**TUMOR-ASSZOCIÁLT MIOFIBROBLASZTOK GENETIKAI,
EPIGENETIKAI, TRANSZKRIPCIÓS ÉS FUNKCIONÁLIS
JELLEMZŐI**

**DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS
HULIÁK ILDIKÓ**

**TÉMAVEZETŐK:
PROF. DR. BOROS IMRE MIKLÓS
DR. KIRICSI MÓNICA**

BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA

**SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS INFORMATIKAI KAR
BIOKÉMIAI ÉS MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI TANSZÉK**

SZEGED

2021

Tartalomjegyzék

1. Tartalmi összefoglaló	4
2. Rövidítések jegyzéke	7
3. Irodalmi áttekintés.....	9
3.1. Bevezetés – a daganatok általános jellemvonásai	9
3.2. Tumor mikrokörnyezet	11
3.3. Az extracelluláris mátrix felépítése és megváltozása a tumor sztrómában.....	13
3.4. A tumor mikrokörnyezetének sejtes elemei	15
3.5. Miofibroblasztok, a tumor-asszociált fibroblasztok legnépesebb alpopulációja	20
3.6. Miofibroblaszt aktiváció, a miofibroblasztok tumorfejlődést segítő jellemvonásai	22
3.7. A mátrix metalloproteinázok.....	24
4. Célkitűzés	27
5. Betegek, alkalmazott anyagok és módszerek	29
5.1. Vegyszerek és reagensek	29
5.2. Etikai engedély	29
5.3. Miofibroblaszt sejtek izolálása és tenyésztése	29
5.4. Genomi DNS izolálás és variáns analízis	31
5.5. Immuncitokémia.....	31
5.6. RNS izolálás.....	32
5.7. TaqMan kis-denzitású génexpressziós array.....	33
5.8. Reverz transzkripció-kapcsolt polimeráz láncreakció	33
5.9. Western blot analízis.....	34
5.10. Fehérjeminta készítés enzimaktivitás meghatározásához	36
5.11. Zselatin zimográfia	36
5.12. <i>In vitro</i> sejtmigráció vizsgálat	37

5.13. Statisztikai analízis	37
6. Eredmények	38
6.1. A létrehozott primer miofibroblaszt sejtenyészetek tisztaságának vizsgálata	38
6.2. Tumorképződésben szerepet játszó genetikai variációk vizsgálata a daganatokban akkumulálódott miofibroblasztokban	39
6.3. A tumor-asszociált miofibroblasztokban azonosított epigenetikai változások	44
6.4. A tumor-asszociált miofibroblasztok részleges transzkriptomikai analízise	46
6.5. ECM alkotók és mátrix metalloproteinázok expressziójának vizsgálata.....	50
6.6. Az <i>in vitro</i> sejtmigrációs vizsgálatok eredményei.....	56
7. Megbeszélés.....	59
8. Irodalomjegyzék	71
9. Angol nyelvű összefoglaló	82
10. Publikációk listája	85
11. Köszönetnyilvánítás	87
12. Függelék	89

1. Tartalmi összefoglaló

Napjainkban már általánosan elfogadott nézet, hogy a tumorbiológia területén végzett kutatások nem korlátozódhatnak csak a daganatsejtek vizsgálatára, hiszen a neoplasztikus sejtek mellett a tumorok kötőszöveti állományának (tumor sztróma) megismerése legalább ekkora jelentőséggel bír a daganatok viselkedésének megértése szempontjából. A tumor sztróma az átalakult extracelluláris mátrixon (ECM) kívül gazdag sejtes elemekben is: ezen sejtek között igen nagy számban találunk aktivált fibroblasztokat, úgynevezett miofibroblasztokat. Ezek a kontrakcióra képes, vékony, orsó alakú, alfa-simaizom-aktint és vimentint expresszáló sejtek az ép szövetben is megtalálhatók és kiemelt szerepet játszanak a sebgyógyulásban, hiszen többek között növekedési faktorokat, ECM komponenseket és szöveti proteázokat szekretálnak. Különféle daganatos szövetmetszetek vizsgálata során megfigyelték, hogy az egészséges szövethez képest a miofibroblasztok jóval nagyobb számban fordulnak elő a rákos sejtek körül, valamint ezen miofibroblasztok alakja, elrendeződése is szabálytalanná válik. A morfológiai eltérések előrevetítik a miofibroblasztok funkcionális megváltozását is, ennek hátteréről azonban keveset tudunk. Ezért a kísérleteink során arra kerestük a választ, hogy mi állhat a tumor-asszociált miofibroblasztok morfológiai és az ezzel összefüggésbe hozható funkcionális megváltozásának hátterében. Mely funkcionális változás járulhat hozzá a tumorokban feldúsuló miofibroblasztok tumor-támogató fenotípusának létrejöttéhez? Vajon genetikai változás vagy epigenetikai szabályozás állhat-e ezen folyamatok hátterében?

A kérdéseink megválaszolásához nyelőcső és vastagbél eredetű szövetmintákból származó tiszta miofibroblaszt sejttenyészeteket vizsgáltunk, melyek izolálása az SZTE ÁOK I. számú Belgyógyászati Klinikán történt, tumor eltávolító műtéteket követően. A műtétek során minden beteg preparátumából két mintát vettek: egyet a tumorból, egy másikat pedig a tumortól néhány centiméterre, az egészséges szövetből; így minden tumor-asszociált mintát a saját kontrolljához tudtuk hasonlítani a kísérletek során.

Első lépésben újgenerációs szekvenálással SNP analízist végeztünk 94, daganatokban gyakran érintett gént és 284 olyan SNP-t vizsgálva, melyek jelenléte jól korrelál a tumorok meglétével. A kísérletek eredménye arra utal, hogy nincs szignifikáns genetikai különbség a tumor-asszociált és a normál minták között. Ezt követően a lehetséges epigenetikai változások feltérképezésére helyezve a hangsúlyt, immuncitokémiával és western blot analízissel hiszton

poszttranszlációs módosítások mértékét vizsgáltuk a miofibroblaszt sejtekben. A vizsgált módosítások közül a H3 hiszton 9-es lizin (H3K9) trimetiláció és a H4 hiszton 16-os lizin (H4K16) acetiláció csökkent mértékűnek bizonyult a tumor-asszociált sejtekben.

A tumor-asszociált és a normál miofibroblasztok közötti génexpressziós eltérések kimutatására 4 mintapár bevonásával parciális transzkriptóm analízist végeztünk (TaqMan array). A vizsgálatba 190 gént vontunk be, melyeknek nagyságrendileg negyede mutatott expressziós különbséget a tumoros szövetből, illetve a normál szövetből izolált miofibroblasztok között. A változást mutató gének által kódolt fehérjék főként a transzformáló növekedési faktor- β által aktivált jelátviteli út résztvevői, az ECM alkotói és módosító enzimeik, valamint a metasztázis kialakulásában szerepet játszó faktorok közé tartoznak.

A génexpressziós vizsgálatok eredményeire alapozva a tumor-asszociált miofibroblasztok metasztázist támogató aktivitását tanulmányoztuk. Első lépésben arra voltunk kíváncsiak, hogy általános tendenciának tekinthető-e a TaqMan array-ben változást mutató ECM proteoglikánok és adhézión glikoproteinek alacsonyabb kifejeződése a tumorokban dúsuló miofibroblasztok esetében. Ezért kísérleteinkbe további miofibroblaszt mintapárokat vontunk be és megmértük a decorin, fibromodulin, nidogen1, perlecan és transzformáló növekedési faktor béta receptor 3 génekről képződő mRNS-ek mennyiségét ezekben a mintákban is. Az eredmények alátámasztják a TaqMan array során látottakat, azaz a tumor-asszociált miofibroblasztokban alacsonyabb génexpresszió igazolható ezen ECM-kapcsolt gének esetén.

Ezt követően az ECM átalakításában, és ezzel a tumorok metasztázis képzésében kiemelt szerepet játszó mátrix metalloproteinázok vizsgálatára összpontosítottunk. Megmértük a kollagének, proteoglikánok és glikoproteinek hasítására képes MMP1, 2, 3, 10 és 12 enzimek génjeiről képződő mRNS-ek mennyiségét. Emellett fehérjeszintű vizsgálatokat is végeztünk, melynek során tanulmányoztuk a metasztázis lépéseivel szorosan köthető sztromelizinek (MMP3 és 10) mennyiségét és az intracellulárisan megtalálható, valamint szekretált zselatinázok (MMP2 és 9) enzimaktivitását. Kísérleteinkben kimutattuk, hogy a nem tumoros szövetből izolált miofibroblasztokhoz képest a tumor-asszociált miofibroblaszt sejtekben nagyobb MMP expresszió mutatható ki; az MMP3 és 10 esetében pedig fehérjemennyiség tekintetében is megerősítettük az expressziós különbséget a tumor-asszociált sejtek javára. A zselatinázok közül az MMP9 sem mRNS, sem fehérjeszinten nem mutatható ki a miofibroblasztokban, míg az MMP2 esetén robusztus enzimaktivitást detektáltunk a mintákban,

azonban a tumor-asszociált sejtek és a normál szövetből származó miofibroblasztok összevetésekor nem találtunk szignifikáns különbséget. Érdeemes megemlíteni azonban, hogy egy-egy mintapár esetén igazolható, hogy magasabb MMP2 zselatináz aktivitás detektálható a tumorokban dúsuló miofibroblasztok által szekretált fehérjefrakcióban.

A tumorokban elhelyezkedő miofibroblasztok metasztázis támogató fenotípusának további alátámasztásához funkcionális vizsgálatot végeztünk, melynek során összevetettük a tumor-asszociált és a normál szövetből származó miofibroblasztok motilitási (vándorlási) képességét. Ennek során igazoltuk, hogy a tumor-asszociált miofibroblasztok migrációs képessége átlagosan 56%-kal nagyobb, mint a kontroll sejteké.

Eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy a tumor-asszociált és a normál szövetből származó miofibroblaszt sejtek között olyan génexpressziós, fehérjeszintű és funkcionális különbségeket térképeztünk fel, melyek felelősek lehetnek a szöveti morfológiát érintő változásokért és részt vehetnek a tumor-támogató fenotípus kialakításában. Ezen különbségek hátterében feltehetőleg epigenetikai módosulás hatására történő génműködés változások állnak. Vizsgálataink alapján a tumor-asszociált miofibroblasztokban detektált csökkent mértékű H3K9 trimetiláció és H4K16 acetiláció hozzájárulhat a tumor-asszociált miofibroblaszt sejtek tumor-támogató fenotípusának létrejöttéhez.

2. Rövidítések jegyzéke

α -SMA: alfa-simaizom aktin (Alpha-Smooth Muscle Actin)

BSA: borjú szérum albumin

CAA: rák-asszociált zsírszöveti sejt (Cancer-Associated Adipocyte)

CAF: rák-asszociált fibroblaszt (Cancer-Associated Fibroblast)

CCND1: ciklin D1 (CyCliN D1)

CTGF: kötőszöveti növekedési faktor (Connective Tissue Growth Factor)

DAPI: 4,6-diamidino-2-fenilindol

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DNS: Ddezoxiribonukleinsav

ECM: extracelluláris mátrix

EDTA: etilén-diamin-tetraecetsav (Ethylene Diamino Tetraacetic Acid)

EMT: epiteliális-mezenhimális tranzíció

ETV4: Ets variáns transzkripció faktor 4

FAP1: fibroblaszt aktivációs fehérje 1 (Fibroblast Activation Protein 1)

FBS: főtális borjú szérum

FGF: fibroblaszt növekedési faktor

GAG: glükózaminoglikán

H3: hiszton 3 fehérje

H4: hiszton 4 fehérje

HDAC: hiszton deacetiláz

HGF: hepatocita növekedési faktor

IL-1 β /-6/-10: interleukin-1 β /-6/-10

mRNS: hírvivő RNS

MGAT5: N-acetil-glükózamin transzferáz 5

(Alpha-1,6-MannosylGlycoprotein 6-beta-N-Acetylglucosaminy Transferase 5)

MMP: mátrix metalloproteináz (Matrix MetalloProteinase)

MSC: mezenhimális őssejt (Mesenchymal Stem Cell)

NGS: újgenerációs szekvenálás (Next Generation Sequencing)

PBS: foszfát pufferes sóoldat (Phosphate Buffer Saline)

PCR: polimeráz láncreakció (Polymerase Chain Reaction)

PDGF: vérlemezke-eredetű növekedési faktor (Platelet-Derived Growth Factor)

SDS: nátrium dodecil szulfát (Sodium Dodecyl Sulfate)

SMAD: C. elegans SMA és Drosophila MAD homológ

SNP: egy nukleotidot érintő szekvencia polimorfizmus

TBS: tris pufferes sóoldat (Tris Buffer Saline)

TGF-β: transzformáló növekedési faktor béta (Transforming Growth Factor Beta)

TGFBR3: TGF-β receptor 3

TIAM1: T-sejt limfóma invázió és metasztázis induktor fehérje 1
(T-cell lymphoma Invasion And Metastasis inducing protein 1)

TIMP: MMP enzim szöveti inhibitor (Tissue Inhibitor of MetalloProteinases)

TME: tumor mikrokörnyezet (Tumor MicroEnvironment)

TNF-α: tumor nekrosis faktor alfa

uPA: urokináz plazminogén aktivátor

VEGF: vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (Vascular Endothelial Growth Factor)

WISP 1: WNT1 indukálta szignalizációs útvonal fehérje 1
(WNT1 Inducible Signaling pathway Protein 1)

WNT: Drosophila wingless homológ

3. Irodalmi áttekintés

3.1. Bevezetés – a daganatok általános jellemvonásai

A 2018. évi magyarországi mortalitási statisztikai adatok szerint a rosszindulatú daganatos megbetegedések másodikként (24,87%) szerepelnek a halálokok listáján, szorosan követve a szív- és érrendszeri problémákat (33,1%). A nemek között kismértékű különbség mutatkozik: a férfiak esetében a tumorok a halálozások 27,52%-ért felelősek, míg a nők esetén ez a szám 22,33%-nak adódott (KSH statisztika). A nagyszámú daganatos megbetegedés nagy terhet ró az egészségügyi ellátórendszerre. A terápiás beavatkozási lehetőségek relatív széles skálája érhető már el napjainkban, azonban az optimális kezelés megválasztása nem egyszerű kérdés. Ma már tudjuk, hogy a daganatok rendkívül heterogén betegségcsoportot jelentenek, hiszen egy adott szövet adott sejttípusából kiinduló tumorok is jelentősen eltérhetnek egymástól a hordozott mutációk kombinációjából adódóan a különböző páciensekben (Weinberg *The biology of Cancer* 2006). Emellett egy kifejtett daganaton belül sem egyforma malignus sejteket találunk, hiszen a tumorok fejlődése a sejtek szintjén zajló mikroevolúciós folyamatnak tekinthető, a genetikai instabilitás és a szelekciós előnyt élvező ráksejtek klonális expanziója genetikailag heterogén ráksejtpopulációt eredményez (Petit *BJC* 2000). Ezen tények együttesen jól szemléltetik a daganat viselkedésének komplexitását, így felmerül a kérdés: közös nevezőre hozható-e valahogyan ez a komplexitás? Vannak-e olyan sajátságok, melyek általánosan jellemzik a daganatokat, így lehetőséget adva univerzálisan használható terápiás beavatkozásokra, illetve hatóanyag fejlesztésére?

2000-ben Douglas Hanahan és Robert Weinberg összegyűjtötték, hogy milyen általános ismertetőjegyek jellemzik a rosszindulatú daganatokat, majd ezt a listát 2011-ben kiegészítették néhány újabb karakterisztikus jellemvonással (Hanahan és Weinberg *Cell* 2000 és 2011). E szerzők szerint a daganatokra általánosan érvényes jellegzetességek az alábbiak (1. ábra): folyamatos sejtproliferáció fenntartása (1), növekedést gátló szignálok (tumorszupresszor hatások) kiiktatása (2), apoptózis (sejthalál) blokkolása (3), a replikatív immortalitás elérése (4), angiogenezis, azaz a vér- és nyirokerek létrehozásának képessége (5), a környező szövetekbe történő invázió és a keringési rendszer révén terjedve metasztázisok (másodlagos daganatnövekedési helyek) létrehozása (6), az anyagcsere átprogramozása, az energiatermelő folyamatok szabályozásának megváltoztatása (7), az immunrendszer támadásainak kivédése

(8), genom instabilitás és mutációk felhalmozása (9), valamint a tumor növekedését, fejlődését segítő gyulladás fenntartása (10).

1. ábra. A tumorok általános jellemvonásai. Az ábrán feltüntetett jellegzetességek, képességek általánosan igazak a rosszindulatú daganatokra és ezekre potenciális terápiás célpontokként tekinthetünk. Az eredeti ábra forrása: Hanahan és Weinberg Cell 2011.

A tumorok jellemző tulajdonságainak (cancer hallmarks) létrejötte azonban nem csak a neoplasztikus sejtek abnormális működésének következménye; az elmúlt években számos tanulmány igazolta a tumor mikrokörnyezetének (TME) jelentős hozzájárulását ezen tumor-jellemzők kialakulásához (Hanahan & Coussens Cancer Cell 2012, Wang J Cancer 2017, Yokozaki Pathol Internat 2018). Így a tumor mikrokörnyezet felépítésének, működésének minél pontosabb megismerése, a mikrokörnyezet változásainak, fejlődésének feltérképezése hozzájárul a rosszindulatú daganatok biológiájának megértéséhez és ezáltal a terápiás lehetőségek számának növeléséhez (Fang & DeClerk Cancer Res 2013; Belli Cancer Treatment Rev 2018).

3.2. Tumor mikrokörnyezet

A tudomány hosszú évekig csupán a rákos sejtek viselkedésének megértésére fókuszált; a kutatások középpontjában a daganatképződéshez hozzájáruló mutációk azonosítása, az abnormálisan működő jelátviteli útvonalak feltérképezése és a neoplasztikus sejtek elpusztítása állt. Mai tudásunk alapján azonban nem elegendő pusztán a rákos sejtek tanulmányozása a malignus daganatok viselkedésének megfejtéséhez. A daganatokra komplex szövetként kell tekinteni: nem csak különféle sejtek és extracelluláris mátrix (ECM) alkotók véletlenszerű keverékei, hanem szerveződésük erősen emlékeztet a szöveti struktúráltságra (Egeblad Dev Cell 2010). A tumorrall együtt dinamikusan változó, együtt fejlődő mikrokörnyezet a daganatsejtek és a szervezet kölcsönös egymásra hatásának eredményeként alakul ki és kulcsszerepet játszik a tumor iniciáció és progresszió folyamatában (Polyak Trends In Genet 2009). Az intercelluláris kommunikáció részben fehérjék révén (citokinek, kemokinek, növekedési faktorok), részben RNS molekulák által valósul meg (Guo & Deng Int J Biol Sci 2018). A mikrokörnyezethez köthető, tumort befolyásoló tényezők között említhető az oxigén tenzió, az ECM átrendeződés, az immunkörnyezet, az intersticiális nyomásviszonyok, a mikrokörnyezetben található anyagcsere metabolitok és az angiogenezis (Mueller & Fusenig Nat Rev Cancer 2004).

A szolid daganatok hisztopatológiai vizsgálatai alapján kijelenthető, hogy a tumorok mikrokörnyezete erősen emlékeztet a gyulladásban lévő szövetekre, valamint olyan jellegzetes szövettani változásokat mutat, mint amik a sebgyógyulás során azonosíthatók. A krónikus gyulladás és a tumorképződés közötti kapcsolatot már az 1800-as évek második felében felvetette Rudolf Virchow német orvos, aki megfigyelte a tumorok környezetébe történő leukocita infiltrációt (Korniluk Ir J Med Sci 2017). A gyulladás és a tumorgenezis közötti kapcsolatot azóta számos orvosi megfigyelés és retrospektív adatelemzés igazolta. Elég csak a primer hepatocelluláris karcinómákra gondolnunk, melyek a legtöbb esetben májcirrózis talaján alakulnak ki; ráadásul a betegség mortalitását jelentősen emelik a krónikus májgyulladás következményei (hasúri folyadékfelszaporodás, nyelőcső visszerek vérzése, hepatikus encefalopátia) és a terápiás lehetőségek is sokkal szűkebbek májzsugor esetén (Pinter ESMO 2016; Hung Plos One 2017). Hasonló a helyzet a hosszan fennálló gyulladásos bélbetegségek (Crohn-betegség, colitis ulcerosa) esetén is, az ilyen kórokban szenvedők csoportjaiban a vastagbél tumorok kialakulásának valószínűsége közel hétszer nagyobb, mint a kontroll

csoportban (Beaugerie Gastroenterology 2013). Ezekben az esetekben a daganatképződést igen erősen támogatja a szervezet részéről folyamatosan fennálló, részben a sztrómális sejtek által befolyásolt gyulladásos válaszreakció.

A sebgyógyulás folyamata és a daganatfejlődés ugyancsak számos jellemzőjükben hasonlítanak, nem véletlen definiálja számos kutató a tumorokat úgy, mint „sebek, melyek sosem gyógyulnak meg” (Byun and Gardner Am J Pathol 2013). A sebgyógyulás szorosan szabályozott, egymást követő, részben átfedő lépések sorozataként írható le, mely magában foglalja a sebzést követő vérárvadást, az immunsejtek sebzés helyére történő vándorlását, a fibroblasztok aktivációját, gyulladásos citokinek és növekedési faktorok szekrécióját, majd az epitel sejtek osztódásának eredményeként a hegyszövet/sarjszövet létrejöttét. Sebzést követően az epitel sejtréteg sérülésének velejárója az alatta fekvő kötőszövetes réteg diszfunkciója is, így a sebgyógyulást intenzív ECM átalakulás is kíséri (Velnar Int J Med Res 2009). A tumoros sztróma formálódása, fejlődése során hasonló változások figyelhetők meg a neoplasztikus sejtek közvetlen környezetében, azonban a rákos sejtek növekedése abnormális és elnyújtott sztrómális reakciót eredményez a normál sebgyógyuláshoz viszonyítva (Otranto Cell Adh Migr 2012). A megnövekedett vérér permeabilitás, az aktiválódó fibroblasztok, valamint a trombociták és különféle vérképzőrendszeri progenitor sejtek extravazációja révén a növekedési faktorok mennyisége megemelkedik a tumor mikrokörnyezetben. Ezek a fehérjék főként a fibroblaszt növekedési faktorokat (FGF), a vérlemezke eredetű növekedési faktort (PDGF), a hepatocita növekedési faktort (HGF), a transzformáló növekedési faktor béta 1-et (TGF β 1), a tumor nekrosis faktor alfát (TNF α) és a vaszkuláris endoteliális növekedési faktort (VEGF) jelentik (Schäfer & Werner Nat Rev Mol Cell Biol 2008, Dvorak Cancer Immunol Res 2015). Ezzel átfedően aktív sejtmigrációs események történnek a daganatos elváltozás helyszínén, illetve proliferációs és sejt differenciációs változások figyelhetők meg, ennek eredményeként halmozódnak fel a tumor-asszociált fibroblasztok, a tumor-asszociált makrofágok és egyéb immunsejtek, az endotél sejtek és a periciták a tumor sztrómában (Hill Semin Cancer Biol 2020). A tumor mikrokörnyezet sejtjes elemei aktívan befolyásolják a körülöttük lévő extracelluláris mátrixot mind aktív ECM fehérje termeléssel, mind ECM komponenseket hasító proteáz enzimek szekréciójával (Sundaram FEBS J 2018). Ennek eredményeként a sejtjes elemek mellett egy, a normál szövethez képest jelentősen átstrukturálódott extracelluláris mátrix állomány jön létre (Foster JSI Insight 2018).

