiai reakciót végeztünk a tenascin kimutatására. Kokultúrában a tenascin jelzést követően a prolyl-4-hidroxiláz fibroblaszt marker enzimét jelölő immunhisztokémiai reakciót is elvégeztük.

A sejteket 4%-os paraformaldehid oldatban 30 percig fixáltuk, majd az aspecifikus kötőhelyeket 20%-os normál humán szérummal blokkoltuk 15 percig. Ezután a lemezeket 1:100 hígítású nyúl anti-humán tenascin immunreagenssel inkubáltuk 1 órán át. PBS mosást követően biotinált kecske anti-nyúl IgG-vel (1:250, 30 perc) és Texas red-streptavidinnel (1:40, 45 perc) inkubáltuk a lemezeket két egymást követő lépésben.

A kokultúrákat a továbbiakban egér anti-humán prolyl-4-hidroxiláz monoklonális antitesttel (1:50, 1 óra) és fluoreszcein izotiocianáttal (FITC) konjugált ló anti-egér szérummal inkubáltuk a fibroblasztok megjelenítése céljából. Ezután a lemezeket DAPI magfestéket tartalmazó Vectashield médiummal fedtük a fluoreszcens markerek korai kiégését megelőzendő. Negatív kontrollként kokultúra sejtréteget első lépésként normál nyúl és egér szérummal inkubáltunk az immunszérumokkal azonos hígításban majd a további lépéseket a fent leírtakkal azonosan végeztük el.

3.6 DIGITÁLIS KÉPANELÍZIS

A tenascin reakció kvantitatív és kvalitatív értékelését Axioplan típusú (Zeiss, Oberkochen, Németország) fluoreszcens mikroszkóphoz csatolt fekete-fehér CCD kamera (IMAC-CCD, Sony, Tokió, Japán) és fluoreszcens képanalizáló rendszer (ISIS, Metasystems, Altlussheim, Németország) segítségével végeztük. A rendszer beállítását és tesztelését korábban humán neutrofil granulocita sejtpreparátumokon végeztük el⁵⁰.

A tenascin expresszió kvantitatív elemzése céljából fluoreszcens felvételeket készítettünk 40X objektív nagyításnál, 768x574 pixel felbontás és 8 bites intenzitás skála alkalmazása mellett (256 szürkeségi szint). A látóteret, standard módon, mindig azonos ideig exponáltuk (1s) a kultúrákban. A fluorokromokat többsávos filterrendszer [amely háromsávos (440-, 520-, és 580 nm) emissziós filterből és az egyes fluorokromokra külön excitációs filterből (Texas red: 570 nm, FITC: 490 nm) állt] segítségével gerjesztettük ill. detektáltuk.

A vörös (tenascin) fluoreszcenciát az egyes felvételeken integráltuk és a kapott értéket a sejtszámra vonatkoztattuk. Az egyes kokultúrák 20-70 random módon kiválasztott területén végeztünk kvantitatív analízist.

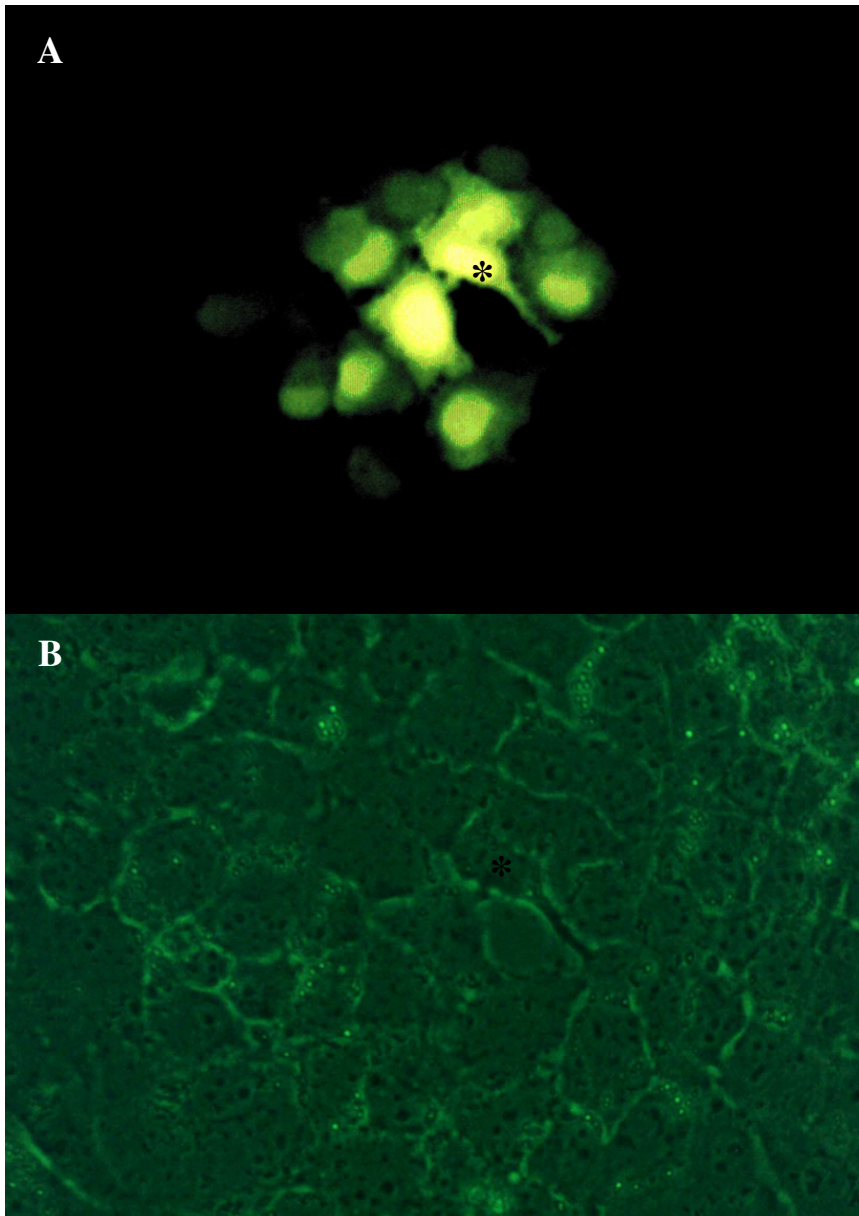
3.7 STATISZTIKAI MÓDSZEREK

Az intercelluláris kommunikáció eltéréseit Student-féle t-próbával teszteltük és $p < 0,05$ szinten fogadtuk el szignifikánsnak. A tenascin depozíció kokultúrán belüli eltéréseinek analízise során az egy fibroblasztra jutó fluoreszcencia intenzitást ábrázoltuk a melanóma sejt/fibroblaszt arány függvényében és a kapott ponthalmazra lineáris regressziót végeztünk.