3.3. Az extracelluláris mátrix felépítése és megváltozása a tumor sztrómában

A tumor ECM meghatározó komponense a tumorfejlődésnek, hiszen ez nem csak egy passzív, a sejtközütti teret kitöltő fehérjekeverék, hanem alapvető eleme a sejtek közötti kommunikációnak, a sejtadhézióknak, a sejtek proliferációjának, illetve a sejtmozgás mechanizmusainak. Habár az ECM felépítésében részt vevő fehérjék általánosnak tekinthetők az egész szervezetben, minden szervnek, illetve szövettípusnak egyedi a mátrix összetétele és szerveződése (Frantz J Cell Sci 2010). Az ECM-et felépítő alapvető molekulák között találunk fibrilláris fehérjéket, de fontos komponensek a glükózaminoglikánok és a belőlük felépülő proteoglikánok, valamint az adhézións glikoproteinek is. A fibrilláris, rostképző fehérjék legabundánsabb tagjai a különböző típusú kollagének. Ezidáig a molekulacsalád 28 tagját írták le, közülük számosan specifikus szöveti kifejeződést mutatnak. A kollagének felépítésére jellemző a hármas hélix szerkezet, a fehérje hajlékonyságát biztosító glicin aminosav nagyarányú előfordulása, valamint a sejt-mátrix kapcsolatot lehetővé tevő RGD szekvenciák (arginin-glicin-aszpartát) jelenléte. A szintetizálódó kollagének többféle szupramolekuláris struktúrát alakítanak ki, és legfőbb funkciójuk a szövetek szerkezeti integritásának fenntartása (Ricard-Blum Cold Spring Harb Perspect Biol 2011).

A proteoglikánok esetén egy központi fehérjéhez (core protein) glükózaminoglikán (GAG) polimer láncok kapcsolódnak. A GAG-ok nagymértékben szulfatált, negatív töltésű diszacharid egységekből felépülő szénhidrát polimerek. A különböző core proteinek és a GAG polimerek kombinációjából változatos szerkezetű „térkitöltő” molekulák, sok esetben nagyobb szupramolekuláris komplexek képződnek. Az egyetlen GAG polimer, mely szabadon, nem fehérjéhez kapcsoltn is előfordul az ECM-ben, a D-glükuronsav és N-acetil-glükózamin diszacharid egységekből felépülő hialuronsav (Pomin & Mulloy Pharmaceuticals (Basel) 2018). A proteoglikánok jelentőségét alátámasztja a nagyfokú változatosságuk. Funkciójuk is többretű: részben struktúraalkotás, részben a szövetek mechanikai stabilitásának biztosítása, hiszen negatív töltésük révén nagy vízmegkötő képességgel rendelkeznek, így biztosítják a szövetek összenyomással szembeni ellenállását, de emellett részt vesznek a mátrixhoz köthető sejtbiológiai funkciók modulálásában is. Meghatározóak a sejt-sejt, illetve a sejt-mátrix kapcsolatok és a sejtadhézió létrejöttében, valamint számos szolubilis fehérjefaktor (pl. növekedési faktorok, morfogének, citokinek) szekvesztrálása révén befolyásolják többek között

a sejtprolifrációt, sejtmozgást, valamint különböző jelátviteli folyamatokat (Iozzo & Schaefer Matrix Biol 2015).

Az adhéziós glikoproteinek, mint például a pericelluláris fibrilláris hálózatot létrehozó fibronectin vagy a bazális lamina felépítésében részt vevő laminin, szerepet játszanak a sejtek és az ECM szerkezeti elemeinek összerendezésében, illetve a mátrix szerkezetének modulálásában. Felépítésükből adódóan és sokrétű fehérje-fehérje kölcsönhatásaik révén számos sejtbioológiai folyamat résztvevői, mint például a sejtadhézió szabályozás, a morfogenezis és a sejt differenciáció befolyásolás, a sejtmigráció moduláció, illetve a sejt túlélés és az apoptózis reguláció (Xu & Mosher The extracellular matrix: an overview 2011).

Az ECM normál szerkezetének megváltozása, átszerveződése számos patológiás folyamat során megfigyelhető, úgymint fibrózis, különböző szkeletális kórképek, illetve tumorképződés (Cox & Erler Dis Model Mech 2011). A daganat mikrokoznyezetének kialakulása és fejlődése során az egyik legszembetűnőbb változás az ECM fehérjék mennyiségének megváltozása. Ennek hátterében részben az ECM fehérjék génjeiről történő megváltozott expresszió, részben pedig az ECM fehérjék degradációjának eltérő mértéke állhat. Az ECM már kismértékű aktív átstrukturálódása is a sejt-mátrix kapcsolatok megváltozását eredményezi. Ezáltal a sejtek ECM receptorainak tekinthető integrinek kifejeződése és az általuk modulált jelátviteli pályák aktivitása is módosul a daganatos sejtekben, és ennek hatására megváltozik olyan sejtbioológiai folyamatok intenzitása is, mint például a sejtek túlélése, a sejtadhézió, illetve a migráció (Geiger & Yamada Cold Spring Harb Perspect Biol 2011; Hamidi Br J Cancer 2016). Emellett azt is fontos szem előtt tartani, hogy az ECM növekedési faktor rezervoárként tekinthető, számos proteoglikán részt vesz a fehérjefaktorok megkötésében, szekvesztrálásában (Schultz & Wsocki Wound Repair Regen 2009). Ennek következtében a tumor mátrixban megváltozik a növekedési faktorok hozzáférhetősége, hatásideje, degradációja, és az ezzel összefüggésben lévő jelátviteli folyamatok intenzitása (Oskarsson Breast 2013).

A tumor mátrixot illetően nem teljesen egységes a tudományos közegben kialakult kép. Az ECM szerkezeti átalakulása a rákos sejtek köznyezetében részben a mátrix alkotók mennyiségi megváltozásából fakad. Számos közleményben a szerzők egyenes arányosságba állítják az ECM komponensek megnövekedett expresszióját és/vagy szekrécióját a tumoros folyamat előrehaladásával (pl. kollagén I, III és IV: Walker Int J Mol Sci 2018). Ugyanakkor arra is találhatunk adatot, hogy a kollagén csökkent szekréciója a tumor sztrómába, illetve a kollagén

megnövekedett degradációja játszik lényeges szerepet a daganatsejtek malignus viselkedésében (Arnold Dis Model Mech 2010). A mennyiségi változás mellett minőségi, eltérésekről is olvashatunk a közleményekben. Ennek jó példája az extracelluláris tér fehérjéinek glikolizációs mintázatbeli megváltozása (Winkler Nat Commun 2020). Amiben egyetértés mutatkozik a témában publikáló kutatók között az az, hogy a daganat fejlődését, invazív tulajdonságait jelentősen meghatározó tényező az ECM szerkezetének, merevségének, biomechanikai tulajdonságainak megváltozása (Provenzano BMC Med 2006). A daganatos sztrómára jellemző a kollagének struktúrált, parallel elrendeződése, a kollagének közti keresztkötések számának emelkedése, ezáltal a rigiditásának megnövekedése; ehhez elengedhetetlen a lizil-oxidázok fokozott aktivitása, melyek közreműködése révén keletkező allizin oldalcsoportok elősegítik a bi- és trifunkcionális keresztkötések kialakulását (Malik Trends Biotechnol 2015; Fang Tumour Biol 2014).

A fibrilláris komponensek mellett a proteoglikánok is aktív részesei a tumor ECM átalakulásának, elég csak a kis, leucin-gazdag proteoglikánok kollagén fibrillogenezist befolyásoló hatására gondolni (Filipe Int J Exp Pathol 2018). Egyes proteoglikánok esetén mennyiségi csökkenést igazoltak a tumor ECM-ben, ilyen például a decorin. A decorin tumor szuppresszív hatású, mivel képes megkötni az epidermális növekedési faktorokat, így antagonizálni a hatásukat (Bi & Yang Chin J Cancer 2013), emellett befolyásolja az angiogenezist és gátolja a vastagbél tumorsejtek migrációját (Bi Carcinogenesis 2012).

3.4. A tumor mikrokörnyezetének sejtes elemei

A rosszindulatú daganatok kialakulása többlépcsős, legtöbbször évtizedekig tartó folyamat eredménye, melynek során a malignus sejtekben akkumulálódnak azok a driver mutációk, melyek szelekciós előnyt jelentenek a daganat fejlődése szempontjából. Ennek révén képessé válnak arra is, hogy különböző normál, egészséges sejteket is maguk köré toborozzanak, így kialakítva egy tumor-támogató mikrokörnyezetet (Yuan Oncol Rep 2016). A TME komplex ökoszisztémaként értelmezhető. A malignus és a sztrómális sejtek közötti, főként citokinek, kemokinek, növekedési faktorok révén megvalósuló folyamatos, kétirányú kommunikáció biztosítja a tumort segítő reaktív sztróma kialakulását és fennmaradását (Quail & Joyce Nat Med 2013; Balkwill J Cell Sci 2012).

Ebben a daganatos mikrokörnyezetben a toborzás eredményeként számos mezenhimális eredetű, nem-neoplasztikus sejt feldúsulása figyelhető meg (2. ábra): ezek között a nem-transzformált sztrómális sejtek között legnagyobb számban fibroblasztokat, endotél sejteket, pericitákat, adipocitákat, makrofágokat és egyéb immunsejteket találunk (Langsten Front Oncol 2019). A mikrokörnyezetben található immunsejtek két nagyobb csoportot alkotnak, az egyik csoport a tumor-ellenes immunsejteket foglalja magába, míg a másik a tumor-támogató immunsejteket. Az előbbi csoportba tartoznak a $CD8^+$ (citotoxikus) és $CD4^+$ limfociták, a természetes ölősejtek (NK sejt), az antigén-prezentáló dendritikus sejtek és az M1 irányba polarizálódott makrofágok (Lei Cancer Lett 2020). Ezek az immunsejtek a folyamatos immunellenőrzést (immune surveillance) fenntartva aktívan hozzájárulnak a felismert tumorsejtek elpusztításához a tumor antigének bemutatásán keresztül aktiválódó direkt citotoxicitási folyamatokkal, valamint gyulladásos és egyéb citokinek, kemokinek termelésével (Farhood J Cell Physiol 2019; Guillerey Nat Immunol 2016). A daganat fejlődése során azonban kisselektálódhatnak olyan tumorsejtek, melyek dominanciát nyernek az immunsejtek felett, mert ellenállóbbak az immunrendszer támadásával szemben, valamint immunogenitásuk csökken és képesek „elrejtőzni” az immunellenőrző folyamatok elől (Mittal Curr Opin Immunol 2014). Emellett ezek a tumorsejtek immunszuppresszív citokineket és immunregulációs faktorokat (TGF- β , VEGF, programozott sejthalál ligand 1-et, interleukin-6 és 10, indolamin-2,3-dioxigenáz) expresszálnak, illetve szekretálnak a környezetükbe, valamint tumor-támogató immunsejteket (regulátor T-sejtek, M2 irányba polarizált makrofágok, mieloid eredetű szupresszor sejtek) toboroznak, így létrehozva a daganat fejlődését segítő, immunszuppresszált mikrokörnyezetet (O'Donnell Nat Rev Clin Oncol 2019; Schreiber Science 2011).

A megfelelő immunkörnyezet mellett a malignus tumorok korlátlan növekedésének másik előfeltétele a tumor angiogenezis aktiválódása. Az 1-2 mm³-nél kisebb térfogatú daganatok esetén a diffúzió elégséges a sejtek oxigén- és tápanyag ellátásához, azonban ennél nagyobb daganatoknál új vér- és nyirokerek létrejötte szükséges a tumorsejtek osztódásához, túléléséhez. Emellett a daganatokban feldúsuló kapilláris hálózatlétezővé teszi a tumorsejtek könnyebb invázióját, metasztázis(ok) kialakulását is, mivel a malignus sejtek szervezeten belüli szóródásához kulcs lépés a kapillárisokba történő belépésük, azaz az intravazáció (Lugano Cell Mol Life Sci 2020). A tumorok vaszkularizációjához nélkülözhetetlenek a tumor sztrómában található endotél sejtek és periciták: angiogenezis során a létrejövő új kapillárisok építőkövei

az endotél sejtek, míg a periciták kívülről asszociálódnak és stabilizálják a véredény vázát. A tumorok fejlődése során az angiogenezis aktiválásához ("angiogenic switch") túlsúlyba kell, hogy kerüljenek a pro-angiogenikus faktorok, mint például a VEGF-ek, a PDGF-ek, az FGF2, illetve az angiopoietinek. Ezen angiogenezist aktiváló fehérjék serkentik az addig nyugalomban lévő, nem osztódó endotél sejtek proliferációját, migrációját, így megtörténhet az új érbimbó kialakulása (Hida *Int J Mol Sci* 2018; Sobierajska *Adv Exp Med Biol* 2020). Az angiogenezis legfőbb induktora a növekvő tumor hipoxiás mikrokörnyezete, de a malignus sejtekben bekövetkező genetikai mutációk, valamint a mikrokörnyezet sztrómális sejtjei is szerepet játszhatnak az angiogenikus szignálok aktivációjában (Piulats & Mitjans *Principles of Molecular Oncology* 2018).

Az endotél sejtek mellett a periciták is igen fontos szerepet töltenek be a tumor vaszkularizációban. Szerepük nem csak az érfal mechanikai stabilizálása, hanem szabályozzák a létrejött kapillárisok permeabilitását, valamint növekedési faktorok és proteáz enzimek termelése révén aktívan serkentik az endotél sejtek proliferációját és az ércső képződését (Ribeiro & Okamoto *Stem Cells Int* 2015). Habár a korábbi tanulmányok a tumorokban található pericitákat főként a neovaszkularizációval hozták összefüggésbe, az utóbbi évek kutatásai bizonyítékot szolgáltatottak arra, hogy ezek a sejtek ennél jóval sokrétűbb szerepet töltenek be a daganatos mikrokörnyezetben. Ma már ismert, hogy a periciták immunmoduláns tulajdonsággal rendelkeznek; citokinek, kemokinek és egyéb immunmoduláns faktorok szekréciójával részt vesznek az immunszuppresszív mikrokörnyezet kialakításában (Navarro *Front Immunol* 2016). Emellett befolyásolhatják a metasztázisok kialakulását is, mivel részt vehetnek a premetasztatikus niche kialakításában, valamint szerepet játszhatnak a keringő tumorsejtek extravázációjában és a másodlagos növekedési helyen történő kolonizációjában (Paiva *Cancer Res* 2018; Sinha *Clin Cancer Res* 2015).

Az elmúlt évek retrospektív vizsgálatait és statisztikai alapján az elhízás a rosszindulatú daganatos betegségek komoly rizikófaktoraként azonosítható (Quail & Dannenberg *Nat Rev Endocrinol* 2019). A hatásmechanizmus még számos pontját homály fedi, azonban az adipociták parakrin tumor stimuláló funkcióját kísérletes adatok támasztják alá (Hoy *Trends Mol Med* 2017). A legtöbb tumor sztrómájában azonosíthatók speciális, aktivált fenotípust mutató zsírsejtek, melyeket az irodalom tumor-asszociált adipocitákként (cancer-associated adipocyte, CAA) azonosít. Ezek a zsírsejtek eltérő méretűek és kisebb lipidcseppeket tartalmaznak, mint a normál zsírszövet sejtjei, emellett olyan citokineket, adipokineket (pl. IL-

6, IL-1 β , leptin) szekretálnak, melyek serkentik a tumorsejtek invázióját, metasztázis képzését (Dirat Cancer Res 2011; Wu J Hematol Oncol 2019). Ezen felül a CAA sejtek metabolikus kapcsolatot alakítanak ki a neoplasztikus sejtekkel: lipid transzfer történik köztük, fokozódik a tumorsejtekben a bejutó zsírsavak oxidációja és ez fokozza az epiteliális-mezenhimális tranzíciót (EMT) és a tumorsejtek invazivitását (Wang JCI Insight 2017; Attané Curr Med Chem 2020).

2. ábra. A tumor mikrokörnyezet (TME) felépítése. A tumorsejtek mellett számos nem-tumoros sejt toborzása történik meg a tumor mikrokörnyezet kialakulása és fejlődése során. Az ábra forrása: Talib Molecules 2020.

A legtöbb szolid daganat esetén a sztrómális sejtek között legnagyobb számban fibroblaszt jellegű sejteket találunk, melyekre az irodalom tumor (rák)-asszociált fibroblasztként (Cancer Associated Fibroblast; CAF) hivatkozik (Monteran & Erez Front Immunol 2019). A fibroblasztok, mint nyugvó sejtek, kis számban megtalálhatók a normál működésű szövetek kötőszöveti állományban is, szerepük főként a szöveti homeosztázis fenntartása. Emellett aktív részesei az ECM fehérjék termelésének és lebontásának; valamint a IV-es típusú kollagén és laminin fehérjék szekréciójával hozzájárulnak a bazális membrán organizációjához is (Alkasalias Int J Mol Sci 2018). Sebzést, sérülést követően reverzibilisen aktiválódnak, proliferálnak és egy részük miofibroblasztokká differenciálódik, így aktív

résztvevői a granulációs (heg) szövet létrejöttének és a sebgyógyulás folyamatának (Gurtner Nature 2008). A jól kontrollált sebgyógyulási folyamatokban a sebzáródást követően a hegyszövet (mio)fibroblasztjainak legnagyobb része apoptózissal elpusztul. A rosszindulatú tumorok kötőszövetében viszont ez nem történik meg, hanem épp ellenkezőleg, jelentős elemszámú CAF populáció jön létre.

A tumorokban található fibroblasztok fontosságát jól mutatja, hogy összehasonlító tanulmányok eredményei alapján a CAF-ok nagyszámú jelenléte a tumorszövetben rosszabb prognózissal társul: gyakoribb a relapszus, a (kemo)terápiával szembeni rezisztencia kialakulása és rövidebb a túlélési idő (Paulsson & Micke Semin Cancer Biol 2014; Fiori Mol Cancer 2019). Mindebből adódóan a CAF-okat ígéretes terápiás célpontnak tekintik, azonban a helyzet nem ennyire egyszerű. A CAF-ok ugyanis heterogén sztrómális sejtcsoportot alkotnak, különféle mezenhimális/fibroblaszt markerek alapján több alpopulációra különíthetők el (Sugimoto Cancer Biol Ther 2006; Orimo & Weinberg Cancer Biol Ther 2007). A CAF-ok nem csak fenotipikusan mutatnak heterogenitást, hanem funkcionálisan is különbözhetnek egymástól, ez számos esetben a CAF-ok tumoron belüli lokalizációjában is megnyilvánul. Jó példa erre a tumorsejtek invazivitását elősegítő CAF-ok dúsulása a daganatok invazív frontjában (Kanzaki & Pietras Cancer Sci 2020; Sandberg Cancer 2019).

A szakirodalom funkcionálisan alapvetően két CAF altípust különít el, az egyik a tumor-támogató, míg a másik a tumor-szupresszor CAF-okat gyűjti csoportba (LeBleu & Kalluri Dis Model Mech 2018). Az utóbbi, a tumor növekedését visszaszorító CAF-ok által működtetett anti-tumor mechanizmusok még kevésbé ismertek, eddigi közlemények alapján főként immunmoduláló aktivitáson alapulnak (Ozdemir Cancer Cell 2014; Rhim Cancer Cell 2014). Ezzel ellentétben a tumor fejlődését segítő CAF-ok tevékenységével kapcsolatban nagyszámú publikáció született az utóbbi években, melyekből jól kirajzolódnak azok a mechanizmusok, melyek a tumor-támogató CAF sejteket jellemzik. Fibroblaszt jellegükből adódóan nem meglepő, hogy a daganat fejlődését elősegítő CAF-ok egyik legfontosabb aktivitása a tumorsejteket körülvevő ECM átalakítása. Ezt részben az ECM alkotók megváltozott szekréciójával, részben pedig különféle proteázok (MMP-k, uPA) termelésével valósítják meg (Miles & Sikes Mol Cancer Res 2014). Emellett ezen CAF populáció parakrin módon, citokinek, kemokinek, növekedési faktorok, mint a TGF- β , a HGF, a kötőszöveti eredetű növekedési faktor (CTGF), az osteopontin és az IL-6 szintézise és szekréciója révén segíti elő több fronton is a tumor progressziót (Sahai Nat Rev Cancer 2020). A tumorsejtekkel történő

intenzív metabolikus kapcsolatok kialakítása és fenntartása ugyancsak része a tumor-támogató CAF-ok eszköztárának. Ennek révén módosul mind a tumorsejtek, mind pedig a CAF-ok bioenergetikai és bioszintetikus útvonalainak aktivitása, így könnyebben adaptálódnak a hipoxiás, tápanyagokban szegényebb körülményekhez (Fiaschi Cancer Res 2012).

3.5. Miofibroblasztok, a tumor-asszociált fibroblasztok legnépesebb alpopulációja

A tumor-asszociált fibroblasztok legnagyobb elemszámú, domináns sejtpopulációját a miofibroblasztok alkotják, melyek vélhetően a tumor-támogató mikrokörnyezet kialakulásában kiemelt szerepet játszanak (Ishii Adv Drug Deliv Rev 2016). A miofibroblasztokat eredendően a sebgyógyulásban részt vevő, aktivált kötőszöveti sejtekként definiálták, melyek részt vesznek a sarjszövet létrehozásában, az extracelluláris mátrix átalakításában és kontraktilis tulajdonságuk révén a sebszélek összehúzásában (Gabbiani Experientia 1979). Ezek az orsó vagy ritkábban csillag alakú, karélyos sejtmaggal rendelkező sejtek fiziológiás állapotban is megtalálhatók a szervezetben: a tápcsatornában például a nyelőcsőtől kezdődően egészen a végbélig azonosíthatók a nyálkahártya hámrétege alatt, a kripták körül elhelyezkedve. Szerepet játszanak az intesztinális nyálkahártya fejlődésében, a szöveti struktúra épségének megóvásában és az esetleges nyálkahártya sérülések reparálásában (Powell Am J Physiol 1999 I&II).

A miofibroblasztok ötvözik a fibroblasztok és a simaizomsejtek egyes tulajdonságait. Immunfenotípusuk/markereik az alábbiak: a citoskeletális fehérjék közül nagy mennyiségben expresszálják az alfa simaizom aktint (α -SMA) és a vimentin fehérjét, valamint pozitívak a fibronectin EDA (extra domén A) variánsára; míg ritkább altípusaik kivételével negatívak a simaizom miozin és dezmin fehérjékre (Bagalad J Oral Maxillofac Pathol 2017). Elektronmikroszkópos felvételek tanúsága alapján ultrastruktúrájukra jellemző az igen fejlett durvafelszínű endoplazmatikus retikulum, valamint citoplazmájukban számos Golgi-vezikulum azonosítható, alátámasztva aktív fehérje szintetizáló és szekretáló funkciójukat (Eyden J Cell Mol Med 2008). Emellett fejlett sejt-mátrix kapcsolat jellemzi őket: a plazmamembrán alatt, azzal párhuzamosan lefutó, α -SMA-ból felépülő stressz-fibrillumok

révén az extracelluláris térben lévő, a sejtek membránjához rögzült fibronectin kötegekhez kapcsolódnak, így létrehozva a fibronexus junkciót. Ez a miofibroblasztokra igen karakteres sejt-mátrix kapcsolat az alapja számos, a miofibroblasztokhoz köthető aktivitásnak, úgymint kontraktilitás, sebszélek összehúzása (Hinz J Invest Dermatol 2007). A miofibroblasztok nem csak az extracelluláris tér fehérjével állnak kapcsolatban, hanem egymással is; a connexin fehérjék által felépített rés kapcsolatokon (gap junction) keresztül egymással kommunikáló, funkcionális egységet képeznek (Eyden Int J Cancer 2009).

Az elmúlt években számos sejt nyomkövetési vizsgálat irányult a miofibroblasztok prekursorainak felkutatására sebgyógyulás, fibrózis, illetve daganatfejlődés esetén (Chaudhari SRM J Res Dent Sci 2015; Hinz Am J Pathol 2012). Ezek eredményei arra utalnak, hogy többféle sejtípus is szolgálhat a miofibroblasztok prekursoraként (3. ábra). Számos kísérleti adat bizonyítja, hogy a fibrociták és a lokálisan található szöveti fibroblasztok aktivációja, miofibroblaszttá történő differenciációja gyakori esemény sérülést követően bőr- (Darby Clin Cosmet Investig Dermatol 2014), tüdő- (Schmidt J Immunol 2003), szívizom- (van den Borne Nat Rev Cardiol 2010), máj- (Dranoff Hepatology 2010) és veseszövetben (Sato Inflamm Regen 2017). Emellett ugyancsak számos közlemény szolgáltat bizonyítékot a malignus epitheliális tumorok környezetében bekövetkező fibroblaszt – miofibroblaszt átalakulásra (Webber Cancer Res 2010; Shukla Oncogene 2014).

A szöveti fibroblasztokon kívül találunk példát arra is, hogy epitheliális sejtek alakulnak át miofibroblaszttá az epitheliális-mezenhimális tranzíció (EMT) révén, ezt a mechanizmust leírták különféle fibrotikus folyamatokban és a tumorfejlődés során ugyancsak (Li Exp Biol Med 2016; Radisky J Cell Biochem 2007). Emellett megfigyelhető egy nagyon hasonló átalakulás, az endoteliális-mezenhimális tranzíció (EndMT) is, melynek következtében az erek falát alkotó endotél sejtekből is képződhetnek miofibroblasztok a szervezetünkben (Kizu Am J Pathol 2009; Akatsu Mol Oncol 2019). A csontvelőből származó mezenhimális őssejtek (MSC) ugyancsak prekursorai lehetnek a daganatokban található miofibroblasztoknak (Direkze Cancer Res 2004; Mori Exp Cell Res 2005). Állatmodellben, transzplantált MSC-k szervezeten belüli útját követve megfigyelték, hogy az MSC-k megjelennek a tumor mikrokörnyezetben és itt aktiválódva miofibroblasztokká alakulnak (Direkze Stem Cell 2003). Az eredményeket *in vitro* is megerősítették, melynek során tumorossejtekről származó médium hatására a kultúrált MSC-k miofibroblaszttá differenciálódtak (Mishra Cancer Res 2008).

3. ábra. Miofibroblaszt prekursor sejtek a szervezetben. A sematikus ábrán azok a sejtípusok láthatóak, melyek normál vagy patológiás körülmények között miofibroblasztta képesek transzdifferentiálódni. Az ábra forrása: De Wever és mtsai Int J Cancer 2008.

3.6. Miofibroblaszt aktiváció, a miofibroblasztok tumorfejlődést segítő jellemvonásai

Függetlenül attól, hogy milyen prekursor sejtről beszélünk, a miofibroblasztta történő átalakuláshoz, aktiválódáshoz néhány esszenciális, általában a daganatsejtek által termelt faktor jelenléte szükséges (Webber Oncogene 2015). Az egyik legpotensebb miofibrogenikus fehérje a TGF- β , melynek fontos szerepét már korábban is leírták a sebgyógyulás és a tumorgenezis kapcsán (Evans Exp Cell Res 2003; Scharenberg J Cell Sci 2014). A TGF- β hatására megindul a prekursor sejtekben a miofibroblasztok egyik fő markerének, az α -SMA-nak a szintézise, ugyanakkor a TGF- β képes indukálni saját expresszióját is, így elindítva egy autokrin jelátviteli folyamatot (Kojima PNAS 2010). A TGF- β mellett más növekedési faktorok, illetve citokinek is részt vehetnek a miofibroblaszt irányú differenciáció szabályozásában, ilyenek például a

PDGF, a CTGF, a TNF- α , az IL-1 β , az IL-6 és a Wnt7a (Kis Exp Rev Mol Med 2011; Avgustinova Nat Commun 2016).

A tumor sztrómában nagy számban felhalmozódó miofibroblasztok kiemelt szereplők a TME megváltozásában, átalakulásában és ezzel összefüggésben a tumor progresszió és áttétképződés folyamatában (De Wever Int J Cancer 2008). A tumor-asszociált miofibroblasztok által szekretált fehérjék között a kötőszöveti elemek mellett nagy mennyiségben találunk különféle citokineket, növekedési faktorokat, melyek révén a miofibroblasztok hozzájárulhatnak a tumorsejtek fokozott proliferációjához és aktiválhatják a daganatsejtekben a motilitásához szükséges EMT-t, így fokozva a metasztatikus aktivitást (Slany Electrophoresis 2013; Yazdani Adv Drug Deliv Rev 2017). Emellett arra is található adat, hogy a daganatok kemoterápiával szembeni rezisztenciájának kialakulását is előremozdíthatják, ugyanis a miofibroblasztok által exoszómákban kibocsátott oldékony fehérjefaktorok és nem kódoló RNS-ek képesek fokozni a tumorsejtek túlélését, a tumor összejt irányú differenciációt és ezáltal a kemorezisztencia létrejöttét (Richards Oncogene 2017; Ren Theranostics 2018). Ugyancsak szolubilis faktorok termelése által a miofibroblasztok aktív részesei az angiogenesisnek: VEGF, HGF, FGF növekedési faktorok kibocsátásával endotél sejteket toboroznak a tumorhoz és fokozzák azok osztódását, valamint az éreső formálódását (Vong & Kalluri Genes Cancer 2011; Drebert Vascul Pharmacol 2017). A miofibroblasztok a tumor immunmikrokörnyezet formálásában is szerepet játszanak, mivel gyulladásos kemoattraktáns citokinek szekréciójával elősegítik a keringő leukociták kilépését a gyulladás helyszínére (homing) és fokozzák ezen sejtek MMP-9 termelését, ami a bazális lamina degradációjával megteremti a transzendoteliális migráció lehetőségét. Emellett adhézión fehérjéket is expresszálnak, így lehetővé teszik a különféle immunsejtek dokkolását (Van Linthout Cardiovasc Res 2014). Végül, de nem utolsósorban a miofibroblasztok kitüntetett feladatot töltenek be az ECM átalakításában és ezzel összefüggésben a metasztázisok létrejöttében. A daganatok invazív frontjában összegyűlő miofibroblasztok mátrix metalloproteináz enzimek szekréciójával elősegítik a mátrix fehérjék (kollagének, proteoglikánok, adhézión glikoproteinek) degradációját, így teret nyitnak a tumorsejtek szöveti infiltrációjához, a vér- és nyirokerekbe történő bejutásához (De Wever & Mareel Biol Chem 2002; Mehner & Radisky Exp Cell Res 2013).

3.7. A mátrix metalloproteinázok

A mátrix metalloproteinázok (MMP) cink-tartalmú, kalcium-függő endopeptidázok (EC nomenklatura szerinti 3. 4. 24. csoport), melyek szintézisére és szekréciójára számos sejttípus képes. Az MMP enzimek funkciója, szöveti eloszlása különböző, így klasszifikációjuk szerkezeti felépítésük, illetve szubsztrátpreferenciájuk alapján történik (Egeblad & Werb Nat Rev Cancer 2002). Az MMP-k részleges homológiát mutatnak, doménszerveződésük alapján 8 csoportba sorolhatók (4. ábra). Ha katalitikus sajátosságukat nézzük, megkülönböztethetünk kollagenázokat, zselatinázokat, sztromelizineket, matrilizineket és membránkötött formában működő enzimeket. Az MMP-k részt vesznek az ECM fehérjék és glikoproteinek bontásában, és ezáltal a szövetek átépítésében, a sejtközi állomány formálásában (Page-McCaw Nat Rev Mol Cell Biol 2007). Emellett hasítanak különböző extracelluláris szolubilis faktorokat (növekedési faktorok, citokinek), membránkötött receptorokat, ezzel befolyásolva számos jelátviteli folyamatot (Somerville Genome Biol 2003). Az extracelluláris funkciók és szubsztrátok mellett, az utóbbi időben feltárták az MMP-k szerepét különféle intracelluláris folyamatokban is (Jobin BBA Mol Cell Res 2017). Jó példa erre az MMP2 szerepe a szívizom iszkémia-reperfúziós károsodásának patomechanizmusában (Wang Circulation 2002), a trombociták által termelt MMP-k tevékenysége a trombus képződésben és a hemosztázisban (Mastenbroek Arterioscler Thromb Vasc Biol 2015), a sejtmagban lokalizálódó MMP-k által történő poli-ADP-ribóz-polimeráz hasítás és apoptózis indukció (Hill Neuroscience 2012) vagy a réskapcsolatok működésének modulálása, ezáltal sejtek közötti kommunikáció befolyásolása (De Bock Mediat Inflamm 2015). Ha a fiziológiai szerepkört nézzük, az MMP-k nélkülözhetetlenek olyan folyamatokban, mint például a terhesség létrejötte és az embrionális egyedfejlődés, a szöveti átrendeződés, az új erek képződése (neoangiogenezis), a megfelelő immunválasz kialakulása, illetve a sebgyógyulás (Brinckerhof & Matrisian Nat Rev Mol Cell Biol 2002; Löffek Eur Resp J 2011). Emellett számos olyan patológiai állapotot ismerünk, melyek esetén megfigyelhető az MMP-k fokozott mértékű kifejeződése, aktivitása; elég csak a szöveti fibrózisra (máj cirrózis, tüdő fibrózis – COPD), a kardiovaszkuláris megbetegedésekre, az ateroszklerózisra, a gyulladásos folyamatokra és a daganatok fejlődésére gondolnunk (Mittal J Cell Physiol 2016). Így az MMP-k aktivitásának szabályozása, gátlása régóta a kutatások középpontjában áll.

Minimális domént tartalmazó MMP-k (MMP7, 26)

Hemopexin domént tartalmazó egyszerű MMP-k (MMP1, 3, 8, 10, 12, 13, 19, 20, 27)

Zselatin-kötő MMP-k (MMP2, 9)

Furin által aktiválható, szekretált MMP-k (MMP11, 28)

Vitronektin-szerű régiót tartalmazó MMP (MMP21)

Transzmembrán MMP-k (MMP14, 15, 16, 24)

GPI által kihorgonyozott MMP-k (MMP17, 25)

2-es típusú transzmembrán MMP (MMP23a és b)

4. ábra. A mátrix metalloproteinázok szerkezete. Az MMP enzimeket doménfelépítésük alapján 8 csoportba sorolhatjuk, ebből 5 csoport tagjai szekretált, szolubilis MMP-k, míg a maradék 3 csoportba sorolt enzimek membránkötött formában találhatók meg a sejtek felszínén. Rövidítések: **Pre**: N-terminális szignál peptid; **Pro**: az inaktív formában tartásért felelős, tiol-csoportot (**SH**) tartalmazó propeptid domén; **Catalytic**: katalitikus aktivitást hordozó domén cink (**Zn**) kötő hellyel; **H**: összekötő (Hinge) régió; **Hemopexin**: szubsztrátkötésért felelős, diszulfid-híd tartalmú hemopexin domén; **Fi**: fibronectin ismétlődések; **Fu**: furin felismerő helye; **Vn**: vitronektin-szerű régió; **TM**: transzmembrán domén; **Cy**: citoplazmatikus domén; **GPI**: glikozil-foszfatidil-inozitol horgony; **SA**: membránba horgonyzó szignál szekvencia; **CA**: cisztein-gazdag domén; **Ig-like**: immunglobulin-szerű domén. Az ábra forrása: Egeblad és Werb Nat Rev Cancer 2002.

Az MMP-k termelődése, aktivitása több szinten, szigorúan szabályozott. Az MMP enzimek zimogén formában szintetizálódnak: az enzimfehérje N-terminálisán található cisztein tartalmú autoinhibitoros motívum (N-terminális propeptid) és az aktív centrum Zn^{2+} -ja között intramolekuláris kölcsönhatás alakul ki, ezáltal az enzimmolekula katalitikusan inaktív. Aktiválódása történhet limitált proteolízis hatására, ekkor lehasad az N-terminális propeptid, így a Zn^{2+} szabaddá válik, peptid kötés hidrolízisére alkalmas enzimmolekulát eredményezve (Cerofolini Curr Med Chem 2019). A limitált proteolízist leggyakrabban egy másik, már aktív MMP katalizálja, így például az intracellulárisan, a furin által aktivált membránkött MMP14 a sejtfelszínre kerülve aktiválja a környezetében megtalálható más MMP enzimmolekulákat. Az MMP-k aktiválódása azonban megtörténhet különböző fiziko-kémiai ágensek hatására is, ugyanis az alacsony pH, a reaktív oxigén szabadgyökök, a tiol-csoportot befolyásoló molekulák, a detergenssek és a különféle kaotróp ágensek megszüntetik a propeptid ciszteinje és a Zn^{2+} közti koordinációs kötést, így az enzim konformációja megváltozik, aktívvá válik (Cui Prog Mol Biol Transl Sci 2017). Az MMP aktivitást endogén inhibitor fehérjemolekulák is képesek befolyásolni, szabályozni. A TIMP fehérjék (Tissue Inhibitors of MetalloProteinases) és az MMP-k 1-1 arányban képesek egymáshoz kapcsolódni, és ebben a komplexben az MMP enzimek katalitikus aktivitása gátolt (Nagase Cardiovasc Res 2006).

4. Célkitűzés

A napjainkig összegyűlt tudás alapján nem kérdőjelezhető meg a miofibroblasztok jelentős hozzájárulása a daganatos folyamat progressziójához és a metasztázisok kialakulásához. Azonban ismereteink hiányosak még abban a tekintetben, hogy pontosan milyen változásokon mennek keresztül a miofibroblasztok a tumor mikrokörnyezetében, és hogyan válnak potens tumor-támogató sztrómális sejtekké.

Ezért munkánk során célul tűztük ki, hogy feltérképezzük a hasonlóságokat és a különbségeket a daganatokból valamint a normál, egészséges szövetből származó miofibroblaszt sejtek között. Kérdéseink megválaszolásához gasztrointesztinális tumorban szenvedő páciensekből izolált miofibroblaszt mintapárokat használtunk, ahol a mintapár egyik tagja a tumorból, míg a másik tagja a tumortól néhány cm távolságra, a szövet egészséges részéből származott.

Az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

1. Genetikai változások felelősek a tumorból származó miofibroblasztok megváltozott működéséért?
 - a válaszhoz tumoros folyamatokban érintett gének variáns analízisét végeztük el célzott újgenerációs szekvenálással.
2. Epigenetikai oka van a tumor-asszociált miofibroblasztok megváltozott működésének?
 - a sejtek epigenetikai státuszának felméréséhez hiszton poszttranszlációs módosítások szintjét vizsgáltuk immuncitokémiával és western blot módszerrel.
3. Milyen génexpressziós változások állnak a miofibroblasztok tumor-támogató fenotípusának hátterében?
 - a génexpressziós változások azonosításához meghatároztuk 190 tumorprogresszióban feltételezhetően szerepet játszó gén kifejeződésének mértékét TaqMan próba alapú génexpressziós array-t alkalmazva.

4. A tumorok szervezetben történő elterjedésében és a metasztázis létrejöttében lényeges szerepet játszik az extracelluláris mátrix összetételének megváltozása, amit az ECM alkotókat termelő és szekretáló miofibroblasztok aktívan befolyásolhatnak.

- a feltevés igazolásához tanulmányoztuk egyes ECM fehérjéket kódoló gének kifejeződésének mértékét QPCR segítségével.

5. A tumor mátrix átalakulásban nagy hangsúlyt kapnak az ECM-ot bontó mátrix metalloproteináz enzimek. Kíváncsiak voltunk arra, vajon a tumor-asszociált miofibroblasztok hozzájárulnak-e aktívan, és ha igen, milyen mértékben a tumor ECM módosítását katalizáló enzimek mennyiségének és aktivitásának növekedéséhez.

- ennek tisztázásához meghatároztuk több, az ECM fehérjéket hasítani képes mátrix metalloproteináz enzim génjéről képződött mRNS-ek mennyiségét QPCR módszerrel.

- vizsgáltuk az MMP3 és MMP10 fehérje mennyiségét western blot segítségével.

- elemeztük a tumorok invazív frontjában gyakran előforduló MMP2 enzim aktivitását zselatin zimográfia alkalmazásával.

6. Kíváncsiak voltunk továbbá arra, hogy a tumorokból származó miofibroblasztok funkcionális szempontból különböznek-e a normál szövet miofibroblasztjaitól, alkalmasak-e arra, hogy segítsék a tumorsejtek invázióját, metasztázis képzését.

- a sejtek funkcionális jellemzéséhez teszteltük a miofibroblasztok migrációs képességét *in vitro* sebzési („wound healing”) vizsgálattal.

5. Betegek, alkalmazott anyagok és módszerek

5.1. Vegyszerek és reagensek

A kísérleteinkhez használt általános vegyszereket és reagenseket az alábbi cégektől szereztük be (amennyiben másként nem jelezzük): Sigma-Aldrich, Molar. A molekuláris biológiai kísérletekhez használt általános reagensek forrása: Thermo Fisher Scientific.

5.2. Etikai engedély

A humán minták gyűjtése, kezelése és felhasználása a Helsinki Nyilatkozat értelmében és a Szegedi Tudományegyetem Etikai Bizottságának engedélyével történt. Az engedély száma, a kiadás időpontja és a kérvényező neve: 37/2006; 2006. március 20.; Dr. Hegyi Péter. A betegek hozzájárultak a szövetmintáik molekuláris biológiai feldolgozásához.

5.3. Miofibroblaszt sejtek izolálása és tenyésztése

A kísérleteinkhez felhasznált tumor-asszociált és kontroll miofibroblaszt sejteket az I. számú Belgyógyászati Klinika Prof. Dr. Hegyi Péter által vezetett Gasztroenterológiai Munkacsoportja bocsátotta rendelkezésünkre. A sejtek izolálása gasztrointesztinális (GI) daganatban szenvedő páciensekből történt, a tumor eltávolító műtét során kimetszett szövetcsontok felhasználásával (Czegan Pflugers Arch 2012). Minden páciens műtéti preparátumából két primer miofibroblaszt kultúra izolálása történt meg: egy a tumorszövetből, erre a továbbiakban a tumor-asszociált miofibroblaszt megnevezést használom, valamint egy kultúra a tumor által nem érintett szövetből, ennek megnevezése normál (kontroll) miofibroblaszt. Ebből adódóan minden tumor-asszociált miofibroblaszt mintát az ugyanabból az emberből származó kontroll miofibroblaszt mintához tudunk hasonlítani. A kísérletek során felhasznált miofibroblaszt minták, az izolálásba bevont páciensek, valamint a tumorjaik hisztopatológiai jellemzőit az 1. táblázat foglalja össze.

Az izolált miofibroblaszt sejteket 4,5 g/l glükóz tartalmú DMEM médiumban tenyésztettük, a médiumot 10% borjú szérummal (FBS), 4 mM glutaminnal, 2% antibiotikum-antimikotikum keverékkel, 1% penicillin-sztreptomomicinnel és 1% nem-esszenciális aminosav keverékkel egészítettük ki. A sejtenyésztéshez felhasznált oldatokat a Sigma-Aldrich cégtől szereztük be. A miofibroblasztokat 37°C-on, megfelelő páratartalmat és 5% CO₂-t biztosító sejtenyésztő inkubátorban neveltük. Kísérleteinkhez csak korai (4-7.) passzázsszámú sejteket használtunk. A kondicionált médiumok gyűjtéséhez a sejteket 24 órás időtartamban a fentebb leírt, azonban FBS-t nem tartalmazó (szérummentes) médiumban tartottuk.

minta azonosító	páciens kora és neme	a tumor lokalizációja	pTNM besorolás	nyirokcsomó érintettség*	tumorsejtek differenciáltsága (grade)	tumor hisztopatológiai besorolása
173	71 év, férfi	nyelőcső alsó harmad	pT3N1Mx	1/18	közepesen-rosszul differenciált (Grade 2-3)	polypoid adenokarcinóma
195	86 év, nő	vakbél	pT3N2M0	4/7	rosszul differenciált (Grade 3)	intesztinális adenokarcinóma
456	71 év, férfi	szigmabél	pT4N2M1	4/14	közepesen differenciált (Grade 2)	mucinózus adenokarcinóma
465	83 év, nő	végbél	pT3N1M0	1/11	közepesen differenciált (Grade 2)	adenokarcinóma
548	65 év, nő	szigmabél-végbél átmenet	pT2N0M0	0/3	közepesen differenciált (Grade 2)	intesztinális adenokarcinóma
552	60 év, férfi	felszálló vastagbél	pT3N0M0	0/1	közepesen differenciált (Grade 2)	medulláris adenokarcinóma
604	87 év, nő	vakbél	pT3N0M0	0/15	közepesen differenciált (Grade 2)	mucinózus adenokarcinóma
608	69 év, nő	vakbél	pT3N2Mx	2/10	közepesen differenciált (Grade 2)	medulláris-kribriform adenokarcinóma

1. táblázat. A vizsgálatunkba bevont páciensek és tumormintáik hisztopatológiai adatai.

*A nyirokcsomó státuszt a tumor által érintett nyirokcsomó és az összes kipreparált, vizsgált nyirokcsomó arányában tüntettük fel.

5.4. Genomi DNS izolálás és variáns analízis

A tumor-asszociált és a kontroll miofibroblasztokban fellelhető és a daganatokhoz köthető genomi változások azonosítására 94 gén variáns, valamint 284 egy nukleotidra kiterjedő genetikai eltérés (SNP) meglétét vizsgáltuk újgenerációs szekvenálással (NGS). Az analízishez tumor-asszociált és kontroll miofibroblaszt sejtekből szilika oszlopon genomi DNS-t tisztítottunk (Macherey-Nagel NucleoSpin Tissue Kit), majd a koncentrációt Qubit 2.0 fluoriméter segítségével, dsDNS BR reagens (Thermo Fisher Scientific) hozzáadásával meghatároztuk. A szekvenáló könyvtár elkészítéséhez Illumina TruSight Rapid Capture kitet használtunk, minden genomi DNS mintából 50 ng-ot mértünk be a tagmentálási reakcióba. A fragmentált és indexekkel ellátott DNS minták méreteloszlását Agilent BioAnalyzer 2100 készülék segítségével, Agilent High Sensitivity DNA chip-en kapilláris gélelektroforézissel ellenőriztük, majd 80-mer hibridizációs próbák felhasználásával (TruSight Cancer Panel) feldúsítottuk a szekvenálni kívánt DNS szakaszokat. Az összekevert, indexált könyvtárakat denaturálást követően Illumina MiSeq Reagent Kit V2-300 szekvenáló reagenssel MiSeq platformon analizáltuk. A kapott szekvenciák annotációját az Illumina VariantStudio 2.1.46 szoftver segítségével végeztük el, kiegészítve az analízist a Variant Effect Predictor v2.8, a 1000 Genomes (April 2012 v3), a Cosmic (v65), a ClinVar (Sept 5 2013), a dbSNP (v137), a NHLBI Exome Variant Server (vESP6500SI-V2) és az USCS (hg19) adatbázisok használatával.

5.5. Immuncitokémia

A hiszton fehérjék poszttranszlációs módosításainak vizsgálatához a miofibroblaszt sejteken immunfestést végeztünk.