4. EREDMÉNYEK

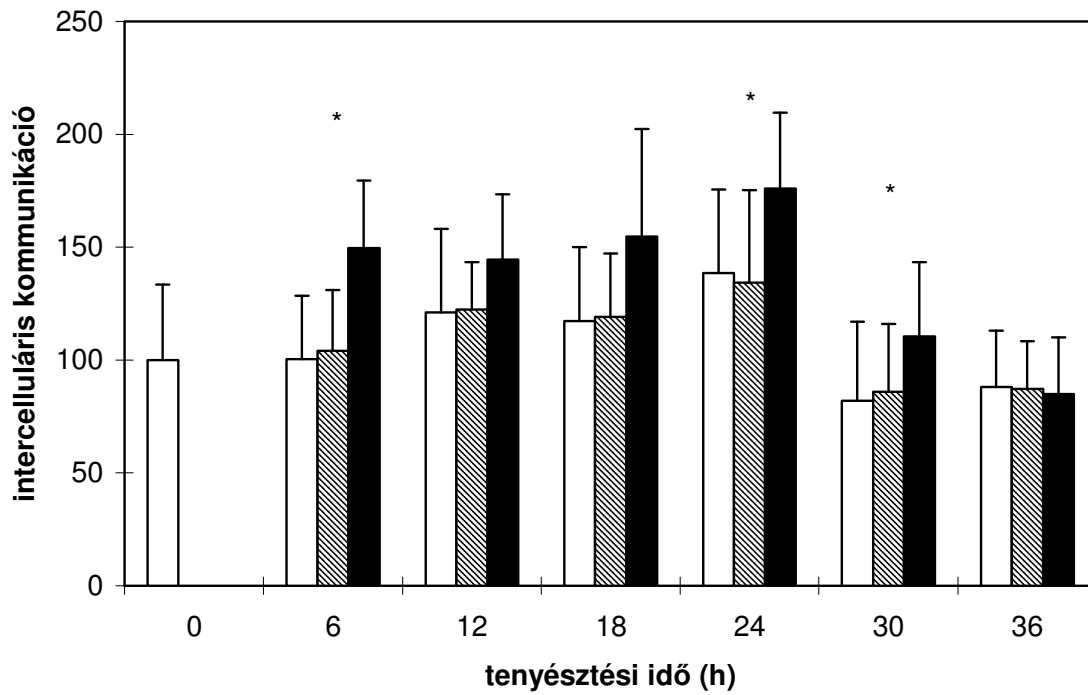
4.1 TUMOR KONDICIONÁLT MÉDIUM HATÁSA FIBROBLASZTOK INTERCELLULÁRIS KOMMUNIKÁCIÓJÁRA ÉS PROLIFERÁCIÓJÁRA

Kísérleteinkben tumor kondicionált-, normál bélepithelsejtekkel kondicionált- és kontroll (sejmentes körülmények között inkubált) tápfolyadékban tenyésztett Balb/c 3T3 fibroblaszt kultúrákon követtük nyomon az intercelluláris kommunikáció és a sejtproliferáció alakulását, annak megállapítására hogy a tumorsejtek szekréción termékei hogyan befolyásolják a peritumorális fibroblasztok GJIC-jának alakulását. A GJIC meghatározását a korábban leírt festék mikroinjekciós módszerrel végeztük, a kezelt kultúrák szubkonfluens fázisától a posztkonfluens fázisig 6 óránként meghatározva a festéktranszfer és ezzel párhuzamosan a BrdU inkorporáció mértékét. A kezelés kezdetén (0 h), alapállapotban, a fibroblasztok kiterjedt GJIC-t mutattak (15–25 kapcsolt sejt/injektálás) (4.ábra), a továbbiakban az ebben az időpontban mért GJIC-t tekintettük referencia értéknek. Mindkét kontrollként értékelt kultúrában (a normál bélepithel sejtekkel kondicionált- és a kontroll médiummal kezelt kultúrában egyaránt) a sejt-sejt kommunikáció kismértékű, nem szignifikáns emelkedése volt megfigyelhető, ami a kezelés 30. órájától az eredeti szint alá csökkent. A GJIC a két kontroll kultúrában mindvégig hasonlóan alakult a kísérlet során. Tumor kondicionált médiummal történt kezelés hatására a fibroblasztok intercelluláris kommunikációja már a hatodik órára szignifikánsan, 49 %-al, emelkedett. Az intercelluláris kommunikáció a TCM kezelt kultúrákban a kezelés végéig 25–40 %-al magasabb volt, mint a kontroll kultúrák azonos időpontban mért értékei (5. ábra).



4. ábra: Balb/c 3T3 fibroblaszt kultúra intercelluláris kommunikációja alapállapotban.