4 cellára osztott tárgylemez (4 well chamber slide) celláiba 2×10^4 miofibroblaszt sejtet osztottunk, majd 24 órás inkubációt követően azokat 4%-os paraformaldehid oldattal fixáltuk. A sejteket 0,3%-os Triton-X-100 oldatban permeabilizáltuk 20 percig, majd a nem-specifikus fehérjekötő helyeket 5% borjú szérum albumin oldattal blokkoltuk. A módosított hiszton fehérjék detektálásához a mintákat a 2. számú táblázatban listázott elsődleges antitestekkel inkubáltuk szobahőmérsékleten 120 percig, a feltüntetett hígításokat alkalmazva. Ezt követően

a mintákat fluoreszcensen jelölt másodlagos antitesttel (anti-nyúl Alexa-555 immunglobulin) inkubáltuk szobahőmérsékleten 60 percig, majd a sejtmagokat DAPI festéssel tettük láthatóvá. Fedő médium alkalmazását követően a tárgylemezekről fluoreszcens mikroszkóp (Olympus BX51) segítségével készítettük képeket, melyek analíziséhez ImageJ szoftvert használtunk. A sejtekhez rendelhető fluoreszcencia intenzitásokat a háttér fluoreszcencia intenzitásra normalizáltuk.

<i>Antitest neve</i>	<i>Gyártó, katalógusszám</i>	<i>Alkalmazott hígítás</i>
anti-acetilált hiszton 3 (H3ac)	Bio-Rad, AHP412	1:300
anti-hiszton 3 acetilált lizin 9 (H3K9ac)	Abcam, Ab4441	1:750
anti-hiszton 3 acetilált lizin 14 (H3K14ac)	Sigma-Aldrich, 06-911	1:450
anti hiszton 3 acetilált lizin 18 (H3K18ac)	Abcam, Ab1199	1:500
anti-hiszton 3 dimetilált lizin 9 (H3K9me2)	Upstate, 07-521	1:750
anti-hiszton 3 trimetilált lizin 9 (H3K9me3)	Abcam, Ab8898	1:500
anti-acetilált hiszton 4 (H4ac)	Sigma-Aldrich, 06-598	1:500
anti-hiszton 4 acetilált lizin 8 (H4K8ac)	Abcam, Ab1760	1:400
anti-hiszton 4 acetilált lizin 12 (H4K12ac)	Abcam, Ab1761	1:300
anti-hiszton 4 acetilált lizin 16 (H4K16ac)	Abcam, Ab1762	1:300

2. táblázat. Az immuncitokémia során használt elsődleges antitestek és az alkalmazott hígítások.

5.6. RNS izolálás

75 cm² tenyészfelületű sejtenyésző flakában növesztett miofibroblaszt sejtekből Trizol reagens (Invitrogen) segítségével totál RNS-t izoláltunk a gyártói protokollnak megfelelően. Az RNS mintákból az esetleges genomi DNS szennyeződéseket Dnáz I enzim hozzáadásával elimináltuk, majd NanoDrop segítségével megmértük az izolált RNS-ek koncentrációját.

5.7. TaqMan kis-denzitású génexpressziós array

190 egyedileg válogatott gén expressziójának szimultán meghatározásához kis denzitású, TaqMan próba detekción alapuló mikrofluidikai eszközt alkalmaztunk az UD-GenoMed Kft közreműködésével. Az array-be kerülő gének válogatása manuálisan, az Applied Biosystems TaqMan Gene Set-ek felhasználásával történt. Az izolált RNS minták minőségellenőrzéséhez Agilent RNA 6000 Nano Kit-et használtunk, majd 600 ng RNS-t használva cDNS-t szintetizáltunk High Capacity Reverse Transcription Kit segítségével. A kvantitatív polimeráz láncreakciók (qPCR) 384-well kiosztású mikrofluidikai kártyákon történtek ABI PRISM 7900HT qPCR készülékben (Applied biosystems) az alábbi beállításokkal: 50°C – 2 perc, 94,5°C – 10 perc, 40 ciklus: 97°C – 30 másodperc és 59,7°C – 1 perc. A kapott ciklusszám értékeket 5 belső kontroll gén expressziójára normalizáltuk (glicerinaldehid-3-foszfát-dehidrogenáz, β -2-mikroglobulin, β -aktin, 18S RNS, β -glükuronidáz), majd minden tumor-asszociált mintát a saját kontrolljához hasonlítottunk. Az array-ben vizsgált gének listája a függelékben található.

5.8. Reverz transzkripció-kapcsolt polimeráz láncreakció

A miofibroblaszt sejtekből izolált, DNázssal kezelt totál RNS-ből, mintánként 1 μ g-ot használva TaqMan Reverse Transcription Reagent (Applied Biosystems) kittel cDNS-t szintetizáltunk. A primerek működésének ellenőrzéséhez konvencionális PCR reakciókat mértünk össze, az amplikonok elkészítéséhez Veriti PCR készüléket (Thermo Fischer Scientific) használtunk. Ezt követően a reakciók során kapott termékeket 2%-os töménységű agaróz gélen méret szerint elválasztottuk, majd etídium-bromid és UV megvilágítás alkalmazásával tettük láthatóvá. A miofibroblaszt sejt kultúrák tisztaságának megítéléséhez ugyancsak konvencionális PCR-t alkalmaztunk az α -SMA, vimentin és α -citokeratin transzkriptekre specifikus primerek alkalmazásával (3. táblázat). A qPCR reakciókat 2x töménységű Maxima SYBR Green qPCR Master Mix felhasználásával, 8 μ l végtérfogatban, duplikátumban futtattuk le Thermo PikoReal 96 Real-Time qPCR készülékben (Thermo Fisher Scientific). A beállítások a következők voltak: 95°C – 5 perc, 40 ciklus: 95°C – 15 másodperc és 60 °C – 1 perc. A primerek szekvenciáit és a PCR során alkalmazott primer

végkoncentrációkat a 3. táblázat tartalmazza. A relatív mRNS mennyiségeket a $2^{-\Delta\Delta ct}$ formulával határoztuk meg (Livak & Schmittgen Method 2001).

Célgén	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Koncentráció
α -SMA	AGAACATGGCATCATCACCA	GCGTCCAGAGGCATAGAGAG	200 nM
vimentin	CGAAAACACCCTGCAATCTT	GTGAGGTCAGGCTTGGAAAC	200 nM
α -citokeratin	CAACCAGAGCCTTCTTCAGC	GCTCCCATTTTGTTCAGT	200 nM
18S RNS	AAACGGCTACCACATCCAAG	CGCTCCCAAGATCCAACCTAC	100 nM
GAPDH	GAGTCAACGGATTTGGTCGT	TGGAAGATGGTGATGGGATT	200 nM
MMP1	GATGTGGAGTGCCTGATGTG	CTGCTTGACCCTCAGAGACC	200 nM
MMP2	ATGACAGCTGCACCACTGAG	ATTTGTTGCCAGGAAAGTG	100 nM
MMP3	GGCAGTTTGCTCAGCCTATC	TCACCTCCAATCCAAGGAAC	200 nM
MMP10	CATACCCTGGGTTTTCCTCCAA	GTCCGCTGCAAAGAAGTATG TTTTC	200 nM
MMP12	GATGCACGCACCTCGATGT	GGCCCCCCTGGCATT	100 nM
decorin	GGACCGTTTCAACAGAGAGG	GAGTTGTGTCAGGGGGAAGA	200 nM
fibromodulin	CCTCCAAGGCAATAGGATCA	AGCCAAACCAAACCATCAAG	200 nM
nidogen 1	TATCCCCCTCCATCACTCAG	CTCTTGCCCTTCTGGTCTGG	200 nM
perlecan	GGCTCAGATTCAGGAGATGC	GATACTCCAGGGCCACACAC	200 nM
TGFBR3	CCCGAAAAGAGTATGGAGCA	GGGTTAGAGTTGGGGGTGAT	200 nM

3. táblázat. A PCR reakciók során használt primerek szekvenciái és a reakciókban alkalmazott primer végkoncentrációk.

5.9. Western blot analízis

A módosított hisztonok, illetve a mátrix metalloproteináz fehérjék mennyiségi vizsgálatához 75 cm²-es tenyészfelületű flaskában miofibroblaszt sejteket növesztettünk, majd mikor a kultúrák elérték a konfluens állapotot, a sejteket sejtkaparó segítségével összegyűjtöttük, centrifugálással (5000 rpm, 5 perc, 4°C) ülepítettük. A sejtlizátum elkészítéséhez 2x töménységű Laemmli mintafelvívő pufferben (60 mM Tris pH 6.8; 2% SDS,

10% glicerín, 5% merkaptóetanol) reszuszpendáltuk a sejteket, majd 100°C-on sejtfeltárást végeztünk. A minták fehérjetartalmát poliakrilamid gélelektroforézis (PAGE) segítségével méret szerint elválasztottuk és Coomassie-festés (0,05% Coomassie Brilliant Blue G-250; 10% jégecet; 25% metanol) segítségével meggyőződünk arról, hogy a mintákból egyenlő mennyiségű fehérjét mértünk a gélre. A mintákat a hiszton fehérjék analíziséhez 15%-os gélen, míg a mátrix metalloproteinázok vizsgálatához 10%-os gélen futtattuk meg, ezt követően a gélből a fehérjéket 0,45 µm pórusméretű nitrocellulóz membránra (Amersham) transzferáltuk és a membrán szabadon maradt fehérjekötő helyeit 5% zsírmentes tejpor-TBST (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20) oldattal blokkoltuk. A hiszton fehérjéket felismerő elsődleges antitestek és az alkalmazott hígítások megegyeztek azokkal, melyeket az immuncitokémiához használtunk a korábbi kísérletek során; míg az MMP fehérjéket felismerő elsődleges antitestek, valamint a torna-peroxidáz-konjugált másodlagos antitestek a 4. táblázatban kerültek listázásra. Az antitestekkel történő inkubálás 1% tejpor-TBST közegben történt. Végezetül a membránokat torna-peroxidáz szubsztráttal inkubáltuk (Immobilon Western Chemiluminescent HRP substrate, Millipore), a keletkező kemilumineszcens jelet röntgen filmre rögzítettük. A membránokat hiszton 3 és 4 (H3, H4), béta-aktin, illetve béta-tubulin antitestekkel inkubáltuk, hogy meggyőződjünk az egyenlő fehérjefelvételről. Az eredmények kvantifikálásához ImageJ, illetve Quantity One (BioRad, verziószám: 4.2.3.) programot használtunk.

Detektálandó fehérje	Elsődleges antitest	Másodlagos antitest
MMP3	Abcam; ab17790; hígítás: 1:1000	anti-egér; DAKO; P0260; hígítás: 1:2000
MMP10	Abcam; ab38930; hígítás: 1:1000	anti-nyúl; DAKO; P0448; hígítás: 1:2000
aktin	Sigma; A5060; hígítás: 1:5000	anti-nyúl; DAKO; P0448; hígítás: 1:10000
tubulin	Sigma; T9026; hígítás: 1:5000	anti-egér; DAKO; P0260; hígítás: 1:10000
H3	Abcam; ab1791; hígítás: 1:5000	anti-nyúl; DAKO; P0448; hígítás: 1:10000
H4	Abcam; ab31827; hígítás: 1:5000	anti-egér; DAKO; P0260; hígítás: 1:10000

4. táblázat. A western blot során alkalmazott elsődleges és másodlagos antitestek, valamint az alkalmazott hígítások.

5.10. Fehérjeminta készítés enzimaktivitás meghatározásához

Az intracelluláris zselatináz aktivitás meghatározásához miofibroblaszt sejteket nem-redukáló lízis pufferben (50 mM Tris pH 7.4; 0.2% Triton X-100) tártunk fel ciklusosan ismétlődő fagyasztással-olvasztással, majd a mintákat tovább homogenizáltuk 23G-s tű és fecskendő segítségével. A sejtörmelékot centrifugálással eltávolítottuk (13000 rpm, 10 perc, 4°C) és a felülúszók fehérjetartalmát Bradford reagens hozzáadásával meghatároztuk.

A szekretált (extracelluláris) zselatináz aktivitás analíziséhez miofibroblaszt sejtekről kondicionált médiumot gyűjtöttünk. 75 cm²-es tenyésztő flaskában nevelt konfluens sejtkultúrákat 3-szor mostunk PBS oldattal (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄), majd 15 ml szérummentes médiumot pipettáztunk a flaskákba, melyeket 24 órás inkubációt követően összegyűjtöttünk. A sejtek által szekretált fehérjét triklórecetsav (TCA) és Na-dezoxikolát hozzáadásával precipitáltuk (TCA: 360 mM; Na-Doc: 0,3 mM), centrifugálást (13000 rpm, 30 min, 4°C) követően a csapadékot hideg acetonnal mostuk, majd a fehérjét desztillált vízben reszuszpendáltuk.

5.11. Zselatin zimográfia

A zselatináz aktivitással rendelkező MMP2 (proforma: 72 kDa, aktív forma: 62 kDa) és MMP9 (proforma: 92 kDa, aktív forma: 86 kDa) aktivitását zimográfia segítségével vizsgáltuk. 10 µg sejtlizátumot, illetve 1 ml térfogatú kondicionált médiumból precipitált fehérjeelegyet összekevertünk nem-redukáló mintafelvívő pufferrel (60 mM Tris pH 8.0; 10% glicerin; 1% SDS, brómfenolkék) és a mintákat 2,5 mg/ml zselatinnal kopolimerizáltatott 10%-os poliakrilamid gélen megfuttattunk. Az elektroforézist követően az SDS-t a gélekből 2,5%-os Triton X-100 oldattal történő intenzív mosással (3 x 20 perc) távolítottuk el, majd a géleket a cink-proteáz aktivitáshoz szükséges előhívó pufferben (50 mM Tris pH 7.4; 150 mM NaCl; 10 mM CaCl₂; 0,05% Na-azid) 37°C-on, 20 óráig ringatva inkubáltuk. A gélben keletkezett, az enzimaktivitással arányos méretű feltisztulási sávokat Coomassie-festéssel tettük láthatóvá, a hátteret szintelenítő oldattal (30% etanol; 10% ecetsav) csökkentettük. Ezt követően a géleket

szárítottuk, szkenneltük, az aktív zselatinázokat méret alapján azonosítottuk és a feltisztulási sávokat ImageJ program segítségével kvantifikáltuk.

5.12. *In vitro* sejtmigráció vizsgálat

A tumor-asszociált és normál miofibroblaszt sejtek vándorlási képességének összehasonlításához 2×10^5 darab sejtet osztottunk ki 6-lyukú sejtenyésző lemezek egy-egy mintatartó mélyedésébe és a konfluens állapot eléréséig növesztettük a kultúrákat. Ezt követően egy P2 pipettatip segítségével kereszt alakban „felsértettük” a miofibroblaszt sejtréteget, így létrehozva a sejtmentes zónákat. A lemezekről PBS-sel történő mosást követően inverz fénymikroszkóp segítségével fényképeket készítettünk („0” órás felvételek), majd tápfolyadékban 24 óráig, 37°C-on inkubáltuk a sejteket. Az inkubáció letelte után újra lefényképeztük a lemezeket és megszámoltuk a sebzés után a sejtmentes zónába bevándorolt sejtek számát. A kísérleti adatok analízise során a tumorokból származó miofibroblasztok eredményeit (migrált sejtek száma) a saját normál mintapárok eredményeire normalizáltuk.

5.13. Statisztikai analízis

A kísérleti adatok elemzéséhez és az eredmények grafikus megjelenítéséhez GraphPad Prism 6.0 verziószámú szoftvert használtunk. Az egyes ábrák aláírásaiban feltüntettük az alkalmazott statisztikai próba nevét és a szignifikancia szinteket. Az ábrákon szórásként SE (standard error) van megjelenítve.

6. Eredmények

6.1. A létrehozott primer miofibroblaszt sejtenyészetek tisztaságának vizsgálata

A kísérleteinkhez használt miofibroblaszt sejtenyészetek izolálása nyelőcső-, illetve vastagbélrákban szenvedő páciensekből vett szövetszövetekből történt az SZTE ÁOK I. számú Belgyógyászati Klinikán Prof. Dr. Hegyi Péter munkacsoportja által. A tumoreltávolító műtét során a rezekátumból kooperációs partnereink mintákat vettek: egyet a daganatszövetből és egy másikat a tumortól néhány centiméter távolságra, az épnek tűnő szövetből is. A szövetdarabokból szelektív tenyésztéssel tiszta miofibroblaszt sejtenyészeteket állítottak elő. A mintagyűjtés ezen módjából adódóan minden tumor-asszociált miofibroblaszt sejtvonal viselkedését az ugyanabból a páciensből származó normál miofibroblasztokhoz tudtuk hasonlítani, kizárva így az egyének közti variációból adódó különbségeket.

A molekuláris biológiai vizsgálatainkhoz felhasznált primer miofibroblaszt sejtenyészetek átlagosan a 4-7. passzázból származtak, a tumor-asszociált és normál sejtpárok *in vitro* szignifikáns morfológiai különbséget nem mutattak (5. ábra).

5. ábra. A 173-as mintapár tumor-asszociált és normál primer miofibroblaszt tenyészeinek fáziskontraszt mikroszkópos képei.

A molekuláris vizsgálatokat megelőzően megvizsgáltuk a sejtkultúrák tisztaságát RT-PCR segítségével: meghatároztuk a jellegzetes miofibroblaszt markerek, az α -SMA és a vimentin, valamint az epitélre jellemző marker, az α -citokeratin expresszióját a miofibroblaszt mintából. Várározásainknak megfelelően a miofibroblaszt sejtkultúrákból detektálható volt mind az α -SMA (várt termékméret: 220 bp), mind a vimentin (várt termékméret: 201 bp) mRNS-ek jelenléte, míg az epiteliális sejtekre jellemző α -citokeratin meghatározása negatív eredményt adott. Az α -citokeratin primerek megfelelő működéséről olyan PCR reakcióban győződünk meg, ahol a templát epiteliális sejtvonalból (Hker E6SFM) származó cDNS volt. Az eredmények alapján megállapítottuk, hogy a humán gasztrointesztinális daganatokból izolált sejtenyészeteink tiszta, epiteliális daganatsejtek által nem szennyezett primer miofibroblaszt kultúrák voltak (6. ábra).

6. ábra. Az izolált miofibroblaszt sejtekben kimutatható az α -SMA és a vimentin expressziója. Miofibroblaszt sejtekből származó cDNS-t használva templátként PCR reakciókat mértünk össze α -SMA (S), vimentin (V) és citokeratin (C) mRNS-ekre specifikus primerpárokat alkalmazva. A PCR termékeket 2%-os agaróz gélen választottuk el, a DNS vizualizálása etídium-bromid és UV fény segítségével történt.

6.2. Tumorképződésben szerepet játszó genetikai variációk vizsgálata a daganatokban akkumulálódott miofibroblasztokban

A tumor-asszociált miofibroblasztokban esetlegesen fellelhető, a tumorgenezishez köthető genetikai polimorfizmusok azonosításához célzott újgenerációs szekvenálást végeztünk. 94 gén exonikus régióit, emellett 284 darab egy nukleotidot érintő polimorfikus hely (SNP) szekvenciáját határoztuk meg 1 nyelőcső eredetű és 3 vastagbél eredetű miofibroblaszt mintapárban Illumina Trusight Cancer Panel alkalmazásával. Az annotációhoz az Illumina VariantStudio softvert használtuk. Az analízis során azokra a variánsokra fókuszáltunk, melyek

funkcionális szempontból szignifikáns hatással bírnak a daganat progresszió során. Ennek megállapításához az aminosav csere/változás hatását prediktáló Sift (Sorting Intolerant From Tolerant) és PolyPhen (Polymorphism Phenotyping) analíziseket, valamint a ClinVar (Clinical Variants) és COSMIC (Catalogue Of Somatic Mutations In Cancers) adatbázisokat használtuk fel. Az egészséges szövetből izolált (normál) miofibroblaszt minták szekvenálása során a referencia genomhoz képest 8-13 db eltérést találtunk (5.A-D táblázat), melyek zöme a képződő fehérjékben aminosav cserét okoz (misszensz SNP). A legtöbb variáns heterozigóta formában volt jelen; a homozigótaként megjelenő variánsok (FANCI és MLH1 a 456-os minta esetén, illetve a CEP57, EGFR-AS és PTCH1 a 465-os minta esetén) gyakoriak a human populációban ($\geq 17\%$) a 1000 Genomes Project adatai alapján.

Gén	Variáns	kromoszóma pozíció	Variáns frekv (%) ¹	SNP ²	Aminosav csere	Sift ³	PP ⁴	COSM ID ⁵	CV ⁶
BRCA2	A>A/C	13:32906729	49.19	M	N/H	T	B	147663	NP
BRCA2	G>G/A	13:32950896	41.96	M	V/M	D	PrD		
FANCI	G>G/C	15:89836228	50.64	M	C/S	T	B	1179763	
FARP2	C>C/T	2:242371101	47.6	M	T/I	D	B		
MLH1	A>A/G	3:37053568	39.55	M	I/V	T	B	1131469	NP-PNP
PTCH1	G>G/A	9:98209594	44.15	M	P/L	D	PD		
SLX4	G>G/A	16:3639977	44.54	M	A/V	T	B	1377775	
SLX4	G>G/A	16:3640784	49.6	M	A/V	D	B		
SLX4	G>G/A	16:3656625	58.49	M	R/C	D	PrD		

5.A. A nyelőcső (173) mintapár kontrolljában azonosított szomatikus variánsok.

5.A-D táblázat. A kontroll miofibroblasztokban célzott újgenerációs szekvenálással azonosított szomatikus mutációk listája. A táblázatok a szomatikus variánsok közül azokat tartalmazzák, melyek várhatóan funkcionális következményekkel járnak az adott allélről képződő fehérjét tekintve és meghatározásuk során a leolvasások száma 20-nál nagyobb volt. ¹: Az azonosított variáns frekvenciája a tumor-asszociált miofibroblasztokban (%). ²: Az azonosított variáns típusa (M-misszensz, F-frameshift, NC-nem kódoló). ³: A polimorfizmus hatásának előrejelzése a képződő fehérje funkciójára a Sift program által (D: Deleterious; T: Tolerated). ⁴: A PolyPhen alkalmazás által a polimorfikus allérről képződő fehérjét érintő funkcióváltozás előrejelzése (B: Benign, PD: Possibly Damaging, PrD: Probably Damaging). ⁵: A variáns azonosítója a Cosmic adatbázisban. ⁶: A genetikai variánsok klinikai jelentősége a ClinVar adatbázis alapján (P: pathogenic; NP: non-pathogenic; NP-PNP: non-pathogenic: probable non-pathogenic).

Gén	Variáns	kromoszóma pozíció	Variáns frekv (%) ¹	SNP ²	Aminosav csere	Sift ³	PP ⁴	COSM ID ⁵	CV ⁶
ATM	C>C/G	11:108143456	48.84	M	P/R	D	PrD	21827	
ATM	G>G/A	11:108175462	50.91	M	D/N	T	B	41596	
BLM	C>C/T	15:91326099	53.23	M	P/L	D	B		
CEP57	A>A/G	11:95564259	51.06	M	R/G	T	B	1357997	
FANCI	G>C/C	15:89836228	99.77	M	C/S	T	B	1179763	
FARP2	C>C/T	2:242371101	44.94	M	T/I	D	B		
MLH1	A>G/G	3:37053568	100	M	I/V	T	B	1131469	NP-PNP
SMARCB1	G>G/C	22:24167570	50.51	M	Q/H	D	PrD		

5.B. A 456 számú mintapár kontrolljában azonosított szomatikus variánsok.

Gén	Variáns	kromoszóma pozíció	Variáns frekv (%) ¹	SNP ²	Aminosav csere	Sift ³	PP ⁴	COSM ID ⁵	CV ⁶
ALK	T>T/C	2:29416481	51.83	M	K/R	T	B	1130802	
ATM	G>G/A	11:108175462	50.82	M	D/N	T	B	41596	
BRCA1	T>T/C	17:41246481	48.73	M	Q/R	D	PrD		NP
BRCA2	A>A/C	13:32906729	54.39	M	N/H	T	B	147663	NP
CEP57	A>G/G	11:95564259	99.94	M	R/G	T	B	1357997	
EGFR-AS1	G>A/A	7:55249063	100	NC				1451600	
ERCC4	A>A/G	16:14042077	47	M	E/G	D	PD		
FANCI	G>G/C	15:89836228	55.68	M	C/S	T	B	1179763	
HNF1A	A>A/C	12:121416650	48.45	M	I/L	D	B	430522	P
MLH1	A>A/G	3:37053568	46.15	M	I/V	T	B	1131469	NP-PNP
PMS2	C>C/T	7:6045627	49.6	M	R/Q	T	PD		NP
PRF1	G>G/A	10:72360387	51.9	M	A/V	D	PrD		
PTCH1	G>A/A	9:98209594	99.42	M	P/L	D	PD		

5.C. A 465 számú mintapár kontrolljában azonosított szomatikus variánsok.