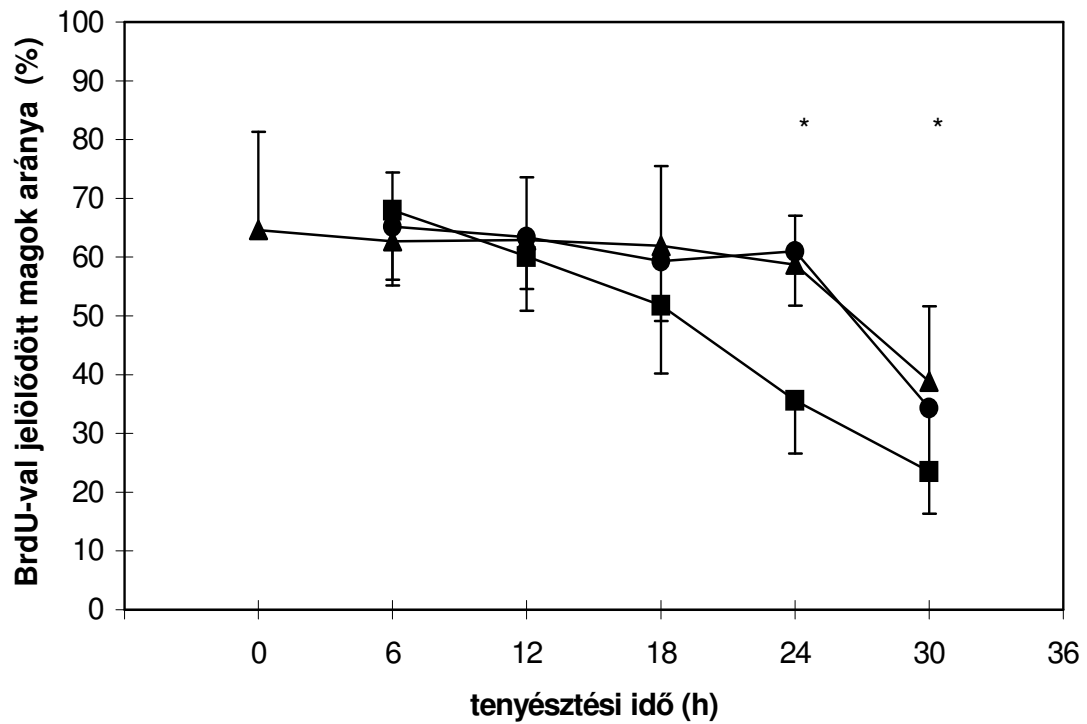
A., fluoreszcens festéktranszfer a fibroblasztok között, B., az azonos területről készült fáziskontraszt felvétel. Az injektált sejt (*)-al jelölve.



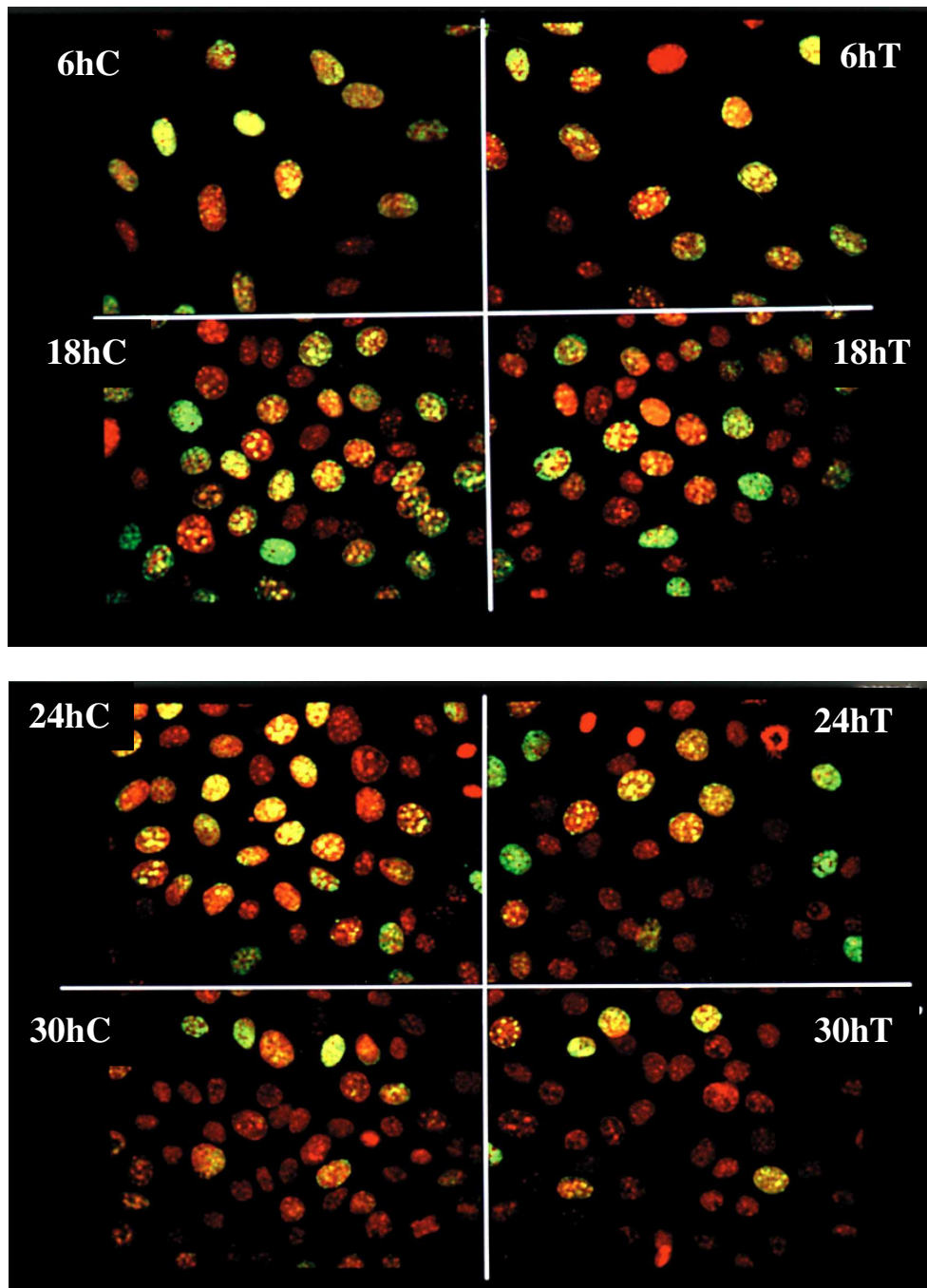
5. ábra: Tumor kondicionált médium hatása Balb/c 3T3 fibroblasztok intercelluláris kommunikációjára. Kontroll (□), normál sejtekkel kondicionált (▨), és tumor kondicionált médiummal (■) kezelt fibroblasztok sejt-sejt kommunikációjának változása a kezelési idő függvényében. * Szignifikánsan eltér a kontrolltól.

A kísérlet utolsó mérési időpontjára a sejt-sejt kommunikáció mértéke mindhárom kultúrában jelentősen visszaesett, valószínűleg a kultúrák posztkonfluenssé válásának következményeként.

Az intercelluláris kommunikáció meghatározásával párhuzamosan BrdU inkorporációs módszerrel vizsgáltuk a sejtproliferáció alakulását. A kontroll kultúrákban a BrdU inkorporáció mértéke közel állandó volt, egészen a kezelés 24. órájáig, amikor a kultúrák posztkonfluens fázisba kerülésével a sejtproliferáció mértéke is jelentősen (58 %-ról 38 %-ra) visszaesett. A TCM kezelés hatására a proliferáló sejtek arányának folyamatos csökkenése következett be, ami a 24. és a 30. órában szignifikáns (23 és 14 %-os) különbséget mutatott a kontroll médiummal kezelt kultúrákon mért értékekhez viszonyítva (6., 7. ábra).



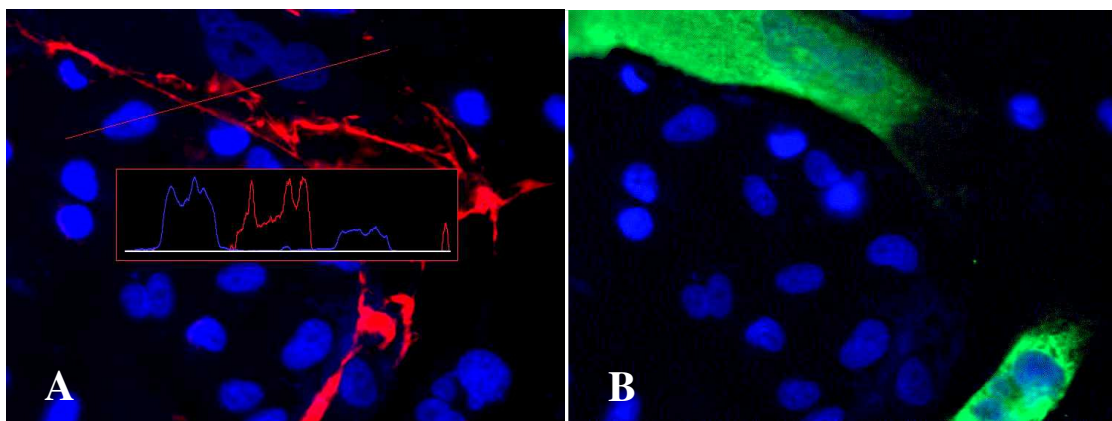
6. ábra: Tumor kondicionált médium hatása a sejtproliferációra. Kontroll médiumban (▲), normál bélepithelsejtekkel kondicionált médiumban (●) és tumor kondicionált médiumban (■) tenyésztett fibroblasztok BrdU beépítésének mértéke. * Szignifikánsan eltér a kontrolltól.



7. ábra: Fibroblasztok BrdU inkorporációjának alakulása tumor kondicionált (T) és kontroll (C) tápfolyadék hatására. A BrdU immunhisztokémiai megjelenítését követően a sejtciklus S-fázisában lévő sejtmagok zöld, míg az összes sejtmag a propidium-jodidos magfestés eredményeként, piros színnel jelölt.