Gén	Variáns	kromoszóma pozíció	Variáns frekv (%) ¹	SNP ²	Aminosav csere	Sift ³	PP ⁴	COSM ID ⁵	CV ⁶
BRCA1	T>T/C	17:41246481	48.34	M	Q/R	D	PrD		NP
CEP57	A>A/G	11:95564259	50.61	M	R/G	T	B	1357997	
EGFR-AS1	G>G/A	7:55249063	48.61	NC				1451600	
FANCA	C>C/T	16:89836323	43.24	M	G/D	T	B	435949	
FANCI	G>G/C	15:89836228	48.21	M	C/S	T	B	1179763	
MC1R	C>C/T	16:89986117	34.29	M	R/C	D	PrD		P
MLH1	A>A/G	3:37053568	46.43	M	I/V	T	B	1131469	NP-PNP
MSH6	G>G/A	2:48010488	48.72	M	G/E	T	PD		NP-PNP
PTCH1	C>C/G	9:98215785	44.17	M	G/R	D	PrD		
SLX4	G>G/A	16:3639977	47.8	M	A/V	T	B	1377775	
SLX4	G>G/A	16:3640784	43.01	M	A/V	D	B		
SLX4	G>G/A	16:3656625	37.65	M	R/C	D	PrD		

5.D. Az 548 számú mintapár kontrolljában azonosított szomatikus variánsok.

A tumor-asszociált miofibroblasztokban újonnan kialakult variánsok azonosításához összevetettük az ugyanabból a páciensből származó tumor-asszociált és kontroll sejteket. A csak a tumor-asszociált mintákban azonosított variánsokat a 6. számú táblázat tartalmazza. A variánsok *de novo* létrejöttét megerősíti, hogy az 548-as azonosítójú miofibroblaszt minta PTCH1 variánsát kivéve a többi variánst a 1000 Genomes Project adatbázis nem tartalmazza. A detektált allélfrekvencia szinte minden esetben alacsonynak bizonyult (3-15%), kivéve az 548-as minta PTCH1 variánsát, ahol az allélfrekvencia értéke 44,17 %-nak adódott. A 173, a 456 és a 465 tumor-asszociált mintákban 2-3 szomatikus variánst azonosítottunk, míg az 548 esetén 8-at. Az azonosított variánoknak hozzávetőlegesen a fele tolerálható és/vagy benignus hatású a fehérjefunkciót prediktáló programok (Sift, PolyPhen) előrejelzése alapján.

Összességében elmondható, hogy a variánsok előfordulási gyakorisága alacsony, valamint a tumor-asszociált sejtek a kontroll mintákhoz képest közel azonos számú szomatikus variánst tartalmaznak. Azaz nem mutatható ki bennük szignifikáns genetikai eltérés a normál szövetből izolált miofibroblasztokhoz viszonyítva daganatok kialakulásához, fejlődéséhez köthető genomi régiókban. Ezen eredmények arra utalnak, hogy nem a hordozott mutációk száma emelkedett meg a tumor-asszociált miofibroblasztok esetén, így más okot kell keresnünk a fenotipikus és funkcionális különbségek hátterében.

minta	gén	variáns	kromoszóma pozíció	variáns frekv. ¹	SNP típus ²	aminosav csere	Sift ³	PP ⁴	CV ⁵
173	EZH2	C>C/A	7:148511066	6.67	M	Q/H	D	B	
	FLCN	T>T/TG	17:17119708	6.32	F				P
	TSC2	C>C/A	16:2120519	5.71	M	H/Q	D	PrD	
456	HNF1A	C>C/A	12:121434098	6.32	M	T/N	T	B	
	RHBDF2	C>C/A	17:74467749	13.79	M	C/F	D	PrD	
465	FANCD2	C>C/T	3:10106532	3.56	M	P/L	T	B	
	STK11	C>C/A	19:1221321	3.42	M	L/I	T	PD	
548	MSH2	C>C/A	2:47630539	14.81	M	A/E	T	B	
	MSH6	C>C/A	2:48027091	8.62	M	Q/K	T	B	
	NF1	G>G/G C	17:29663766	6.72	F				
	PHOX2B	C>C/A	4:41750506	9.3	M	G/V	D	B	
	PTCH1	C>C/G	9:98215785	44.17	M	G/R	D	PrD	
	SMARCB1	C>C/A	22:24175769	7.06	M	L/M	T	PrD	
	TP53	C>C/T	17:7579572	5.31	M	A/T	T	B	
	TSC2	C>C/A	16:2122358	10.53	N	C/*			

6. táblázat. A hordozott mutációk száma nem emelkedett jelentősen a tumor-asszociált miofibroblasztokban. A táblázat a tumor-asszociált miofibroblasztokban detektált szomatikus variánsok közül azokat tartalmazza, melyeknél a leolvasási mélység>20, valamint funkcionális következményekkel járnak az adott allélról képződő fehérjét tekintve. ¹: Az azonosított variáns frekvenciája a tumor-asszociált miofibroblasztokban (%). ²: Az azonosított variáns típusa (M-misszensz, F-Frameshift, ID-inszerció/delécio). ³: A polimorfizmus hatásának előrejelzése a képződő fehérje funkciójára a Sift program által (D: Deleterious; T: Tolerated). ⁴: A PolyPhen alkalmazás által a polimorfikus allélról képződő fehérjét érintő funkcióváltozás előrejelzése (B: Benign, PD: Possibly Damaging, PrD: Probably Damaging). ⁵: A genetikai variánsok klinikai jelentősége a ClinVar adatbázis alapján (P: pathogenic).

6.3. A tumor-asszociált miofibroblasztokban azonosított epigenetikai változások

Általánosan elfogadott, hogy az epigenetikai - a DNS nukleotid sorrendjét nem érintő - változások jelentősen befolyásolhatják a génkifejeződést. A szekvenálás eredményei alapján felmerül a kérdés, hogy ha nem emelkedett meg a mutációk száma, akkor vajon állhatnak-e epigenetikai hatások a tumor-asszociált miofibroblasztok jellegzetes morfológiájának, és potenciálisan megváltozott működésének hátterében. Ennek feltárásához megvizsgáltuk az örökítőanyagunk csomagolódását biztosító hiszton fehérjék egyes poszttranszlációs módosításainak mértékét. Kísérleteinkben a hiszton 3 (H3) és hiszton 4 (H4) fehérjék N-terminális régiójának acetiláltságát és metiláltságát tanulmányoztuk immuncitokémiával, valamint western blot módszerrel. Az acetilációt tekintve mértük a hiszton 3 fehérje összacetiláltságát, valamint specifikusan a H3 N-terminális 9., 14. és 18. lizin aminosavának acetiláltságát, míg a hiszton 4 fehérje esetén meghatároztuk ugyancsak az össz-acetiláltság mértékét és emellett specifikusan a H4 N-terminális 5., 8., 12. és 16. lizin aminosavának acetiláltságát. Ugyanakkor a hiszton metilációt is vizsgáltunk: meghatároztuk a H3 9. lizinjén (H3K9) történő di-, illetve trimetiláció mértékét. Az immuncitokémiai festések alapján a H3 hiszton acetiláció szintjében nem találtunk különbséget a mintapárok között sem összacetiláltságot, sem az egyes lizin oldalláncok acetiláltságát illetően. A H4 hiszton acetiláció és a H3K9 metiláció mértékében azonban eltérés mutatkozott: eredményeink azt tükrözik, hogy a tumor-asszociált miofibroblasztokban a H4K16 acetiláció, valamint a H3K9 trimetiláció szintje csökkenést mutat a kontroll sejtpárokhoz viszonyítva (7. ábra). Az immuncitokémiai vizsgálatok eredményeinek megerősítéséhez western blot analízissel is megvizsgáltuk a hiszton poszttranszlációs módosítások mértékét az immunfestés során alkalmazott antitestek felhasználásával. A western blot kísérletek eredményei megerősítették az immunfestés során látottakat: csökkent intenzitású band-ek azonosíthatók az acetilált H4K16 és a trimetilált H3K9 esetén a tumorokból származó miofibroblasztokból származó sejtkivonatokban (8. ábra).

7. ábra. Tumor-asszociált miofibroblasztokban megfigyelhető epigenetikai változások. Panel A: reprezentatív mikroszkópos felvételek a 173-as minta immunfestett normál (N) és tumor-asszociált (T) miofibroblasztjairól (D- sejtmagok jelölése DAPI festékkel (kék); H: módosított hiszton fehérjék immunfestése (piros); M- a DAPI-val jelölt és az immunfestett felvételek egyesítésével készült képek). Panel B: a 173-as mintapár mikroszkópos képeinek ImageJ szoftverrel történő kvantitálási eredménye (t-próba; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$; $n=3$). Az immunfestések csökkent mértékű H3K9 trimetilációt és H4K16 acetilációt jeleznek a 173-as mintapár tumorokból származó mintáiban.

8. ábra. Western blot módszerrel is csökkent H3K9 trimetiláció és H4K16 acetiláció detektálható a tumor-asszociált miofibroblasztokban. Panel A: a H3K9me3 és H4K16ac western blot kísérletekből származó reprezentatív képek az alkalmazott belső kontrollokkal (H3 és H4 hiszton fehérjék), panel B: Quantity One szoftverrel végzett kvantitálás eredményének oszlopdiagram formában történő ábrázolása (t-próba; * $p < 0,05$; $n = 3$). A módosított hiszton fehérjéket felismerő antitestekkel végzett western blot kísérletek eredménye megerősíti az immuncitokémiával azonosított csökkent mértékű H3K9 trimetilációt és H4K16 acetilációt a tumor-asszociált miofibroblasztokban. A kísérletbe bevont minták: 173, 195, 456, 465, 548.

6.4. A tumor-asszociált miofibroblasztok részleges transzkriptomikai analízise

A genetikai és epigenetikai kísérleteket követően arra a kérdésre kerestünk választ, hogy a tumor-asszociált és normál miofibroblasztok génexpressziós aktivitásában találhatók-e olyan különbségek, melyek hozzájárulhatnak a sejtek tumor-támogató fenotípusának kialakulásához, fenntartásához. A kérdés megválaszolásához 4 mintapárt (173, 195, 456 és 465) használva meghatároztuk 190 általunk választott, a tumorigenezis szempontjából jelentős gén expresszióját hasonlítottuk össze a miofibroblaszt párok esetén. A TaqMan kártyára kerülő 190 gént manuálisan válogattuk össze, az Applied Biosystems alábbi gén szettjeinek felhasználásával: invázióhoz-metasztázishoz köthető gének, hipoxia-angiogenezishez köthető

gének, sejtproliferációban részt vevő gének, oxidatív stresszhez és apoptózishoz köthető gének, TGF- β szignalizációs útvonalban szerepet játszó gének, WNT szignalizációs útvonalban részt vevő gének. Eredményeink alapján a vizsgált 190 gén körülbelül 20%-a mutatott expressziós különbséget a normál és a tumor-asszociált miofibroblasztok összehasonlításában (7. és 8. táblázat). A megváltozott expressziót mutató gének által kódolt fehérjék főként az invázió-metasztázis folyamatában, az extracelluláris mátrix felépítésében és átalakításában, a sejtciklus szabályozásában, illetve a TGF- β és WNT szignálútban játszanak szerepet. A kimutatott génexpressziós változások összhangban vannak a tumor-asszociált miofibroblasztok tumor-támogató fenotípusával.

A kísérleti adatok azt mutatják, hogy az ECM felépítésében részt vevő proteoglikánok és glikoproteinek közé tartozó nidogén-1-et, perlecanin, fibronectint, fibromodulint és decorint kódoló génekről alacsonyabb expresszió detektálható a tumor-asszociált sejtekben a kontroll sejtekhez viszonyítva, míg a sejtfelszíni és ECM proteoglikánok módosításának egyik fontos enzime, az N-acetil-glükózamin transzferáz V (MGAT5) emelkedett expressziót mutat. A proteoglikánoktól eltérően, a vizsgált kollagén gének (kollagén I $\alpha 1$, IV $\alpha 1$ és a XV $\alpha 1$) expressziója nem különbözött a tumorból és a normál szövetből izolált miofibroblasztok esetén.

Az ECM átalakításban részt vevő fehérjéket kódoló gének esetén is tapasztaltunk megváltozott expressziót a tumor-asszociált miofibroblasztokban: az MMP1 esetén emelkedett, míg az MMP14 és az MMP inhibitor TIMP4 esetén csökkent expressziót detektáltunk. Ehhez kapcsolódóan az MMP génekről történő transzkripció szabályozásában részt vevő egyik transzkripciós faktor, az ETV4 génjéről is megváltozott, magasabb expressziót tapasztaltunk. Az MMP9 és MMP13 mRNS-ek mennyiségét is szándékoztunk mérni a mintapárokban, azonban egyik gén esetén sem tudtunk messenger RNS-t detektálni. Ez alapján az MMP9 és MMP13 génekről nem történik mérhető expresszió az általunk vizsgált gasztrointesztinális miofibroblaszt sejtekben.

A tumorból izolált miofibroblasztokban szignifikáns génexpresszió változást mutató gének között azonosítottunk olyanokat is, melyek az invázió-metasztázis folyamatában játszanak fontos szerepet. A citoszkeletális hálózat működésének szabályozásában és ezáltal a motilitásban fontos endotelin-1 és TIAM1 expressziója megemelkedett a tumor sztróma miofibroblasztjaiban, míg a metasztázis szupresszor 1 kifejeződése csökkent mértékűnek bizonyult.

Csökkent expressziót mutató gének	Relatív expresszió (log2)
1, Apoptózis reguláció	
B-sejt limfóma 2 (BCL2)	-2,20
2, Extracelluláris mátrix felépítés	
Decorin (DCN)	-1,85
Fibromodulin (FMOD)	-2,09
Fibronectin 1 (FN1)	-1,61
Heparán-szulfát proteoglikán 2 (HSPG2; perlecan)	-1,03
Nidogen 1 (NID1)	-1,74
3, Metasztázis	
Kemokin (C-X-C motívum) ligand 12 (CXCL12)	-3,25
Mátrix metalloproteináz 14 (MMP14)	-1,30
Metasztázis szuppresszor 1 (MTSS1)	-2,12
S100 kalcium kötő fehérje A4 (S100A4)	-1,11
TIMP metalloproteináz inhibitor 4 (TIMP4)	-1,99
Tumor nekrosis faktor szupercsalád ligand 10 (TNFSF10)	-1,59
4, TGFβ szignalizációs út	
C. elegans SMA és Drosophila MAD homológ 1 (SMAD1)	-1,74
C. elegans SMA és Drosophila MAD homológ 6 (SMAD 6)	-1,65
Transzformáló növekedési faktor β receptor III (TGFB3)	-1,90
5, Sejtosztódás reguláció	
Mitogen-aktivált protein kináz kináz 5 (MAP2K5)	-1,28
Mitogen-aktivált protein kináz kináz kináz 8 (MAP3K8)	-1,87
6, Pleiotróp hatás	
Adrenomedullin (ADM)	-1,87
Ektonukleotid pirofoszfátáz/foszfodiészteráz 2 (ENPP2)	-2,55
Granulin (GRN)	-1,12
Neuropilin 1 (NRP1)	-1,27
Neuropilin 2 (NRP2)	-1,55
Vérlemezké eredetű növekedési faktor receptor α (PDGFRA)	-1,67
Pleiotrofin (PTN)	-1,55
Protein tirozin kináz 2 β (PTK2B)	-1,12
Szuperoxid dizmutáz 3 (SOD3)	-1,32

7. táblázat. A tumor-asszociált miofibroblasztokban csökkent expressziót mutató gének listája.

A tumorból valamint a normál szövetből származó miofibroblaszt mintapárokból izolált RNS-ek mennyiségi összehasonlítása TaqMan kis denzitású génexpressziós array-t használva történt. A tumor-asszociált miofibroblasztokban mért relatív expressziós értékeket a kontrollokra történt normalizálást követően adtuk meg. A QPCR reakciók futtatása az egyes mintapárok esetén duplikátumban történt. A kísérletbe bevont mintapárok: 173, 195, 456 és 465.

A TGF- β kiemelten fontos szerepet játszik a (mio)fibroblasztok aktivációjában (Desmoulière J Cell Biol 1993), így várakozásainknak megfelelően számos, a szignálútban szerepet játszó fehérje génje esetén tapasztaltunk megváltozott expressziót a tumor-asszociált mintákban. A TGF- β 2 és a SMAD-specifikus E3 ubikvitin protein ligáz (SMURF2) emelkedett expressziót mutatott a tumorból izolált miofibroblasztokban, míg a SMAD1, a SMAD6 és a TGF- β receptor III (TGFB3) esetén csökkent expressziót detektáltunk. A TGF- β szignálút mellett a WNT jelátviteli útvonal is érintett a megváltozott génexpresszió tekintetében, a tumor-asszociált miofibroblasztokban magasabb szinten expresszálódik a WNT5A és a WNT-indukálta szignalizációs fehérje 1 (WISP1) génje is.

Emelkedett expressziót mutató gének	Relatív expresszió (log2)
1, Metasztázis	
Endotelin 1 (EDN1)	1,88
Ets variáns gén 4 (ETV4)	2,04
N-acetilglükózamin transzferáz V (MGAT5)	1,26
Mátrix metalloproteináz 1 (MMP1, kollagenáz)	2,31
T-sejt limfóma invázió és metastázis induktor fehérje 1 (TIAM1)	4,35
2 Sejtosztódás reguláció	
Ciklin D1 (CCND1)	1,99
3, TGFB szignalizációs útvonal	
SMAD specifikus E3 ubikvitin protein ligáz 2 (SMURF2)	1,31
Transzformáló növekedési faktor béta 2 (TGFB2)	1,97
4, Wnt szignalizációs útvonal	
Drosophila wingless 5 homológ (WNT5A)	1,59
WNT1 indukálta szignalizációs útvonal fehérje 1 (WISP1)	1,97

8. táblázat. A tumor-asszociált miofibroblasztokban megnövekedett expressziót mutató gének listája. A tumorból valamint a normál szövetből származó miofibroblaszt mintapárokból izolált RNS-ek mennyiségi összehasonlítása TaqMan kis denzitású génexpressziós array-t használva történt. A tumor-asszociált miofibroblasztokban mért relatív expressziós értékeket a kontrollokra történt normalizálást követően adtuk meg. A QPCR reakciók futtatása az egyes mintapárok esetén duplikátumban történt. A kísérletbe bevont mintapárok: 173, 195, 456 és 465.

A sejtproliferáció és apoptózis tekintetében is találtunk néhány olyan gént, melyek esetén expressziós különbség mutatható ki a tumor-asszociált és a kontroll sejtek között. A sejtproliferációt pozitívan befolyásoló ciklin D1 (CCND1) magasabb szinten fejeződik ki a tumorból származó miofibroblasztokban, ez magyarázatul szolgálhat arra a megfigyelésre, hogy a daganatokban jelentősen megnő a miofibroblasztok száma a normál szövetekhez képest. Emellett alacsonyabb mértékű génexpressziót mutatott a BCL2, a MAP2K5, a MAP3K8.

Az eddigiekben említett eredmények mellett néhány olyan génről is megváltozott expressziót detektáltunk a tumor-asszociált miofibroblasztokban, mely gének fehérjetermékeit nem könnyű egy adott sejtbiológiai folyamathoz kapcsolni. Ezen fehérjék főként extracellulárisan lokalizálódnak (ADM, ENPP2, GRN, PTN, SOD2) vagy transzmembrán proteinként funkcionálnak (NRP1-2, PDGFRA) és pleiotróp hatással rendelkeznek: az eddig megjelent tudományos közlemények alapján befolyásolják többek között a sejtek proliferációját, a sejtmotilitást-inváziót, a neoangiogenikus folyamatokat és a kemotaxist is.

6.5. ECM alkotók és mátrix metalloproteinázok expressziójának vizsgálata

A TaqMan array kísérletek során az mRNS szinten kimutatott szignifikáns különbségek jelentős része az ECM-et felépítő fehérjék, illetve az ECM átalakításában részt vevő enzimek génjeit érintette. Ez felhívta a figyelmünket a tumor-asszociált miofibroblasztok metasztázist támogató aktivitásának vizsgálatára. Első lépésben arról kívántunk meggyőződni, hogy általános tendencia-e a TaqMan array-ben látott ECM proteoglikánok és adhéziós glikoproteinek alacsonyabb kifejeződése a tumorokban dúsuló miofibroblasztok esetén. A kérdés megválaszolásához újabb mintapárokat vontunk be kísérleteinkbe és a belőlük származó cDNS-eken QPCR kísérleteket végeztünk decorin, fibromodulin, nidogen 1, perlecan és TGFBR3 mRNS-re specifikus primerekkel. Az eredmények alapján elmondható, hogy a tumor-asszociált miofibroblasztokban szignifikánsan alacsonyabb mértékben fejeződnek ki ezek a gének (9. ábra). Összességében tehát a TaqMan array, valamint a QPCR eredmények arra utalnak, hogy a TME-ben felhalmozódó miofibroblasztok aktívan módosítják a tumor mátrixot egyes proteoglikánok és glikoproteinek csökkent expressziójával.

9. ábra. A tumor-asszociált miofibroblasztokban csökkent mértékű expresszió detektálható számos ECM fehérje génjéről. A miofibroblasztokból izolált RNS-ről reverz transzkripcióval cDNS-t írtunk át, majd az 5 primerpárral QPCR reakciókat futtattunk le duplikátumban, Sybr Green alapú detekciót alkalmazva (kétutas ANOVA; * $p > 0,05$; ** $p > 0,01$; *** $p > 0,001$; $n=3$). A tumor-asszociált minták eredményeit a kontroll mintákra normalizáltuk, az ábrán a kontroll mintákban mérhető expressziót a zöld vonal jelzi.

A TaqMan array-ben detektált megváltozott génexpresszió olyan fehérjék génjeit is érintette, melyek az extracelluláris mátrix átalakításában, degradációjában töltenek be kiemelten fontos szerepet (MMP1, MMP14, TIMP4 és MGAT5 gének). Annak érdekében, hogy pontosabb képet kapjunk a tumorokból származó miofibroblasztok ECM bontó képességéről, megvizsgáltuk néhány mátrix metalloproteinázt kódoló gén expressziós szintjét is. Választásunk a kollagéneket, proteoglikánokat és glikoproteineket is hasítani képes MMP-k közül az alábbiakra esett: MMP2, 3, 10 és 12. Emellett a TaqMan array-ben vizsgált MMP1 expresszió mérését ugyancsak elvégeztük, mivel az array-ben csak 4 mintapár analízisére volt lehetőségünk. A QPCR reakciók végén kapott Ct értékek analízise során a belső kontrollra történő normalizálást követően minden tumor-asszociált mintát a saját normál párjával vetettünk össze. Az elvégzett kvantitatív PCR reakciók eredményei alapján megállapítottuk, hogy nagyon változatos az általunk vizsgált MMP gének expressziós profilja a 8 mintapárt tekintve, így az expressziós változásokat mintapáronként ábrázoltuk (10. ábra).

10. ábra. Az MMP gének kifejeződése erős egyedi varianciát mutat a vizsgált tumor-asszociált miofibroblaszt mintákban. A miofibroblaszt sejtekből izolált RNS-t reverz transzkripció során cDNS-sé írtunk át, majd ezeket templátkét használva QPCR reakciókat futtattunk Sybr Green detekciót alkalmazva (kétutas ANOVA; * $p > 0,05$; ** $p > 0,01$; *** $p > 0,001$; **** $p > 0,0001$; $n = 3-4$).