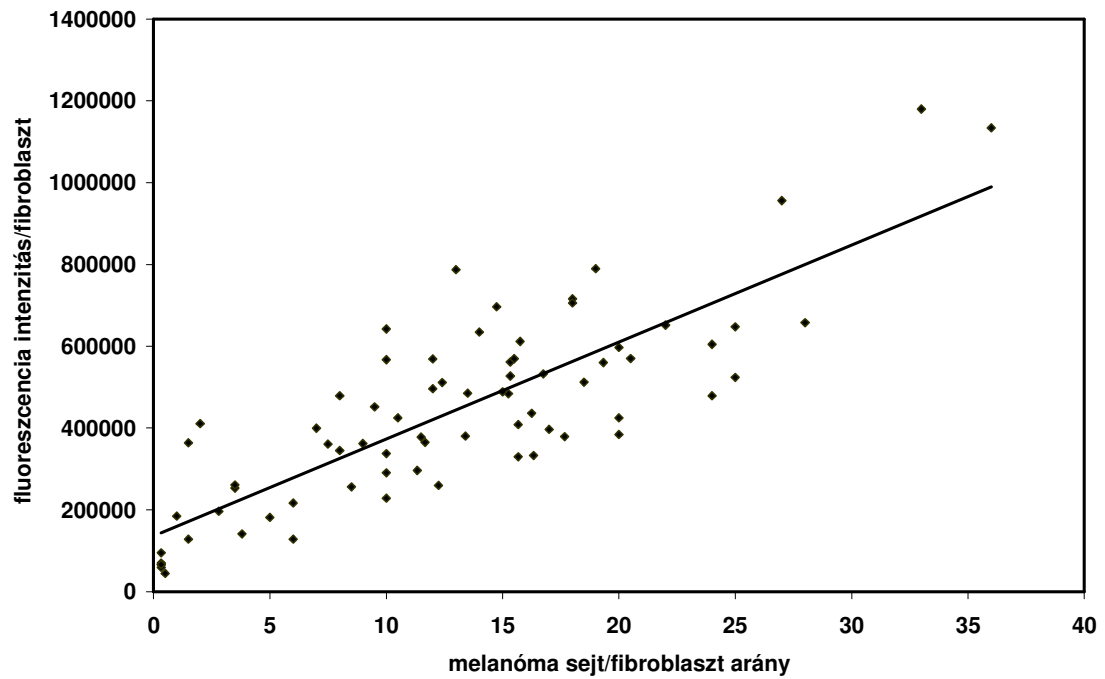
4.2 FIBROBLASZTOK TENASCIN TERMELÉSÉNEK ALAKULÁSA MELANÓMASEJTEK HATÁSÁRA

Melanóma ill. fibroblaszt monokultúrákban és a két sejtípust kokultúraként, együtt tenyésztve értékeltük a tenascin termelődés alakulását, az egyes kultúrák sejtrétegén immunhisztokémiai megjelenítést követően, digitális képanalízis segítségével. Mindkét (melanóma és fibroblaszt) monokultúrában igen gyenge, a negatív kontrollban mért intenzitásértékekkel azonos mértékű (így nem specifikusnak minősíthető) fluoreszcens jelölődés volt csak észlelhető. Ezzel szemben a kokultúra tenyészetekben a tenascin expresszió (a reakció intenzitása) igen intenzívnek bizonyult. A kokultúrákban a tenascin pericelluláris lokalizációban, azokhoz a fibroblasztokhoz asszociáltnan fordult elő, amelyek közelében nagyszámú melanómasejt volt megfigyelhető (8.ábra). A kultúra azon részein, ahol a melanómasejtek nem képeztek direkt kontaktust a fibroblasztokkal jelölődés nem volt megfigyelhető.



8. ábra: A kokultúrán belül melanómasejtekkel kontaktusban lévő fibroblasztok tenascin reakciója és a reakció intenzitásprofilja. A., Indirekt immunhisztokémiai reakcióval megjelenített tenascin és DAPI festés a kokultúra egy területén, B., fibroblaszt marker reakció ugyanezen területen.

Melanóma sejtekkel kondicionált médiummal (MCM) kezelt fibroblaszt monokultúrákban a kezeletlen monokultúrákhoz hasonlóan, tenascin termelődés nem volt észlelhető. Ez a tény, valamint a tenascin eloszlás kokultúrán belüli heterogenitása felveti egy sejt-kontaktus révén létrejövő szignalizáció szerepét a fibroblasztok tenascin termelésének indukciójában. A kokultúrán belüli heterogenitás jellemzésére és a kontakt aktiváció lehetőségének további alátámasztására elvégeztük a tenascin reakció intenzitásának meghatározását a kokultúra különböző melanómasejt/fibroblaszt arányt mutató területein. A kokultúra 76, random módon kiválasztott területének ilyen módszerrel elvégzett analízisével megállapítottuk, hogy az egy fibroblasztra jutó tenascin intenzitás és a fibroblasztokhoz asszociált melanómasejtek száma között lineáris összefüggés van (a korrelációs koefficiens értéke $r=0.83$) (9.ábra).



9. ábra: Fibroblasztok tenascin termelésének alakulása a kokultúra különböző melanómasejt/fibroblaszt arányt mutató területein és a korrelációt leíró regressziós egyenes.

5. DISZKUSSZIÓ

Számos kísérleti megfigyelés alapján ma már jól ismert, hogy a malignusan transzformált sejtekben a connexin fehérjék expressziója csökken, ill. ennek következményeként a gap junction típusú intercelluláris kommunikáció mértéke is alacsonyabbá válik. Számos tanulmány veti fel a GJIC csökkenés központi szerepét a karcinogenezis és a tumorprogresszió egyes lépéseiben⁵¹⁻⁵³. Ezen eredmények alapján már igen korán felmerült, hogy a gap junction csatornák nem csak az általános szöveti homeosztázist fenntartó anyagoknak, hanem a környező ép sejtek és az iniciálódott premalignus sejtek proliferatív/antiproliferatív szignáljainak átvitelében is fontos szerepet játszhatnak^{22,54}. A legtöbb tanulmány elsősorban a neoplasztikus sejtekre vonatkoztatva írja le a GJIC változásait nem vizsgálva ezen elváltozások szerepét a bonyolult tumor-gazdasejt kölcsönhatás vonatkozásában, amely a tumorsejtek malignitása mellett meghatározó eleme a neoplasztikus folyamatok sikeres progressziójának.

Kísérleteinkben arra kerestük a választ, hogy a tumorsejtek által szekretált, és ezen sejtek mikrokörnyezetét nagymértékben átalakítani képes, humorális faktorok hogyan befolyásolják a strómális fibroblasztok intercelluláris kommunikációját és ezzel összefüggésben proliferációját. Tumor (colon adenokarcinóma) sejtekkel kondicionált médium hatására a fibroblasztok intercelluláris kommunikációjának növekedését és a sejtproliferáció csökkenését figyeltük meg a kontroll sejtek médiumával kezelt kultúrákkal összehasonlításban. Számos munkacsoport foglalkozott a tumor kondicionált médiumnak ill. a kokultúra tenyésztésnek a strómális sejtek proliferációjára és szintetikus aktivitására gyakorolt hatásának vizsgálatával. Howard és

munkatársainak különböző malignus és normál sejtvonalakkal (MC G-V14, MC G-T14, MC G-T10, HeLa primer egér adenokarcinóma sejtek és Balb/c normál epithelsejtek) végzett kísérleteiben a tumoros sejtvonalak dializált, kondicionált médiuma fokozta normál fibroblasztok timidin beépítését, míg ugyanezen sejtek nem dializált médiuma azonban nem rendelkezett proliferációt serkentő hatással⁵⁵. 54 agyalapi mirigy adenoma sejtkultúra kondicionált médiumát vizsgálva a minták 52 %-át proliferatív, míg 26 %-át antiproliferatív hatásúnak találták patkány GH₃ sejteken¹⁸. Reverz kölcsönhatásra utal annak a kísérletnek az eredménye amelyben melanóma sejteket és fibroblasztokat tenyésztettek együtt különböző ideig és megállapították hogy a 3T3 fibroblasztok 3-4 napig fokozzák majd később (7 nap után) gátolják a melanómasejtek szaporodását⁵⁶. Sérült tumorszövetből (patkány vastagbél adenokarcinóma) gyűjtött folyadék jelentősen gátolta a fibroblasztok proliferációját, míg normál körülmények között gyűjtött tumor kondicionált médium ezzel ellenkező hatással rendelkezett a target sejteken⁵⁷. Feltételezhető hogy a TCM strómális sejtekre gyakorolt hatásainak fent leírt sokfélesége összefüggésbe hozható az egyes tumorok növekedési faktor „profiljával”.

Különböző in vitro kísérleti rendszerekben megfigyelték, hogy neoplasztikus sejtek ill. azok kondicionált tápfolyadék jelentősen fokozza az így kezelt fibroblasztok matrix termelését⁵⁸⁻⁶⁰. Kultúra vizsgálatainkban melanóma sejtek hatására mi is egy onkofetális matrix komponens, a jellegzetesen antiadhezív tulajdonságú tenascin indukcióját tapasztaltuk. Bebizonyítottuk hogy a tenascin reexpresszió és depozíció a sejtek közötti kontakt szignalizáció eredménye és feltételezhetően fontos szerepet játszik a malignus melanocita léziókra jellemző intenzív tenascin termelés létrejöttében⁶¹⁻⁶³. A kontakt szignalizáció létrejöttében, egy a melanómasejtek membránjában lokalizált inszolubilis faktor szerepe feltételezhető, amely ilyen formában

is képes a szomszédos sejtek receptorainak aktiválására és metabolikus válaszreakciók létrehozására. Ma már számos olyan növekedési faktor ismert amelyek transzmembrán prekursorai képesek ilyen hatások létrehozására és a proteolitikus hasítás defektusa révén felhalmozódásukat is megfigyelték egyes sejtek plazmamembránjának extracelluláris felszínén⁶⁴. A vizsgálatainkban észlelt jelenség pontos mechanizmusának tisztázása további vizsgálatokat igényel.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Kísérleteinkben tumor kondicionált médiumban tenyésztett fibroblaszt monokultúrákban, valamint melanóma sejt/fibroblaszt kokultúrákban vizsgáltuk az intercelluláris kommunikáció alakulását, ill. a tenascin reexpressziójának jellegét és mértékét.

Megállapítottuk, hogy:

6.1. A tumorsejtek által termelt és a tumor kondicionált tápfolyadékba is kiválasztott humorális faktorok hatására a fibroblasztok gap junction típusú intercelluláris kommunikációja szignifikánsan növekszik, míg párhuzamosan proliferációjuk csökken.

6.2. Melanóma sejt-fibroblaszt kokultúrákban, a fibroblasztokban, a tenascin reexpresszióját észleltük. A kokultúrában a tenascin heterogén eloszlása volt megfigyelhető és a pericelluláris tenascin reakció intenzitása lineárisan korrelált a fibroblasztokhoz asszociált melanómasejtek számával.

6.3. Melanóma kondicionált médiumban tenyésztett fibroblaszt kultúrákban tenascin produkció nem volt megfigyelhető.

Eredményeink a melanóma sejtek és a fibroblasztok közötti kontakt szignalizáció és egy a melanómasejtek membránjában lokalizált aktív faktor szerepét valószínűsítik a tenascin szintézis indukciójában, míg a tumor kondicionált médium hatására létrejövő GJIC növekedés és sejtproliferáció csökkenés tumor sejt eredetű szekréciós termék(ek)nek a stróma sejteken érvényesülő hatására utal. Vizsgálatainkkal a rendkívül komplex gazdaszervezet-tumor kölcsönhatás egyes mozzanatainak jobb megértéséhez járultunk hozzá.

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet fejezem ki témavezetőmnek Dr. Ádány Róza egyetemi tanárnak, amiért felkeltette érdeklődésemet az experimentális onkológia iránt. Hálás vagyok, amiért munkám során nagy türelemmel irányított és maximálisan támogott. Köszönöm továbbá hogy az Intézet igazgatójaként biztosította számomra a folyamatos magas színvonalú munka és szakmai fejlődés lehetőségét.

Hasonlóan köszönettel tartozom Dr. Pásti Gabriella megyei tisztifőorvos asszonynak hogy TDK munkám során és 1998-ig mint Ph.D. témavezetőm nagyban hozzájárult az ezen értekezés alapjául szolgáló kísérletek sikeres megtervezéséhez és kivitelezéséhez.

Köszönöm Dr. Ladányi Andreának (Semmelweis Orvostudományi Egyetem I sz. Patológiai Intézete), hogy a kutatócsoportja által előállított HT 168-M1 melanóma sejtvonalat kísérleteinkhez rendelkezésre bocsátotta.

Külön köszönet illeti Nagy Istvánné és Kovács Györgyné asszisztenseket a sejtenyésztés során és Bana Sándornét az immunfluoreszcens reakciók kivitelezésében nyújtott hatékony segítségükért.

Köszönöm továbbá az Intézet valamennyi dolgozójának a munkámhoz nyújtott szakmai segítségüket, hasznos tanácsaikat és nem utolsósorban baráti támogatásukat.

8. IRODALMI HIVATKOZÁSOK

1. Liotta L. A., Rao C. N., Barsky S. H.: Tumor invasion and the extracellular matrix. Lab. Invest. 1983; 49:636
2. Randall J. R.: The role of gap junctional intercellular communication in neoplasia. Ann. Clin. Lab. Sci. 1994; 24:216
3. Liotta L. A., Kohn E. C.: The microenvironment of the tumor-host interface. Nature 2001; 411:375
4. Martinez-Hernandez A.: The extracellular matrix and neoplasia. Lab. Invest. 1988; 58:609
5. Ádány R. ed.: Tumor Matrix Biology. CRC Press. Boca Raton, 1995
6. Ádány R., Heimer R., Caterson B., Sorrell J. M., Iozzo R. V.: Altered expression of chondroitin sulfate proteoglycan in the stroma of human colon carcinoma. Hypomethylation of PG-40 gene correlates with increased PG-40 content and mRNA levels. J. Biol. Chem. 1990; 265:11389
7. Ádány R. Iozzo R. V.: Hypomethylation of the decorin proteoglycan gene in human colon cancer. Biochem. J. 1991; 276:301
8. Liotta L. A.: Tumor extracellular matrix. Lab. Invest. 1982; 47:112
9. Noel A., Munaut C., Boulvain C. M., Calberg-Bacq C. M., Lambert C. A., Nusgens B., Lapiere C. M., Foidart J. M.: Modulation of collagen and fibronectin synthesis in fibroblasts by normal and malignant cells. J. Cell Biol. 1992; 48:150
10. Iozzo R. V.: Neoplastic modulation of extracellular matrix. J. Biol. Chem. 1985; 260: 7464