A tumor-asszociált minták eredményeit a kontroll mintákra normalizáltuk, az ábrán a kontroll mintákban mérhető expressziót a zöld vonal jelzi.

A diagramokat tanulmányozva általánosságban elmondhatjuk, hogy minden mintapár esetén találtunk olyan MMP-t, melynek expressziója megemelkedik a tumor-asszociált miofibroblaszt sejtekben. Az 552-es és 465-ös mintákban csak egy-egy emelkedett MMP expresszió detektálható: az előbbiben csak az MMP10 transzkriptek mennyisége volt emelkedett, míg az utóbbiban az MMP2 transzkript mennyiség nőtt meg a tumorból izolált miofibroblasztokban. A többi 6 mintapár esetén több MMP expressziója is pozitív irányba változott a tumor sztróma miofibroblasztjaiban, ez a változás nem egyszer igen markáns mértékűnek adódott (pl. 195-ös minta MMP1 expressziója több mint 30-szorosra nőtt a tumor-asszociált sejtekben).

Az MMP-ket érintő génexpressziós változásokat látva kíváncsiak voltunk, hogy fehérjeszinten is kimutatható-e a különbség a tumorból és a normál szövetből származó miofibroblaszt sejtek között. A génexpressziós vizsgálatokba bevont mintapárokból az MMP3, 10 és 12 transzkriptek mennyisége nőtt meg a legtöbb esetben. Ezen három MMP-t illetően az irodalmi hivatkozások leginkább az MMP3 és 10 szerepét igazolják az invázió-metasztázis kaszkád aktiválódása során, míg a főként elasztint bontó MMP12-t a krónikus obstruktív tüdőbetegséggel (COPD), valamint az angiogenezis szabályozásával hozzák kapcsolatba. Így választásunk az MMP3 és 10 fehérjeszintű vizsgálatára esett. A western blot módszerrel történt fehérjeszint meghatározások eredményei megerősítik a génexpressziós kísérletekben nyert adatokat: a tumor-asszociált miofibroblasztokban nagyobb mennyiségű MMP3 és 10 fehérje mutatható ki, ez igaz mind az enzimek proformáját (magasabb molekulatömegű felső band), mind a hasított, aktív formáját (alsó band) illetően (11. ábra).

Habár az MMP2 expresszió mértékében csak egy mintapár esetén tapasztaltunk szignifikáns különbséget a tumor-asszociált és normál sejtek között, a mintákból mérhető nagy mennyiségű MMP2 mRNS, valamint az ismert irodalmi adat - miszerint a daganatok invazív frontjában gyakran megfigyelhető az MMP2 feldúsulása-, arra sarkallt minket, hogy fehérjeszinten is érdemes foglalkoznunk az MMP2-vel. Ezért összehasonlítottuk az MMP2 enzimaktivitást a tumor-asszociált és a normál sejtek lizátumában. Mivel az MMP-k fiziológiásan is szekretálódnak a sejtekből az extracelluláris térbe, kísérleteinkben 24 órás szérumentes médiumot is gyűjtöttünk a sejtekről, majd a tápfolyadékból TCA-val kicsapott fehérjeelegyet is analizáltuk.

11. ábra. Az MMP3 és MMP10 enzimfehérjék nagyobb mennyiségben vannak jelen a tumorokból származó miofibroblaszt sejtekben. A miofibroblaszt sejteken MMP3 és 10 fehérjét felismerő antitestekkel western blot kísérletet végeztünk, melynek eredménye alapján nagyobb mennyiségű MMP3 és 10 proforma (felső band) és aktív forma (alsó band) található a tumor-asszociált miofibroblasztokban. Panel A: az MMP3 és MMP10 western blot kísérletekből származó reprezentatív képek az alkalmazott belső kontrollokkal (aktin, tubulin), panel B: a Quantity One szoftverrel végzett kvantitálás eredményének oszlopdiagram formában történő ábrázolása (t-próba; * $p < 0,05$; $n = 3$). A kísérletben analizált minták: 173, 195, 456, 465, 548.

A zselatinázok közé tartozó MMP2 enzimaktivitása könnyen detektálható zimográfia segítségével. Ennek során a zselatinnal kopolimerizáltatott poliakrilamid gélben az elektroforézist követően az MMP2 enzimek a molekulaméretüknek megfelelő magasságban (proforma: 72 kDa/aktív forma: 62 kDa) elemésztik a zselatint. Így Coomassie festés, majd háttér szintelenítés után áttetsző sávként jelenik meg az adott minta MMP2 aktivitása, amely szkennelést követően ImageJ program segítségével könnyen kvantitálható. Az elvégzett zimográfia alapján megállapítottuk, hogy mind a tumor-asszociált, mind a normál sejtek lizátumában jelentős MMP2 aktivitás detektálható mind a proformának, mind az aktív formának megfelelő molekulaméretnél. Az egyes mintapárokat összehasonlítva viszont azt tapasztaltuk, hogy a tumorszövet miofibroblasztjaiban és az ép szövetből származó párjaikban kimutatható MMP2 aktivitás nem különbözik szignifikánsan egymástól (12.A ábra).

12. ábra. Az MMP2 enzimaktivitás nem különbözik szignifikánsan a tumor-asszociált és normál miofibroblasztok esetén. A tumorokból és a normál szövetekből származó miofibroblasztok sejtlizátumát, valamint a sejtek szekrétumát zselatin zimográfiával vizsgáltuk. Az emésztést követően Coomassie festékkel megfestett, majd színtelenített géleken világos (feltisztulási) sávként jelenik meg a zselatináz MMP2 aktivitása, melyet ImageJ program segítségével kvantitáltunk. A: reprezentatív zimogramok és a számszerűsített eredmények oszlopdiagram formájában történő megjelenítése. B: a 173 és 456 minták tumor-asszociált miofibroblasztjainak szekrétumában jelentős MMP2 aktivitás detektálható normál párjaikhoz viszonyítva. (A kísérletben analízisre került minták: 173, 195, 456, 465, 548; n=3).

A sejtekről gyűjtött szérumentes tápfolyadékból kicsapott fehérjeelegy vizsgálata hasonló eredményt adott, a mintapárok eredményeit átlagolva nem különbözik egymástól a tumor-asszociált és a normál miofibroblasztok alkotta csoport.

Viszont ha az egyes mintapárokat külön-külön hasonlítjuk össze, akkor azonosítható különbség a szekretált MMP2 aktivitásban: a 173-as és 456-os mintapárok daganatból izolált miofibroblasztjainak kondicionált médiumában nagyobb MMP2 aktivitás detektálható, mint a kontroll párjaikról gyűjtött kondicionált médiumok esetén (12.B ábra).

A zimogramok analízise során a szintén zselatináz aktivitású MMP9 molekulaméretének megfelelő magasságban (proforma: 90 kDa/aktív forma: 86 kDa) nem láttunk emésztési sávokat egyik sejtlizátum vagy kondicionált médium esetén sem; ez alátámasztja a TaqMan array eredményeket, miszerint az MMP9 kifejeződése nem detektálható az általunk vizsgált miofibroblaszt mintákban.

6.6. Az *in vitro* sejtmigrációs vizsgálatok eredményei

A mátrix metalloproteinázok és az ECM komponensek génexpressziós vizsgálata alapján arra következtethetünk, hogy a tumor-asszociált miofibroblasztok jelentősen támogatják a tumorsejtek invazivitását és aktív részesei a metasztázisok kialakulásának. Ezen feltételezés megerősítéséhez *in vitro* migrációs tesztet (scratch/wound healing assay) végeztünk a miofibroblaszt sejt kultúrák felhasználásával. A konfluens tenyészeteken sebzést ejtettünk és fényképfelvétellel dokumentáltuk a sejtmentes zóna nagyságát, majd 24 óra elteltével újabb fényképet készítettünk a sebzési zónáról (13.A ábra). Összehasonlítva a sebzést követően közvetlenül, illetve a 24 óra elteltével készült felvételeket, képet kaphattunk a normál szövetből és a tumorból izolált miofibroblasztok migrációs kapacitásáról. A kapott számadatokat a 13.B ábrán vizualizáltuk, ahol minden narancssárga háromszög egy-egy tumor-asszociált miofibroblaszt minta normál párjára normalizált migrációjának mértékét jeleníti meg. A migrációs tesztet 7 mintapár esetén tudtuk elvégezni, a 195-ös mintapár 8. passzázsban lévő jttei nem voltak alkalmasak a kísérlet elvégzéséhez.

13. ábra. A tumor-asszociált miofibroblasztok eltérő migrációs kapacitással rendelkeznek, mint kontroll mintapárjaik. *In vitro* sebzési kísérletben (wound healing assay) 24 órás időablakban vizsgáltuk a miofibroblasztok sebzési zónába történő bevándorlását. Panel A: reprezentatív képek a sebzési kísérlet kezdeti időpontjából („0 óra”) és 24 óra elteltét követően. Panel B: a bal oldali diagramon páronként ábrázoltuk a migrációs kapacitás változását, míg a jobb oldali diagramon a migrációs aktivitás átlagait tüntettük fel. Egy mintapár kivételével a tumorokból származó miofibroblasztok megnövekedett migrációs képességgel bírtak (t-próba; * $p > 0,05$; $n = 3$). A kísérletbe bevont mintapárok: 173, 456, 465, 548, 552, 604, 608.

Eredményeink alapján kijelenthető, hogy a tumor-asszociált miofibroblasztok a vizsgált mintapárok közül 6 esetében emelkedettebb migrációs kapacitással rendelkeznek a kontroll mintapárjaikhoz képest, az átlagos migrációs kapacitás a tumor sztróma miofibroblasztokban 1,56-szorosra nőtt. Ugyanakkor egy mintapár (608-as minta) esetén alacsonyabb motilitási képességet tapasztaltunk a tumor-asszociált mintában. Összességében elmondható, hogy megfigyeléseink alátámasztják a tumorokban található miofibroblasztok funkcionális megváltozását és indikálják a miofibroblasztok támogató, aktív részvételét az invázió-metasztázis folyamatában.

7. Megbeszélés

Az utóbbi évek tudományos eredményei kétséget kizáróan alátámasztják a daganat sztróma és az abban feldúsuló fibroblasztok, miofibroblasztok megkerülhetetlen szerepét a tumorprogresszió folyamatában (Liu *Front Cell Dev Biol* 2019; Liao *Cell Immunol* 2019). A neoplasztikus sejtekkel megvalósuló intenzív, kétirányú kommunikáció lehetőséget nyújt mind a sztrómális sejtek tumor-támogató fenotípusának kialakulására, mind pedig a rákos sejtek fokozottabb osztódására és invazívvá válására (Sperb *Int J Mol Sci* 2020). A daganatok környezetében található tumor-asszociált fibroblasztok kiemelten fontos szerepet játszanak a daganatos mikrokörnyezet formálásában, de mivel ez egy heterogén sejtpopuláció, az egyes fibroblaszt alcsoportok kissé eltérő funkcióval bírhatnak (Sahai *Nat Rev Cancer* 2020; Shiga *Cancers (Basel)* 2015). A legtöbbjük aktív részese a mikrokörnyezet kialakításának, számos ECM fehérje, növekedési faktor, citokin molekula, proteáz enzim szintézise és szekréciója révén (Kalluri *Nat Rev Cancer* 2016). A daganat sztróma CAF sejtjei között legnagyobb számban miofibroblasztokat találhatunk, a bennük azonosítható fenotipikus változásokról már vannak is adatok, azonban az esetleges genetikai, epigenetikai és transzkriptomikai eltérésekről ezidáig kevés információ gyűlt össze. Ezért emésztőrendszeri daganatban szenvedő páciensek bevonásával összehasonlító vizsgálatokat végeztünk, melynek során a betegek daganatos szövetéből, valamint a daganattól néhány centiméter távolságban az egészséges szövetből vett mintákat hasonlítottuk össze. Kísérleteinkhez a szövetcsonkokból származó sejtekből indított tiszta miofibroblaszt tenyészeteket használtuk. A témakörben közölt korábbi publikációk jelentős része komplex daganatos szövetminták vizsgálatával készült, ahol a sok különféle sejttípus együttes jelenléte számos esetben megnehezítette az eredmények interpretációját. Az általunk használt kísérleti elrendezésben viszont a rákos sejtek és a tumoros sztróma többi sejttípusától elkülönítve tudtuk vizsgálni a tumor-asszociált miofibroblasztok jellemvonásait. Ráadásul mivel minden, a vizsgálatba bevont páciens esetén mind a tumorból, mind a normál szövetből is történt mintavétel és miofibroblaszt izolálás, így az egyének közti különbségeket is megfelelőképp értelmezhattük az összehasonlító vizsgálatok során.

A tumor-asszociált és a normál szövetből származó miofibroblasztok esetleges genetikai különbségeinek feltérképezéséhez célzott újgenerációs szekvenálást végeztünk. Olyan géneket és egyedi nukleotidokat érintő szekvencia különbségeket (SNP) vizsgáltunk, melyek irodalmi adatok alapján összefüggésbe hozhatók a daganatos elváltozások

kialakulásával, progressziójával (tumorgenezis drivererek). Mintánként közel 255 kilobázispár szekvenciárészlet vizsgálata történt meg, melynek analízise alapján megállapítottuk, hogy a normál szövetből származó miofibroblasztokban átlagosan 10 olyan eltérés mutatható ki, ami funkcionális következményekkel járhat. Ezeket az eredményeket összevettük a tumorokból származó miofibroblasztok szekvencia adataival, és azt tapasztaltuk, hogy nincs jelentős különbség az adott betegből származó normál és a tumor-asszociált mintapár között. A tumor-asszociált miofibroblasztokban csupán néhány genomi eltérés azonosítható, ráadásul ezek több mint fele szinoním SNP vagy a fehérje funkciót prediktáló alkalmazások (Sift, PolyPhen) előrejelzése alapján tolerábilis/benignus genomi variancia. A kapott eredmények alapján tehát megállapítottuk, hogy a tumor-asszociált miofibroblasztokban nem mutatható ki emelkedett mutációs terhelés a tumorgenezissel összefüggésbe hozható genomi régiókban. Az eredményeinket számos tudományos publikáció megerősíti. Allinen és munkatársai dukális emlőtumorokból izolált miofibroblasztok genetikai állományát analizálva megállapították, hogy sem számottevő SNP eltérés, sem pedig kópiaszám változás nem azonosítható a tumor-asszociált sejtekben (Allinen Cancer Cell 2004). Hasonló adatokat kaptak hasnyálmirigy dukális adenokarcinómákban feldúsuló fibroblasztok vizsgálatával, melynek során szomatikus kópiaszám változás nem volt kimutatható a CAF sejtekben (Walter Cancer Biol Ther 2008), valamint emlőtumorok sztrómális állományának szekvenálása ugyancsak arra az eredményre vezetett, hogy a tumor mikrokörnyezet sejtjei genetikailag stabilak (Rummel Mol Cancer Res 2012). Ugyanakkor a fentieknek ellentmondó adatokat is közöltek, ezek azonban számos esetben kísérleti műtermékekből adódtak (pl. a paraffinos metszetek vizsgálata esetén). Campbell és szerzőtársai számos szekvenálási adatot elemző közleményük konklúziójában megállapítják, hogy a tumor mikrokörnyezet (mio)fibroblasztjaiban bár detektálhatók szomatikus eltérések, azonban ezek előfordulása, gyakorisága igen ritka. Ebből következően valószínűleg nem genomszekvenciát érintő változások állhatnak a sztrómális sejtek tumorgenezist támogató fenotípusának hátterében (Campbell Cancer Res 2009).

Mivel az általunk vizsgált mintapárok esetén sem tapasztalható számottevő genetikai eltérés a tumor-asszociált és normál miofibroblasztok között, így figyelmünk a lehetséges epigenetikai változások feltérképezése felé irányult, melyek közreműködhetnek a tumor sztróma miofibroblasztok megnövekedett számának, a sejtek morfológiai és funkcionális jellegzetességeinek kialakításában. A CAF sejtekben történő DNS metilációt érintő változásokról egyre több információval rendelkezünk, mind a teljes genom DNS metiláltságát

nézve, mind egyes gének promóter régióiban a CpG szigetek metilációját tekintve. Kooperációs partnereink is publikáltak ebben a témában, így már ismert volt számunkra, hogy a teljes genomot illetően a DNS metiláció mértéke alacsonyabbnak bizonyult a tumor-asszociált sejtekben, ha azokat összehasonlították ugyanazon páciens normál szövetéből izolált miofibroblasztokkal (Jiang Cancer Res 2008). Ehhez kapcsolódóan Ling és munkatársai kimutatták, hogy a globális DNS hipometiláció mértéke összefüggést mutat a kolorektális karcinómák progressziójával: minél előrehaladottabb a tumoros állapot, annál kevésbé metilált a tumor sztrómában lévő CAF sejtek DNS-e (Ling Anticancer Res 2016). Az egyes gének promóter régiójának metiláltsága is eltérő lehet a tumorból izolált fibroblasztokban, erre látunk példát Becker és szerzőtársainak publikációjában, akik igazolták, hogy a CAF sejtekben megváltozó glükóz anyagcsere hátterében egyes glikolitikus enzimeket (piruvát-kináz, laktát-dehidrogenáz) kódoló gének promóterének hipometilációja áll (Becker Cell Rep 2020). A DNS metilációval ellentétben a miofibroblasztokban azonosítható hiszton módosításokat érintő epigenetikus jelekről elvértve található információ a tudományos közleményekben. Tyan és munkatársai közölték, hogy emlőtumor sejtek és fibroblasztok együttes tenyésztése során az aktiválódó fibroblasztokban megnő az ADAMTS1 proteáz expressziója, mely összefüggést mutat a gén promóter régiójának csökkent H3K27 trimetilációjával (Tyan Plos One 2012). Továbbá, nem tumoros környezetben vizsgált fibroblaszt – miofibroblaszt differenciáció során megváltozik néhány hiszton metilációs módosítás mértéke: a differenciálódott miofibroblasztokban emelkedett H3K4 és H3K36 trimetilációt, valamint csökkent H3K9 trimetilációt és H3K27 dimetilációt igazoltak (Perrugoria Hepatology 2012). Mi is szeretnénk volna képet kapni arról, hogy a nukleoszómákat felépítő hiszton fehérjék poszttranszlációs módosításának mértéke eltérő-e a tumorokból, illetve a normál szövetből származó miofibroblasztokban. Ezért megvizsgáltuk több -egyéb folyamatokban már igazoltan fontos szerepet játszó- hiszton poszttranszlációs módosítás (H3 acetiláció, metiláció, H4 acetiláció) mértékét immuncitokémiát és western blot technikát alkalmazva. Kísérleteink eredményei alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a teljes kromatint tekintve alacsonyabb H3K9 trimetiláció detektálható a tumorokban feldúsult miofibroblaszt sejtekben. Ezek az eredmények egyezést mutatnak az előbb említett, a miofibroblaszt differenciációval foglalkozó publikáció (Perrugoria és mtsai) eredményével. A csökkent H3K9me3 mellett alacsonyabb H4K16 acetilációt is tapasztaltunk a tumorszövetből izolált miofibroblasztokban, azonban ennek interpretálása nem egyszerű, hiszen a tumor-asszociált sztrómális sejtek hiszton acetilációs

mintázata igen kevésbé feltérképezett. Azt azonban már tudjuk, hogy egyes hiszton deacetiláz enzimek (HDAC) és az általuk létrehozott csökkent hiszton acetiláció fontos szerepet játszanak a miofibroblasztok differenciációjában. Szöveti fibrózis vizsgálatok során igazolták, hogy pán-hiszton deacetiláz inhibitorok alkalmazásával visszaszorítható a miofibroblasztok szöveti felhalmozódása és a fibrózis mértéke máj-, szív-, tüdő- és veseszövetben (Yoon *Int J Mol Sci* 2019). Emellett arra is találunk adatokat, hogy a TGF- β indukálta tumor-asszociált fibroblaszt differenciációhoz szükséges a HDAC1, 3, 8 (Kim *Br J Cancer* 2018), illetve a HDAC 4 aktivitás (Glenisson *BBA Mol Cell Res* 2007). Li és munkatársai pedig arról számoltak be közleményükben, hogy CAF sejtekben emelkedett HDAC6 expresszió volt tapasztalható, és ez hozzájárult az immunszuppresszív mikrokörnyezet kialakulásához, illetve a tumoros betegség kedvezőtlenebb kimeneteléhez (Li *Oncogene* 2018).

A daganatsejtekben gének tucatjainak kifejeződése változik meg a tumor kialakulása és fejlődése során, ennek hátterében részben genetikai változások (mutáció felhalmozása), részben pedig epigenetikai okok rejlenek. Habár a tumor sztrómában jelenlévő (mio)fibroblasztok nem transzformált sejtek, a kísérleteinkben tapasztalt megváltozott mértékű hiszton poszttranszlációs módosulások hatással lehetnek a nukleoszómák szerkezetére és a kromatin kompaktságára, így befolyásolhatják a tumor-asszociált miofibroblasztokban zajló génexpressziós folyamatok intenzitását (Marks *Epigenomics* 2016). Várhatóan a tumor-asszociált sejtek génexpressziós profilja változik, miközben a fibroblasztok adaptálódnak a különböző szöveti eredetű tumoros sejtek és a mikrokörnyezet jelzéseihez, és számos közlemény adatai igazolják is ezt a várakozást (Navab *PNAS* 2011; Herrera *Clin Cancer Res* 2013; Berdiel-Acer *Oncotarget* 2014). Mi is megvizsgáltuk a nyelőcső- és vastagbél tumorokból származó sejtek részleges transzkriptomját, olyan gének expressziós analízisére fókuszálva, melyek összefüggésbe hozhatók a tumoros progresszióval. A vizsgálatba bevont 190 gén körülbelül 20%-ánál tapasztaltunk génkifejeződésbeli különbséget a miofibroblaszt mintapárok között. A változások főként a TGF- β és Wnt jelátvitelt, a sejtproliferációt, az ECM struktúrát és átalakítását, valamint a metasztázist befolyásoló fehérjék génjeit érintették.

A vizsgálatainkba bevont tumor-asszociált miofibroblaszt sejtekben magasabb ciklin D1 expressziót detektáltunk, ami jól korrelál a tumoros szövetmetszetekben látható megnövekedett miofibroblaszt sejtszámmal. Ez összhangban áll irodalmi adatokkal, amelyek invazív emlőtumoros páciensek sztrómális fibroblasztjaiban mutatják ki a ciklin D1 emelkedett expresszióját. A nagyobb mennyiségű ciklin D1 együtt jár a tumorok intenzívebb

növekedésével, a sejtek jobban ellenállnak az apoptózisnak és a túlélési mutatók csökkennek (Pestell Oncotarget 2017).