11. Sternlicht M. D., Lochter A., Sympson C. J., Huey B., Rougier J. P., Gray J. W., Pinkel D. et. al.: The stromal proteinase MMP3/stromelysin-1 promotes mammary carcinogenesis. *Cell* 1999; 98:137
12. Werb Z.: ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. *Cell* 1997; 91:439
13. Alitalo K., Keski-Oja J., Vaheri A.: Extracellular matrix proteins characterize human tumor cell lines. *Int. J. Cancer.* 1981; 27:755
14. Wernert N.: The multiple roles of tumor stroma. *Virchows Arch.* 1997; 430:433
15. Puztai L., Lewis C. E., Lorenzen J., Mcgee J. O'D.: Growth factors: regulation of normal and neoplastic growth. *J. Pathol.* 1993; 169:191
16. Zumkeller W., Schofield P. N.: Growth factors, cytokines and soluble forms of receptor molecules in cancer patients. *Anticancer Res.* 1995; 15:344
17. Shih J. M., Herlyn M.: Role of growth factors and their receptors in the development and progression of melanoma. *J. Invest. Dermatol.* 1993; 100:196S
18. Herlyn M., Clark W. H, Rodeck U., Mancianti M. L., Jambrosic J., Koprowski.: Biology of tumor progression in human melanocytes. *Lab. Invest.* 1987; 56:461
19. Webster J., Ham J., Bevan J. S., Horn C. D., Scanlon M. F.: Preliminary characterization of growth factors secreted by human pituitary tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1991; 72:687
20. Parise L. V., Lee J., Juliano R. L.: New aspects of integrin signaling in cancer. *Semin. Cancer. Biol.* 2000; 10:407
21. Kornberg L. J.: Focal adhesion kinase and its potential involvement in tumor invasion and metastasis. *Head. Neck.* 1998; 20:745

22. Ruch R. J.: The role of gap junctional intercellular communication in neoplasia. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 1994; 24:216
23. Trosko J. E., Madhukar B. V., Chang C. C.: Endogenous and exogenous modulation of gap junctional intercellular communication: toxicological and pharmacological implications. *Life Sci.* 1993; 53:1
24. Wilgenbus K. K., Kirkpatrick C. J., Knuechel R., Willecke K., Traub O.: Expression of Cx26, Cx32 and Cx43 gap junction proteins in normal and neoplastic human tissues. *Int. J. Cancer.* 1992. 51:522
25. Fentiman I. S., Hurst J., Ceriani R. L., Taylor-Papadimitriou J.: Junctional intercellular communication pattern of cultured human breast cancer cells. *Cancer Res.* 1979; 39:4739
26. Jamieson S., Going J. J., D'Arcy R., George W. D.: Expression of gap junction proteins connexin 26 and connexin 43 in normal human breast and in breast tumors. *J. Pathol.* 1998; 184:37
27. Zhu D., Kidder G. M., Caveney S., Naus C. C.: Growth retardation in glioma cells cocultured with cells overexpressing a gap junction protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1992; 89:10218
28. Hirschi K. K., Xu C. E., Tsukamoto T., Sager R.: Gap junction genes Cx26 and Cx43 individually suppress the cancer phenotype of human mammary carcinoma cells and restore differentiation potential. *Cell. Growth Differ.* 1996; 7:861
29. Huang R.-P., Fan Y., Hossain M. Z., Peng A., Zeng Z.-L., Boyton A. L.: Reversion of the neoplastic phenotype of human glioblastoma cells by connexin 43 (cx43). *Cancer Res.* 1998; 58:5089

30. Maldonado P. E., Rose B., Loewenstein W. R.: Growth factors modulate junctional cell-to-cell communication. *J. Membrane Biol.* 1988; 106:203
31. Moorby C. D., Stoker M., Gherardi E.: HGF/SF inhibits junctional communication. *Exp. Cell Res.* 1995. 219:657
32. Xie H.-Q., Hu V. W.: Modulation of gap junctions in senescent endothelial cells. *Exp. Cell Res.* 1994; 214:172
33. Gordon R. E., Lane B. P., Marin M.: Regeneration of rat tracheal epithelium: Changes in gap junctions during specific phases of the cell cycle. *Exp. Lung Res.* 1982; 3:47
34. Stein L. S., Boonstra J., Burghardt R. C.: Reduced cell-cell communication between mitotic and nonmitotic coupled cells. *Exp. Cell Res.* 1992; 198:1
35. Tsuda H., Asamoto M., Baba H., Iwahori Y., Matsumoto K., Iwase T., Nishida Y. et. al.: Cell proliferation and advancement of hepatocarcinogenesis in the rat are associated with a decrease in connexin 32 expression. *Carcinogenesis* 1995; 16:101
36. Braner T., Huser D. F.: Intercellular communication and tumor invasion in the petri dish. *ALTEX.* 1988; 5:4
37. Esinduy C. B., Chang C. C., Trosko J. E., Ruch R. J.: In vitro growth inhibition of neoplastically transformed cells by non-transformed cells: requirement for gap junctional intercellular communication. *Carcinogenesis* 1995; 16:915
38. Hauptmann S., Zardi L., Siri A., Carnemolla B., Borsi L., Castellucci M., Klosterhalfen B., et. al.: Extracellular matrix proteins in colorectal carcinomas: Expression of tenascin and fibronectin isoforms. *Lab. Invest.* 1985; 73:172