A ciklin D1 mellett a TGF- β jelátviteli útvonal néhány képviselője esetén is génexpressziós különbséget mértünk a miofibroblaszt sejt párok között. A TGF- β szignalizáció jelentősége a tumorgenezis során különösképpen a fibroblaszt aktivációban, a miofibroblaszt történő differenciációban rejlik (Tian Cell Signal 2011; Lampropoulos Cancer Letters 2012; Kis Expert Rev Mol Med 2011). Mindezek alapján okkal feltételezhetjük, hogy a fokozottabb expressziót mutató TGF- β 2 és SMURF2, valamint az alacsonyabban kifejeződő SMAD1 és 6, illetve TGF- β receptor 3 (TGFB3) befolyásolják a miofibroblasztok TGF- β jelátviteli folyamatait. A tumor sztróma sejtjeiben megváltozó SMAD expresszióval kapcsolatban már vannak irodalmi adatok. Több munkacsoport is kimutatta gyomor- és tüdőtumorból származó CAF sejtekben a kanonikus TGF- β útvonal megzavart működését (Najgebauer Carcinogenesis 2019; Vizoso Carcinogenesis 2015). Adataik alapján a SMAD3 fehérjét kódoló gén promótere hipermetilált, ami csökkent transzkripciót eredményez, az alacsony celluláris SMAD3 szint pedig együtt jár a sejtek TGF- β 1-re adott fokozott válaszkészségével. A TGFB3 expresszió ugyancsak intenzív érdeklődés tárgya mind a daganatsejteket, mind a tumor sztrómát illetően. Hempel és munkatársai petefészek daganatokban alacsony TGFB3 kifejeződést mutattak ki, mely mögött véleményük szerint epigenetikai okok húzódnak. Ha ektópikus termelés révén visszaállították a TGFB3 fehérjeszintet, az gátló hatással bírt a tumorsejtek invazivitására, migrációjára (Hempel Cancer Res 2007). A tumor sztróma vizsgálatával kapcsolatban is elérhetőek adatok: Jovanovic és munkatársai leírták, hogy alacsony TGFB3 expressziót figyeltek meg emlőtumorból izolált fibroblaszt sejtekben és ez befolyásolta a sejtek citokin szekrécióját (Jovanovic Cancers (Basel) 2016). Ugyanakkor a (mio)fibroblasztokban detektált TGF- β ligand termelés és a TGF- β jelátvitelhez kapcsolódó génkifejeződésbeli változások nem csak ezen sejtek saját működésére lesznek hatással. Tang és munkatársai megfigyelték, hogy a CAF sejtek által szekretált TGF- β 2 aktiválja a hedgehog jelátviteli utat tumor őssejtekben, így elősegítve ezen sejtek kemorezisztenciáját, életben maradását és az őssejt jellegük fenntartását (Tang PNAS 2018).

A TGF- β jelátvitel mellett a WNT útvonal két résztvevője, a WNT5A és a WISP1 is megváltozott, magasabb szinten expresszálódik a tumorokból izolált miofibroblasztokban. A WNT szignálút ugyancsak releváns a malignus transzformáció szempontjából (Behrens Int J Dev Biol 2004), külön kiemelhetők a kolorektális daganatok, ahol igen gyakoriak a WNT- β -

catenin–APC jelátviteli út működési rendellenességei (Schatoff Curr Colorectal Cancer Rep 2017). A Wnt jelátvitel során indukálódó WISP1 fehérjéről kimutatták, hogy vastagbél-tumорок peritumorális régiójában dúsul fel, interakciót létesít a fibroblaszt sejtekkel, antiapoptotikus szignálutakat aktivál és feltételezhetően parakrin módon is befolyásolja a tumoros progressziót (Pennica PNAS 1998; Desnoyers J Biol Chem 2001; Su Genes Dev 2002). Mindemellett kísérletes adatok arra utalnak, hogy a TGF- β jelpálya is képes befolyásolni a WNT szignalizációt, ezáltal fokozni az EMT-t és indukálni a miofibroblaszt irányú differenciációt pulmonáris fibrózisban (Sun Int J Mol Med 2014). Cook és szerzőtársai pedig arról számolnak be publikációjukban, hogy mezenhimális sejtekben a TGFBR3 csökkent mennyisége indukálja a Wnt5A transzkripcióját (Cook Oncogene 2019).

A miofibroblasztokról ismert, hogy az ECM alkotók szintézisével és szekréciójával képesek aktívan részt venni a mátrix összetételének és szerkezetének formálásában (van de Water Adv Wound Care 2013). A TaqMan array és az elvégzett kvantitatív PCR reakciók eredményei arra utalnak, hogy a tumor sztróma miofibroblasztjai csökkent mértékben expresszálnak egyes ECM proteoglikánokat/glikoproteineket (decorin, fibromodulin, perlecan, TGFBR3, nidogen1), azonban az eredmények értelmezése nem mindig egyszerű. A decorinról már ismert, hogy tumor-antagonista hatásokkal rendelkezik, lévén hogy interferál a növekedési faktor receptoroktól kiinduló jelátviteli útvonalakkal (EGFR, PDGFR, IGF-1R), illetve a TGF- β szignalizációval. Ezzel összhangban, a különböző szöveti eredetű daganatokban csökkent decorin expresszió mutatható ki, mely együtt jár a betegség kedvezőtlen prognózisával (Baghy FEBS J 2013; Troup Clin Cancer Res 2003; Skandalis Matrix Biol 2014; Neill Mol Cell Oncol 2015). A fibromodulin és a perlecan daganatokban történő expressziójával kapcsolatban ellentmondó adatokat találunk (Elgundi Front Oncol 2019; Hasegawa Pathol Res Pract 2016; Costanza J Clin Med 2017). A kollagén fibrillumok kialakulását szabályozó fibromodulin overexpressziója előnyös vagy akár hátrányos is lehet a tumorigenezis előrehaladásához (Schmidt Cancer Res 2008; Reyes Cancer Biomarkers 2016). Az ellentmondás magyarázata valószínűleg abban rejlik, hogy a fibromodulin eltérő hatással van a sztrómális fibroblasztokra, mint a tumorsejtekre. Fibroblasztokban a fibromodulin interferál az NF- κ B jelátviteli út működésével, és elősegíti a sejtek apoptózist (Lee J Biol Chem 2011). Emellett a TGF- β szignalizációra is hatással van, lévén hogy képes szekvesztrálni a TGF- β ligandmolekulákat és így csökkenteni a TGF- β hozzáférhetőségét a sejtek számára (Zheng J Invest Dermatol 2011). A perlecan heparán-szulfát proteoglikánnal kapcsolatban ugyancsak találunk bizonyítékot arra,

hogy sejttípus-függő hatásokkal rendelkezik (Nakamura Cells Tissues Organs 2015). Suhovskih és munkatársai vastagbél-tumorkok perlecan expresszióját vizsgálva azt tapasztalták, hogy a kolorektális daganatszövetben a perlecan kifejeződése átlagosan a felére csökkent a normál vastagbél szövetekben mért expresszióhoz képest (Suhovskih Cell Tissue Res 2015). Génexpressziós adatainkat megerősíti továbbá az is, hogy Holmberg és munkatársai hasonló eredményre jutottak gyomortumorkból izolált miofibroblasztok vizsgálata során. A tumor-asszociált sejtek szekretómiájának analízisekor az általunk is vizsgált proteoglikánok fehérjeszintje alacsonyabbnak bizonyult a mintapár normál tagjának szekretómiájához viszonyítva (Holmberg J Proteome Res 2013).

A bazális lamina felépítésében részt vevő nidogén-1-gyel kapcsolatban érdemes megemlíteni, hogy Ulazzi és szerzőtársai leírják, hogy gasztrointesztinális daganatokban igen gyakran hipermetilált a gén promóter régiója, és ez együtt jár a nidogén-1 alacsony expressziójával (Ulazzi Mol Cancer 2007). Nemrégiben közölték azt is, hogy az endotél sejtek által szekretált nidogén-1 gátolja a tumorsejtek migrációját (Ferraro BMC Cancer 2019). Az eddig említett ECM alkotók alacsonyabb expressziója mellett a TaqMan array-ben azt is kimutattuk, hogy a különféle sejt felszíni és ECM glikoproteinek szintézisében/módosításában fontos szerepet betöltő N-acetil-glükózamin transzferáz V (MGAT5) mRNS-e nagyobb mennyiségben fordul elő a tumor-asszociált sejtekben. A fehérjék poszttranszlációs módosítása, különösen a glikoziláció, egyre nagyobb hangsúlyt kap a tumorgenezis kapcsán, hiszen a glikozilációs mintázat és annak megváltozása befolyásolja a sejtek közötti kommunikációt (a ligand-receptor kapcsolatot), az immunműködést, a sejt-sejt, illetve sejt-mátrix kapcsolatokat és ezáltal a motilitást, a migrációs folyamatokat (Peixoto Front Oncol 2019; Li J Immunol 2008). Az általunk detektált emelkedett MGAT5 expresszió összhangban van az irodalmi adatokkal, miszerint az MGAT5 jelentős mértékben hozzájárul a tumoros folyamatok progressziójához (Carvalho Oncogene 2016, Granovszky Nat Med 2000).

A tumorok fejlődésének egyik alapvető lépése a daganatsejtek invazívvá válása, a tumoros sejt kilépése az elsődleges tumorból (Gupta & Massagué Cell 2006). Ehhez létfontosságú olyan enzimek termelése, melyek a tumort körülvevő extracelluláris mátrix fehérjeinek bontására alkalmasak, így teret nyitva a daganatsejtek vándorlásának (Sevenich & Joyce Genes Dev 2014). Ezek az ECM lebontását, átalakítását végző enzimek aktiválódásukat követően képesek megbontani a bazális membrán integritását, illetve hasítani a különböző kollagéneket, proteoglikánokat, multiadhéziós fehérjéket. Az ECM bontásában, átalakításában

esszenciális szerepet játszó mátrix metalloproteinázok ezáltal a tumorok metasztázis képzésének kulcsszereplői is (Gonzalez-Avila Crit Rev Oncol Hematol 2019; Deryugina & Quigley Cancer Metastasis Rev 2006). Irodalmi adatok alapján a tumorokból kimutatható emelkedett MMP aktivitás, valamint a metasztázisok gyakorisága és a rosszabb túlélési mutatók között szoros az összefüggés (Gobin BMC Cancer 2019). A tumor sztrómában működő MMP-k több forrásból is származhatnak (például tumor-asszociált makrofágokból), a jelentős részüket maguk a tumorsejtek, illetve a tumor-asszociált fibroblasztok, miofibroblasztok termelik és szekretálják a pericelluláris térbe (Koyama J Cancer Res Clin Oncol 2005; Kessenbrock Cell 2010). Az elvégzett TaqMan array kísérletünkben az MMP1 expressziója emelkedettnek, míg az MMP14, valamint az MMP inhibitor TIMP4 kifejeződése pedig alacsonyabbnak bizonyult a tumorokból származó miofibroblasztokban. Ez arra ösztönzött minket, hogy újabb mintapárok bevonásával több különféle MMP expresszióját is tanulmányozzuk. A miofibroblasztokból származó cDNS mintákon kvantitatív PCR vizsgálattal analizáltuk az MMP1, 2, 3, 10 és 12 génekről átíródó mRNS-ek mennyiségét és azt tapasztaltuk, hogy a tumor-asszociált mintákban legalább egy, de számos mintapár esetén több MMP expressziója is megemelkedett a normál miofibroblaszt párjaikhoz hasonlóan. A intenzívebb MMP expressziós profil változást a TNM besorolás alapján leginkább előrehaladott 195-ös, 456-os és 608-as minták tumor-asszociált miofibroblasztjaiban detektáltuk. Ezekben a sejtekben egy vagy több MMP expressziója is több mint tízszeres expressziós különbséget mutatott a normál mintapárjaikhoz hasonlóan. Több közlemény is beszámol arról, hogy a különböző tumorokban megváltozott MMP expressziós profil detektálható, és a tumorok jelentős részében kimutatható a kollagenázok (pl. MMP1) és a sztromelizinek (MMP3, 10) egymáshoz hasonló, emelkedett génkifejeződése (Gobin BMC Cancer 2019). A mi eredményeink azt mutatják, hogy a vizsgált mintapárok nagy többségében megfigyelhető az MMP3 és 10 emelkedett expressziója. Az MMP3 expressziója és a tumor differenciáltságának mértéke között fordított arányosságot mutattak ki gyomor tumorok esetén (Xu Oncol Lett 2016). A sztromelizinek emellett igen fontos szerepet játszanak a metasztázis létrejöttében. Az MMP3 és 10 segíti a tumorsejtek extravazációját, sőt, kimutatták, hogy a keringő tumorsejtek fokozzák az MMP3 és 10 kifejeződését a pre-metasztatikus niche területén is, így elősegítve a kolonizáció folyamatát (Huang Cancer Res 2009).

Az MMP génekhez kapcsolódóan egy transzkripció faktor, az ETV4 génjéről is nagyobb expressziót tapasztaltunk a tumorokból származó mintákban. Az ETV4

overexpresszió onkogenikus hatású, mely számos tumortípus esetén volt megfigyelhető (Oh BBA 2012). A transzkripció faktor fokozza az EMT-t, a sejtek inváziós képességét, így elősegíti a daganat szervezeten belüli szóródását részben azért, hogy serkenti a proteáz génekről történő transzkripciót (Pellecchia Oncogenesis 2012; Mesci World J Gastroenterol 2014; Keld Br J Cancer 2011). A kísérleteinkben vizsgált tumor-asszociált miofibroblasztokban a magasabb szinten kifejeződő MMP-k (1, 3, 10, 12) a génjeik szabályozó régióinak szerveződését tekintve egy csoportba sorolhatók, és közös jellemzőjük, hogy promóterük ETV4 kötőhelye(ke)t tartalmaz (Yan & Boyd J Cell Physiol 2007), így valószínűsíthető, hogy a tumor-asszociált sejtekben nagyobb mennyiségben szintetizálódó ETV4 serkenti ezen MMP-k expresszióját.

A gén szerkezeti változásokra és génexpresszióra vonatkozó méréseinket funkcionális vizsgálattal is kiegészítettük, analizáltuk a miofibroblaszt mintapárok motilitási képességét. Az erről nyert adatainkból arra lehet következtetni, hogy a tumorok sztrómájából izolált sejtek nagyobb migrációs kapacitással rendelkeznek, mint a normál szövetből izolált párjaik. Ezt az emelkedett sejt vándorlási képességet magyarázhatja, hogy emelkedett expressziót detektáltunk az endotelin-1 és a TIAM1 génekről ezekben a sejtekben. Az endotelin 1-ről kimutatták, hogy terméke egy metasztatizálással összefüggésbe hozható szekretált fehérje, mely markáns stimuláló hatással bír a tumorsejtek és sztrómális sejtek migrációjára és elősegíti a metasztatikus kolonizációt (Mahdi Front Pharmacol 2020; Zhao Clin Orthop Relat Res 2011; Said J Clin Invest 2011). A TIAM1 egy WNT útvonal által szabályozott gén, fehérjeterméke a Rho monomer G fehérjecsaldá guanin nukleotid kicserélő faktoraként funkcionál. Ennek révén hatással van az aktin citoskeleton dinamikájára, a filo- és lamellopodiumok, valamint a stresszfibrillumok kialakulására és ezáltal a sejt polarizációra, sejt migrációra. Különböző szöveti eredetű daganatokban kimutatták, hogy ha a TIAM1 emelkedett mennyiségben van jelen, az pozitívan befolyásolja a sejt vándorlást és a kemorezisztenciát, mindez pedig korrelál a tumoros folyamat kedvezőtlen kimenetelével (Wu Int J Clin Exp Med 2015; Izumi Cell Death Dis 2019; Ding Onco Targets Ther 2018).

A bemutatott eredmények egymással összhangban állva jól demonstrálják a tumor-asszociált miofibroblasztok megváltozott működését, potenciális szerepüket az invázió-metasztázis kaskádjában. Adataink arra utalnak, hogy a tumorokban aktiválódó vagy oda toborzódó miofibroblasztok közreműködnek a daganatsejtek invazivitásában, segítik a tumorsejtek migrációját. A tumor-asszociált miofibroblasztok birtokában vannak a fokozottabb

proteáz termelés és sejtmotilitás képességének, így akár a tumorsejtekkel kollektíven migrálva, például az invazív tumorszéleken, hozzájárulnak a daganatsejtek szervezeten belüli szóródásához és így a metasztázis(ok) kialakulásához (Sameni J Vis Exp 2012). Emellett egyes ECM proteoglikánok és adhézis fehérjék megváltozott termelésével aktívan alakítják a tumor mátrixot, ezáltal is befolyásolva egyrészt a daganatsejtek ECM fehérjékkel való interakcióját, vándorlási képességét, másrészt pedig a növekedési faktorok, citokinek, kemokinek és más szolubilis faktorok hozzáférhetőségét.

Eredményeinket összefoglalva megállapíthatjuk, hogy a tápcsatorna különböző szegmenseiből származó tumor-asszociált miofibroblasztok morfológiai-, génexpressziós- és funkcionális megváltozásának hátterében főként nem genetikai változások állnak, hanem valószínűsíthetően epigenetikai módosulások teszik lehetővé a tumor-támogató jellemvonások kialakulását. A hiszton acetiláció és metiláció mértékének megváltozása természetesen befolyással lehet az egyes génekről történő expresszió mértékére. Kísérleti adatainkat ugyanabból a páciensből származó tumor-asszociált és normál miofibroblaszt sejtek összehasonlításával nyertük, ami jelentősen növeli az értékét ezeknek az eredményeknek. Vizsgálatunk eredményei ugyanakkor arra is rámutattak, hogy az általános konklúziók levonásával óvatosan kell bánnunk, ugyanis jelentősek lehetnek az egyének közti variációból fakadó különbségek. Ez a felismerés egyre nagyobb hangsúlyt kap napjainkban a személyre szóló tumor terápia kialakításában is.

Az általunk bemutatott, valamint a mások által publikált adatok alapján a tumor-támogató miofibroblasztok ígéretes terápiás célpontnak tűnnek a daganatok széles körét illetően (Liu J Hematol Oncol 2019). A preklinikai, illetve klinikai fázisban lévő vizsgálatok száma növekvő tendenciát mutat, a tesztelés alatt álló hatóanyagok több különböző jellegzetességét használják ki a tumor-asszociált (mio)fibroblaszt sejteknek (Chen & Song Nat Rev Drug Discov 2019). A célzott terápiás megközelítések 4 fő csoportba sorolhatók. Az első csoportba tartoznak az aktivált fibroblasztok szelektív eliminálásán alapulnak a sejtek felszínén expresszáldó fibroblaszt aktivációs fehérjét (FAP-1) célozva. Ezen hatóanyagok között találunk FAP-specifikus radionuklid-konjugált antitesteket, valamint FAP DNS vakcinát is (Lindner EJNMMI Radiopharm Chem 2019; Duperret Clin Cancer Res 2018). A terápiás lehetőségek második csoportja a tumor-asszociált (mio)fibroblasztok aktivált, differenciálódott állapotának visszafordítását célozza. Ehhez A- és D-vitamin analógokat tesztelnek főként hasnyálmirigy adenokarcinóma modellben (Pereira Trends Cancer 2019). A harmadik csoport

hatóanyagai a tumorokban feldúsult fibroblasztokban aktiválódott jelátviteli utakkal interferálnak. A támadáspontban főként a TGF- β , az IL-6, a JAK-STAT, illetve az mTOR jelátviteli utak állnak (Huang Am J Cancer Res 2019). Az utolsó csoportba sorolható terápiás megközelítések a tumor-asszociált (mio)fibroblasztok ECM-ot módosító aktivitásait célozzák, különös tekintettel a tumor mátrixot átalakító MMP enzimekre. Az MMP-k aktivitásának visszaszorítása már régóta intenzív kutatások tárgya, az elmúlt időszakban több mint 50 MMP inhibitor volt klinikai vizsgálatok alanya (Liu Front Cell Dev Biol 2019). A kezdetben kifejlesztett peptidomimetikus inhibitorok az MMP-k széles körének aktivitását gátolták, ez azonban nem tűnt jó iránynak, lévén hogy az MMP-k szerteágazó funkciókkal rendelkeznek. Napjainkban a törekvések a szelektív MMP inhibitorok fejlesztését célozzák, melyek a kezelendő beteg tumorának MMP expressziós profilja alapján hatékony terápiás megoldást jelenthetnek (Winer Mol Cancer Ther 2018).

A legfontosabb eredmények az alábbi pontokban foglalható össze:

- 1, A daganatokban akkumulálódott miofibroblasztokban nem mutatható ki szignifikáns genetikai eltérés a tumorok kialakulásához és fejlődéséhez köthető SNP-k és gének exonjait kódoló genomi DNS szekvenciákban.
- 2, A tumor-asszociált miofibroblasztokban megváltozott egyes hiszton poszttranszlációs módosítások mértéke: alacsonyabb mértékű H3K9 trimetilációt és H4K16 acetilációt detektáltunk a tumorokból izolált miofibroblaszt sejtekben.
- 3, A tumor-asszociált miofibroblasztokat megváltozott génexpressziós profil jellemzi. Az eltérő mértékben expresszálandó gének fehérjetermékei az alábbi folyamatokban játszanak szerepet: az invázió-metasztázis kaszkád, az extracelluláris mátrix szerveződés és degradáció, a TGF- β - és Wnt jelátvitel és a sejtosztódás szabályozása.
- 4, Egyes ECM proteoglikánok és glikoproteinek alacsonyabb szinten expresszálandóknak a tumorokból izolált miofibroblaszt sejtekben. A decorin, a fibromodulin, a perlecan, a TGF- β receptor 3 és a nidogen 1 mRNS-ek kisebb mennyiségben detektálhatók a tumor-asszociált miofibroblaszt sejtekben.

- 5, A daganatos szövet miofibroblasztjaiban megváltozott mátrix metalloproteináz kifejeződés mutatható ki. Az MMP1, 2, 3, 10 és 12 gének expressziós profilja jelentősen eltér a tumor-asszociált és a normál miofibroblaszt sejtek között, esetenként igen jelentős expresszió növekedést detektáltunk a tumor sztróma miofibroblasztjaiban. Emellett az MMP3 és 10 fehérje mennyisége is magasabb a tumor-asszociált miofibroblasztokban.
- 6, A tumor-asszociált miofibroblasztok migrációs aktivitása jelentősen nagyobb, mint a normál miofibroblaszt sejteké.

A dolgozat megvalósításához hozzájárult a „Genom instabilitás és a karcinogenezis molekuláris térképezése, MolMedEx TUMORDNS” GINOP_2.3.2-15-2016-00020 pályázat.

8. Irodalomjegyzék

1. Akatsu Y *et al.* Fibroblast growth factor signals regulate transforming growth factor- β -induced endothelial-to-myofibroblast transition of tumor endothelial cells via Elk1. *Mol Oncol* 2019; 13: 1706–1724.
2. Alkasalias T *et al.* Fibroblasts in the tumor microenvironment: shield or spear? *Int J Mol Sci* 2018; 19(5) pii: E1532.
3. Allinen M *et al.* Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer. *Cancer Cell* 2004; 6: 17–32.
4. Arnold SA *et al.* Lack of host SPARC enhances vascular function and tumor spread in an orthotopic murine model of pancreatic carcinoma. *Dis Model Mech* 2010; 3(1-2): 57-72.
5. Attané C, Milhas D, Hoy AJ and Muller C. Metabolic remodeling induced by adipocytes: a new Achilles' heel in invasive breast cancer? *Curr Med Chem* 2020; 27(24): 3984-4001.
6. Avgustinova A *et al.* Tumour cell-derived Wnt7a recruits and activates fibroblasts to promote tumour aggressiveness. *Nat Commun* 2016; 7: 10305.
7. Bagalad BS, Kumar KPM and Puneeth HK. Myofibroblasts: Master of disguise. *J Oral Maxillofac Pathol* 2017; 21(3): 462-463.
8. Baghy K *et al.* Decorin interferes with platelet-derived growth factor receptor signaling in experimental hepatocarcinogenesis. *FEBS J* 2013; 280(10): 2150-64.
9. Balkwill FR, Capasso M and Hagemann T. The tumor microenvironment at a glance. *J Cell Sci* 2012; 125(Pt 23): 5591-6.
10. Beaugerie L *et al.* Risk of colorectal high-grade dysplasia and cancer in a prospective observational cohort of patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2013; 145(1): 166-175.e8.
11. Becker LM *et al.* Epigenetic reprogramming of cancer-associated fibroblasts deregulates glucose metabolism and facilitates progression of breast cancer. *Cell Rep* 2020; 31(9): 107701.
12. Behrens J and Lustig B. The Wnt connection to tumorigenesis. *Int J Dev Biol* 2004; 48(5-6): 477-87.
13. Belli C *et al.* Targeting the microenvironment in solid tumors. *Cancer Treat Rev* 2018; 65: 22–32.
14. Berdiel-Acer M *et al.* A 5-gene classifier from the carcinoma-associated fibroblast transcriptomic profile and clinical outcome in colorectal cancer. *Oncotarget* 2014; 5: 6437-6452.
15. Bi XL and Yang W. Biological functions of decorin in cancer. *Chin J Cancer* 2013; 32(5): 266–269.
16. Bi X *et al.* Decorin-mediated inhibition of colorectal cancer growth and migration is associated with E-cadherin *in vitro* and in mice. *Carcinogenesis* 2012; 33: 326-330.
17. Brinckerhof CE and Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3(3): 207-14.
18. Byun JS and Gardner K. Wounds that will not heal. Pervasive cellular reprogramming in cancer. *Am J Pathol* 2013; 182(4): 1055-1064.
19. Campbell I, Polyak K and Haviv I. Clonal mutations in the cancer-associated fibroblasts: the case against genetic coevolution. *Cancer Res* 2009; 69(17): 6765-9.
20. Carvalho S *et al.* Preventing E-cadherin aberrant *N*-glycosylation at Asn-554 improves its critical function in gastric cancer *Oncogene* 2016; 35(13): 1619–1631.