39. Koukoulis G. K., Gould V. E., Bhattacharyya A., Gould J. E., Howedy A. A., Virtanen I.: Tenascin in normal reactive hyperplastic and neoplastic tissues: Biologic and pathologic implications. *Hum. Pathol.* 1991; 22:636
40. Chiquet-Ehrismann R.: Tenascins, a growing family of extracellular matrix proteins. *Experientia.* 1995; 51:853
41. Ádány R., Toida M., Takami T.: Arborizing tenascin network under the rapidly proliferating epithelium of epulis. *J. Histochem. Cytochem.* 1993; 11:1717
42. Mackie E. J.: Molecules in focus: tenascin-C. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 1997; 29:1133
43. Natali P. G., Zardi L.: Tenascin: a hexameric adhesive glycoprotein. *Int. J. Cancer* 1989; 4:66
44. Juhász A., Bárdos H., Répássy G., Ádány R.: Characteristic distribution patterns of tenascin in laryngeal and hypopharyngeal cancers. *Laryngoscope* 2000; 110:84
45. Herlyn M., Graeven U., Speicher D., Sela B.-A., Bennicelli J. L., Kath R., Guerry D.: Characterization of tenascin secreted by human melanoma cells. *Cancer Res.* 1991; 51:4853
46. Chiquet-Ehrismann R., Kalla P., Pearson C. A., Beck K., Chiquet M.: Tenascin interferes with fibronectin action. *Cell* 1988; 53:383
47. Chiquet-Ehrismann R., Kalla P., Pearson C. A.: Participation of tenascin and transforming growth factor- β in reciprocal epithelial-mesenchymal interactions of MCF7 cells and fibroblasts. *Cancer Res.* 1989; 49:4322
48. Sakai T., Ohta M., Furukawa Y., Saga Y., Aizawa S., Kawakatsu H., Saito M.: Tenascin-C induction by the diffusible factor epidermal growth factor in stromal-epithelial interactions. *J. Cell. Physiol.* 1995; 165:18

49. Ladányi A., Tímár J., Paku S., Molnár G., Lapis K.: Selection and characterization of human melanoma lines with different liver-colonizing capacity. *Int. J. Cancer* 1990; 46:456
50. Szűcs S., Vámosi Gy., Póka R., Sárváry A., Bárdos H., Balázs M., Kappelmayer J. et. al.: Single-cell measurement of superoxide anion and hydrogen peroxide production by human neutrophils with digital imaging fluorescence microscopy. *Cytometry* 1998; 33:19
51. Krutovskikh V., Yamasaki H.: The role of gap junctional intercellular communication (GJIC) disorders in experimental and human carcinogenesis. *Histol. Histopathol.* 1997; 12:761
52. Ruch R. J., Porter S., Koffler L. D., Dwyer-Nield L. D., Malkinson A. M.: Defective gap junctional intercellular communication in lung cancer: loss of an important mediator of tissue homeostasis and phenotypic regulation. *Exp. Lung Res.* 2001; 27:231
53. King T. J., Fukushima L. H., Hieber A. D., Shimabukuro K. A., Sakr W. A., Bertram J. S.: Reduced levels of connexin43 in cervical dysplasia: inducible expression in a cervical carcinoma cell line decreases neoplastic potential with implications for tumor progression. *Carcinogenesis.* 2000; 21:1097
54. Loewenstein W. R.: Junctional intercellular communication and the control of growth. *Biochim. Biophys. Acta.* 1979; 560:1
55. Howard E. F., Scott D. F., Bennett C. E.: Stimulation of thymidine uptake and cell proliferation in mouse embryo fibroblasts by conditioned medium from mammary cells in culture. *Cancer Res.* 1976; 36:4543

56. Benathan M., Pararas C., Frenk E.: Modulatory growth effects of 3T3 fibroblasts on cocultivated human melanoma cells. *Anticancer Res.* 1991; 11:203
57. Gatenby R. A., Taylor D. D.: Suppression of wound healing in tumor bearing animals as a model for tumor-host interaction: mechanism of suppression. *Cancer Res.* 1990; 50:7997
58. Iozzo R. V.: Neoplastic modulation of extracellular matrix. *J. Biol. Chem.* 1985; 260:7464
59. Iozzo R. V., Sampson P. M., Schmitt G. K.: Neoplastic modulation of extracellular matrix: stimulation of chondroitin sulfate proteoglycan and hyaluronic acid synthesis in co-cultures of human colon carcinoma and smooth muscle cells. *J. Cell. Biochem.* 1989; 39:355
60. Godden J. L., Edward M., MacKie R. M.: Melanoma cell-derived factor stimulation of fibroblast glycosaminoglycan synthesis-The role of platelet-derived growth factor. *Eur. J. Cancer* 1999; 35:473
61. Duinen C. M., Fleuren G. J., Bruijn J. A.: The extracellular matrix in pigmented skin lesions: an immunohistochemical study. *Histopathology* 1994; 24:33
62. Tuominen H., Kallioinen M.: Increased tenascin expression in melanocytic tumors. *J. Cutan. Pathol.* 1994; 21:424
63. Tuominen H., Pollanen R., Kallioinen M.: Multicellular origin of tenascin in skin tumors-an in situ hybridization study. *J. Cutan. Pathol.* 1997; 24:590
64. Massagué J., Pandiella A.: Membrane-anchored growth factors. *Annu. Rev. Biochem.* 1993 62:515

9. A TÉZISEKHEZ FELHASZNÁLT KÖZLEMÉNYEK

Tóth L, Pásti G, Sárváry A, Balázs M, Ádány R: Effect of tumor conditioned medium on intercellular communication and proliferation of Balb/c 3T3 cells. *Cancer Letts*, 151: 57–61 (2000)
IF: 1,518

Szűcs S, Vámosi Gy, Póka R, Sárváry A, Bárdos H, Balázs M, Kappelmayer J, **Tóth L**, Szöllősi J, Ádány R: Single-cell measurement of superoxide anion and hydrogen peroxide production by human neutrophils with digital imaging fluorescence microscopy. *Cytometry*, 33: 19–31 (1998)
IF: 2,317

Tóth L, Pásti G, Ádány R: Contact stimulation of fibroblasts for tenascin production by melanoma cells (közlésre elküldve)

IDÉZHETŐ ABSZTRAKT

Szűcs S, Vámosi Gy, Póka R, Sárváry A, Bárdos H, Balázs M, Kappelmayer J, **Tóth L**, Szöllősi J, Ádány R: Single-cell measurement of granulocyte respiratory burst with digital imaging fluorescence microscopy. *Br. J. Haematol.*, 102, 58, 1998. (abstract)