21. Cerofolini L, Fragaia M and Luchinat C. Mechanism and inhibition of matrix metalloproteinases. *Curr Med Chem* 2019; 26: 2609-2633.
22. Chaudhari RB. Myofibroblasts: functions, evolution, origins and the role in disease. *SRM J Res Dent Sci* 2015; 6: 234-9.
23. Chen X and Song E. Turning foes to friends: targeting cancer-associated fibroblasts. *Nat Rev Drug Discov* 2019; 18(2): 99-115.
24. Costanza B *et al.* Stromal modulators of TGF- β in cancer. *J Clin Med* 2017; 6(1): 7.
25. Cook LM *et al.* Betaglycan drives the mesenchymal stromal cell osteogenic program and prostate cancer-induced osteogenesis. *Oncogene* 2019; 38(44): 6959-6969.
26. Cox TR and Erler JT. Remodeling and homeostasis of the extracellular matrix: implications for fibrotic diseases and cancer. *Dis Model Mech* 2011; 4(2): 165–178.
27. Cui N, Hu M and Khalil RA. Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2017; 147: 1–73.
28. Czepán M *et al.* NHE1 activity contributes to migration and is necessary for proliferation of human gastric myofibroblasts. *Pflugers Arch* 2012, 463(3): 459-75.
29. Darby IA, Laverdet B, Bonté F and Desmoulière A. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. *Clin Cosmet Investig Dermatol* 2014; 7: 301–311.
30. De Bock M *et al.* Intracellular cleavage of the Cx43 C-terminal domain by matrix-metalloproteases: a novel contributor to inflammation? *Mediat Inflamm* 2015: 257471.
31. De Wever O and Mareel M. Role of myofibroblasts at the invasion front. *Biol Chem* 2002; 383(1): 55-67.
32. De Wever O, Demetter P, Mareel M and Bracke M. Stromal myofibroblasts are drivers of invasive cancer growth. *Int J Cancer* 2008; 123(10): 2229-38.
33. Deryugina EI and Quigley JP: Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 2006; 25: 9-34.
34. Desmoulière A., Geinoz A., Gabbiani F., Gabbiani G. Transforming growth factor- β 1 induces α -smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol* 1993; 122, 103–111.
35. Desnoyers L, Arnott D and Pennica D. WISP-1 Binds to Decorin and Biglycan. *J Biol Chem* 2001; 276(50): 47599-607.
36. Ding M *et al.* Elevated expression of Tiam1 is associated with poor prognosis and promotes tumor progression in pancreatic cancer. *Onco Targets Ther* 2018; 11: 4367–4375.
37. Dirat B *et al.* Cancer-associated adipocytes exhibit an activated phenotype and contribute to breast cancer invasion. *Cancer Res* 2011; 71(7): 2455–65.
38. Direkze NC *et al.* Bone marrow contribution to tumor-associated myofibroblasts and fibroblasts. *Cancer Res* 2004; 64(23): 8492-5.
39. Direkze NC *et al.* Multiple organ engraftment by bone-marrow-derived myofibroblasts and fibroblasts in bone-marrow-transplanted mice. *Stem Cells* 2003; 21(5): 514-20.
40. Dranoff JA and Wells RG. Portal fibroblasts: underappreciated mediators of biliary fibrosis. *Hepatology* 2010; 51: 1438–44.
41. Drebert Z *et al.* Colon cancer-derived myofibroblasts increase endothelial cell migration by glucocorticoid-sensitive secretion of a pro-migratory factor. *Vascul Pharmacol* 2017, 89: 19-30.

42. Duperret EK *et al.* Alteration of the tumor stroma using a consensus DNA vaccine targeting fibroblast activation protein (FAP) synergizes with antitumor vaccine therapy in mice. *Clin Cancer Res* 2018; 24(5): 1190-1201.
43. Dvorak HF. Tumors: wounds that do not heal—redux. *Cancer Immunol Res* 2015; 3(1): 1–11.
44. Egeblad M and Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 161-174.
45. Egeblad M *et al.* Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism. *Dev Cell* 2010; 18(6): 884-901.
46. Elgundi Z *et al.* Cancer metastasis: the role of the extracellular matrix and the heparan sulfate proteoglycan perlecan. *Front Oncol* 2019; 9: 1482.
47. Evans RA, Tian YC, Steadman R and Phillips AO. TGF-beta1-mediated fibroblast-myofibroblast terminal differentiation- the role of Smad proteins. *Exp Cell Res* 2003; 282(2): 90-100.
48. Eyden B. The myofibroblast: phenotypic characterization as a prerequisite to understanding its functions in translational medicine. *J Cell Mol Med* 2008; 12(1): 22-37.
49. Eyden B. The myofibroblast, electron microscopy and cancer research. *Int J Cancer* 2009; 125: 1743–1745.
50. Fang H and DeClerck YA. Targeting the tumor microenvironment: from understanding pathways to effective clinical trials. *Cancer Res* 2013; 73(16): 4965–77.
51. Fang M, Yuan J, Peng C and Li Y. Collagen as a double-edged sword in tumor progression. *Tumour Biol* 2014; 35(4): 2871–2882.
52. Farhood B, Najafi M and Mortezaee K. CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes in cancer immunotherapy: a review. *J Cell Physiol* 2019; 234(6): 8509-8521.
53. Ferraro DA *et al.* Endothelial cell-derived nidogen-1 inhibits migration of SK-BR-3 breast cancer cells. *BMC Cancer* 2019; 19: 312.
54. Fiaschi T *et al.* Reciprocal metabolic reprogramming through lactate shuttle coordinately influences tumor-stroma interplay. *Cancer Res* 2012; 72(19): 5130-40.
55. Filipe C *et al.* Charting the unexplored extracellular matrix in cancer. *Int J Exp Pathol* 2018; 99: 58-76.
56. Fiori ME *et al.* Cancer-associated fibroblasts as abettors of tumor progression at the crossroads of EMT and therapy resistance. *Mol Cancer* 2019; 18: 70.
57. Foster DS *et al.* The evolving relationship of wound healing and tumor stroma. *LCI Insight* 2018; 3(18): e99911.
58. Frantz C *et al.* The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci* 2010; 123(Pt 24): 4195-200.
59. Gabbiani G, Ryan GB, Majno G. Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound constriction. *Experientia* 1971; 27: 549-50.
60. Geiger B and Yamada KM. Molecular architecture and function of matrix adhesions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011; 3(5): a005033.
61. Glenisson W *et al.* Histone deacetylase 4 is required for TGF beta1-induced myofibroblastic differentiation. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1773(10): 1572-82.
62. Gobin E *et al.* A pan-cancer perspective of matrix metalloproteases (MMP) gene expression profile and their diagnostic/prognostic potential. *BMC Cancer* 2019; 19: 581.
63. Gonzalez-Avila G *et al.* Matrix metalloproteinases participation in the metastatic process and their diagnostic and therapeutic applications in cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2019; 137: 57-83.

64. Granovsky M *et al.* Suppression of tumor growth and metastasis in Mgat5-deficient mice. *Nat Med* 2000; 6(3): 306-12.
65. Guilleray C, Huntington ND and Smyth M. Targeting natural killer cells in cancer immunotherapy. *Nat Immunol* 2016; 17(9): 1025-36.
66. Guo S and Deng C-X. Effect of stromal cells in tumor microenvironment on metastasis initiation. *Int J Biol Sci* 2018; 14(14): 2083-2093.
67. Gupta GP and Massagué J. Metastasis: building a framework. *Cell* 2006; 127(4): 679-95.
68. Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y and Longaker MT. Wound repair and regeneration. *Nature* 2008; 453: 314-321.
69. Hamidi H, Pietila M and Ivaska J. The complexity of integrins in cancer and new scopes for therapeutic targeting. *Br J Cancer* 2016; 115(9): 1017–1023.
70. Hanahan D and Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100(1): 57-70.
71. Hanahan D and Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144(5): 646-74.
72. Hanahan D and Coussens LM. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell* 2012; 21(3): 309-22.
73. Hasegawa M *et al.* Differential immunohistochemical expression profiles of perlecan-binding growth factors in epithelial dysplasia, carcinoma in situ, and squamous cell carcinoma of the oral mucosa. *Pathol Res Pract* 2016; 212(5): 426-36.
74. Haydon AMM *et al.* Effect of physical activity and body size on survival after diagnosis with colorectal cancer with modifications. *Gut* 2006; 55(1): 62–67.
75. Hempel N *et al.* Loss of betaglycan expression in ovarian cancer: role in motility and invasion. *Cancer Res* 2007; 67(11): 5231-8.
76. Herrera M *et al.* Functional heterogeneity of cancer-associated fibroblasts from human colon tumors shows specific prognostic gene expression signature. *Clin Cancer Res* 2013; 19(21): 5914–26.
77. Hida K, Maishi N, Annan DA and Hida Y. Contribution of tumor endothelial cells in cancer progression. *Int J Mol Sci* 2018; 19(5): 1272.
78. Hill JW *et al.* Intranuclear matrix metalloproteinases promote DNA damage and apoptosis induced by oxygen-glucose deprivation in neurons. *Neuroscience* 2012; 18: 277–290.
79. Hill BS, Sarnella A, D'Avino G and Zanetti A. Recruitment of stromal cells into tumour microenvironment promote the metastatic spread of breast cancer. *Semin Cancer Biol* 2020; 60: 202-213.
80. Hinz B. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *J Invest Dermatol* 2007; 127(3): 526-37.
81. Hinz B *et al.* Recent developments in myofibroblast biology: paradigms for connective tissue remodeling. *Am J Pathol* 2012; 180(4): 1340-55.
82. Holmberg C *et al.* Mapping Proteolytic processing in the secretome of gastric cancer-associated myofibroblasts reveals activation of MMP-1, MMP-2, and MMP-3. *J Proteome Res* 2013; 12(7): 3413–3422.
83. Hoy AJ, Balaban S and Saunders DN. Adipocyte–tumor cell metabolic crosstalk in breast cancer. *Trends Mol Med* 2017; 23(5): 381-392.
84. Huang TX, Guan XY and Fu L. Therapeutic targeting of the crosstalk between cancer-associated fibroblasts and cancer stem cells. *Am J Cancer Res* 2019; 9(9): 1889-1904.

85. Huang Y *et al.* Pulmonary vascular destabilization in the premetastatic phase facilitates lung metastasis. *Cancer Res* 2009; 69(19): 7529-37.
86. Hung TH *et al.* Association between complicated liver cirrhosis and the risk of hepatocellular carcinoma in Taiwan. *PloS One* 2017; 12(7): e0181858.
87. Iozzo RV and Schaefer L. Proteoglycan form and function: a comprehensive nomenclature of proteoglycans. *Matrix Biol* 2015; 42: 11–55.
88. Ishii G, Ochiai A and Neri S. Phenotypic and functional heterogeneity of cancer-associated fibroblast within the tumor microenvironment. *Adv Drug Deliv Rev* 2016; 99(Pt B): 186-196.
89. Izumi D *et al.* TIAM1 promotes chemoresistance and tumor invasiveness in colorectal cancer. *Cell Death Dis* 2019; 10: 267.
90. Jiang L *et al.* Global hypomethylation of genomic DNA in cancer-associated myofibroblasts. *Cancer Res* 2008; 68(23): 9900-8.
91. Jobin PG, Butler GS and Overall CM. New intracellular activities of matrix metalloproteinases shine in the moonlight. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 2017; 1864(11 Pt A): 2043-2055.
92. Jovanovic B *et al.* T β RIII Expression in Human Breast Cancer Stroma and the Role of Soluble T β RIII in Breast Cancer Associated Fibroblasts. *Cancers (Basel)* 2016; 8(11): 100.
93. Kalluri R. The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* 2016; 16: 582-598.
94. Kanzaki R and Pietras K. Heterogeneity of cancer-associated fibroblasts: opportunities for precision medicine. *Cancer Sci* 2020; 111(8): 2708-2717.
95. Keld R *et al.* PEA3/ETV4-related transcription factors coupled with active ERK signalling are associated with poor prognosis in gastric adenocarcinoma. *Br J Cancer* 2011; 105: 124–130.
96. Kessenbrock K, Plaks V and Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell* 2010; 141(1): 52-67.
97. Kim DJ *et al.* Suppression of TGF β -mediated conversion of endothelial cells and fibroblasts into cancer associated (myo)fibroblasts via HDAC inhibition. *Br J Cancer* 2018; 118(10): 1359-1368.
98. Kis K, Liu X, Hagood JS. Myofibroblast differentiation and survival in fibrotic disease. *Expert Rev Mol Med* 2011; 13: e27.
99. Kizu A, Medici D, Kalluri R. Endothelial-mesenchymal transition as a novel mechanism for generating myofibroblasts during diabetic nephropathy. *Am J Pathol* 2009; 175(4): 1371-3.
100. Kojima Y *et al.* Autocrine TGF-beta and stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) signaling drives the evolution of tumor-promoting mammary stromal myofibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(46): 20009-14.
101. Korniluk A, Koper O, Kemon H and Dymicka-Piekarska V. From inflammation to cancer. *Ir J Med Sci* 2017; 186(1): 57-62.
102. Koyama S. Coordinate cell-surface expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors on cancer-associated myofibroblasts from malignant ascites in patients with gastric carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2005; 131: 809-814.
103. KSH statisztika: https://www.ksh.hu/docs/hun/xstadat/xstadat_eves/i_wnh001.html.
104. Lampropoulos P *et al.* TGF-beta signalling in colon carcinogenesis. *Cancer letters* 2012, 314(1): 1-7.
105. Langsten KL *et al.* Comparative approach to the temporo-spatial organization of the tumor microenvironment. *Front Oncol* 2019; 9: 1185.
106. LeBleu VS and Kalluri R. A peek into cancer-associated fibroblasts: origins, functions and translational impact. *Dis Model Mech* 2018; 11(4): dmm029447.

107. Lee YH and Schiemann WP. Fibromodulin suppresses nuclear factor-kappa b activity by inducing the delayed degradation of ikba via a jnk-dependent pathway coupled to fibroblast apoptosis. *J Biol Chem* 2011; 286: 6414–6422.
108. Lei X *et al.* Immune cells within the tumor microenvironment: biological functions and roles in cancer immunotherapy. *Cancer Lett* 2020; 470: 126-133.
109. Li D *et al.* Knockdown of Mgat5 inhibits breast cancer cell growth with activation of CD4⁺ T cells and macrophages. *J Immunol* 2008; 180(5): 3158-3165.
110. Li M *et al.* Epithelial-mesenchymal transition: An emerging target in tissue fibrosis. *Exp Biol Med* (Maywood) 2016; 241(1): 1–13.
111. Li A, Chen P, Leng Y, Kang J. Histone deacetylase 6 regulates the immunosuppressive properties of cancer-associated fibroblasts in breast cancer through the STAT3-COX2-dependent pathway. *Oncogene* 2018; 37(45): 5952-5966.
112. Liao Z *et al.* Cancer-associated fibroblasts in tumor microenvironment – accomplices in tumor malignancy. *Cell Immunol* 2019; 343: 103729.
113. Lindner T *et al.* Targeting of activated fibroblasts for imaging and therapy. *EJNMMI Radiopharm Chem* 2019; 4:16.
114. Ling E *et al.* Human colorectal cancer stage-dependent global DNA hypomethylation of cancer-associated fibroblasts. *Anticancer Res* 2016; 36(9): 4503-7.
115. Liu T *et al.* Cancer-associated fibroblasts: an emerging target of anti-cancer immunotherapy. *J Hematol Oncol* 2019; 12: 86.
116. Liu T *et al.* Cancer-associated fibroblasts build and secure the tumor microenvironment. *Front Cell Dev Biol* 2019; 7: 60.
117. Livak KJ and Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; 25(4): 402-408.
118. Löffek S, Schilling O and Franzke CW. Biological role of matrix metalloproteinases: a critical balance. *Eur Resp J* 2011; 38: 191-208.
119. Lugano R, Ramachandran M and Dimberg A. Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities. *Cell Mol Life Sci* 2020; 77(9): 1745–1770.
120. Mahdi MR *et al.* Modulation of the endothelin system in colorectal cancer liver metastasis: influence of epigenetic mechanisms? *Front Pharmacol* 2020; 11: 180.
121. Malik R, Lelkes PI and Cukierman E. Biomechanical and biochemical remodeling of stromal extracellular matrix in cancer. *Trends Biotechnol* 2015; 33(4): 230–236.
122. Marks DL, Olson RLO and Fernandez-Zapico ME. Epigenetic control of the tumor microenvironment. *Epigenomics* 2016; 8(12): 1671-1687.
123. Mastenbroek TG *et al.* Platelet-associated matrix metalloproteinases regulate thrombus formation and exert local collagenolytic activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2015; 35(12): 2554-61.
124. Mehner C and Radisky DC. Triggering the landslide: the tumor-promotional effects of myofibroblasts. *Exp Cell Res* 2013; 319(11): 1657–1662.
125. Mesci A *et al.* Pea3 expression promotes the invasive and metastatic potential of colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol* 2014; 20(46): 17376–17387.
126. Miles FL and Sikes RA. Insidious changes in stromal matrix fuel cancer progression. *Mol Cancer Res* 2014; 12: 297–312.
127. Mishra PJ *et al.* Carcinoma-associated fibroblast-like differentiation of human mesenchymal stem cells. *Cancer Res* 2008; 68:4331-9.

128. Mittal D, Gubin MM, Schreiber RD and Smyth MJ. New insights into cancer immunoediting and its three component phases — elimination, equilibrium and escape. *Curr Opin Immunol* 2014; 27: 16–25.
129. Mittal R *et al.* Intricate functions of matrix metalloproteinases in physiological and pathological conditions. *J Cell Physiol* 2016; 231(12): 2599–621.
130. Monteran L and Erez N. The dark side of fibroblasts: cancer-associated fibroblasts as mediators of immunosuppression in the tumor microenvironment. *Front Immunol* 2019; 10: 1835.
131. Mori L *et al.* Fibrocytes contribute to the myofibroblast population in wounded skin and originate from the bone marrow. *Exp Cell Res* 2005; 304: 81–90.
132. Mueller MM and Fusenig NE. Friends or foes — bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nat Rev Cancer* 2004; 4(11): 839–49.
133. Nagase H, Visse R and Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res* 2006; 69(3): 562–73.
134. Najgebauer H *et al.* Integrated omics profiling reveals novel patterns of epigenetic programming in cancer-associated myofibroblasts. *Carcinogenesis* 2019; 40(4): 500–512.
135. Nakamura R, Nakamura F and Fukunaga S. Perlecan diversely regulates the migration and proliferation of distinct cell types in vitro. *Cells Tissues Organs* 2015; 200(6): 374–93.
136. Navab R *et al.* Prognostic gene-expression signature of carcinoma-associated fibroblasts in non-small cell lung cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108(17): 7160–5.
137. Navarro R, Compte M, Álvarez-Vallina L and Sanz L. Immune regulation by pericytes: modulating innate and adaptive immunity. *Front Immunol* 2016; 7: 480.
138. Neill T, Schaefer L, Iozzo RV. Oncosuppressive functions of decorin. *Mol Cell Oncol* 2015; 2(3): e975645.
139. O'Donnell JS, Teng MWL and Smyth MJ. Cancer immunoediting and resistance to T-cell based immunotherapy. *Nat Rev Clin Oncol* 2019; 16(3): 151–167.
140. Oh S, Shin S, Janknecht R. ETV1, 4 and 5: an oncogenic subfamily of ETS transcription factors. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1826(1): 1–12.
141. Orimo A and Weinberg RA. Heterogeneity of stromal fibroblast in tumors. *Cancer Biol Ther* 2007; 6(4): 618–619.
142. Oskarsson T. Extracellular matrix components in breast cancer progression and metastasis. *Breast* 2013; 22 Suppl 2: S66–72.
143. Otranto M *et al.* The role of the myofibroblast in tumor stroma remodeling. *Cell Adh Migr* 2012; 6(3): 203–219.
144. Ozdemir BC *et al.* Depletion of carcinoma-associated fibroblasts and fibrosis induces immunosuppression and accelerates pancreas cancer with reduced survival. *Cancer Cell* 2014; 25: 719–734.
145. Page-McCaw A, Ewald AJ and Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8(3): 221–233.
146. Paiva AE *et al.* Pericytes in the premetastatic niche. *Cancer Res* 2018; 78(11): 2779–86.
147. Paulsson J and Micke P. Prognostic relevance of cancer-associated fibroblasts in human cancer. *Semin Cancer Biol* 2014; 25: 61–8.
148. Peixoto A *et al.* Protein glycosylation and tumor microenvironment alterations driving cancer hallmarks. *Front Oncol* 2019; 9: 380.

149. Pellecchia A *et al.* Overexpression of ETV4 is oncogenic in prostate cells through promotion of both cell proliferation and epithelial to mesenchymal transition. *Oncogenesis* 2012; 1(7): e20 (2012).
150. Pennica D *et al.* WISP genes are members of the connective tissue growth factor family that are up-regulated in Wnt-1-transformed cells and aberrantly expressed in human colon tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95(25): 14717-22.
151. Pereira BA *et al.* CAF subpopulations: a new reservoir of stromal targets in pancreatic cancer. *Trends Cancer* 2019; 5: 724–41.
152. Perugorria MJ *et al.* Histone methyltransferase ASH1 orchestrates fibrogenic gene transcription during myofibroblast transdifferentiation. *Hepatology* 2012; 56(3): 1129-39.
153. Pestell TG *et al.* Stromal cyclin D1 promotes heterotypic immune signaling and breast cancer growth. *Oncotarget* 2017; 8: 81754-81775.
154. Pettit SJ *et al.* Immune selection in neoplasia: towards a microevolutionary model of cancer development. *Br J Cancer* 2000; 82(12): 1900–1906.
155. Pinter M, Trauner M, Peck-Radosavljevic M and Sieghart W. Cancer and liver cirrhosis: implications on prognosis and management. *ESMO Open* 2016; 1(2): e000042.
156. Piulats J and Mitjans F. Angiogenesis Switch Pathways. *Principles of Molecular Oncology* 2018; pp 239-256.
157. Polyak K *et al.* Co-evolution of tumor cells and their microenvironment. *Trends Genet* 2009; 25(1): 30-8.
158. Pomin VH and Mulloy B. Glycosaminoglycans and Proteoglycans. *Pharmaceuticals (Basel)* 2018; 11(1): 27.
159. Powell DW *et al.* Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease. *Am J Physiol* 1999; 277(1 Pt 1): C1-9.
160. Powell DW *et al.* Myofibroblasts. II. Intestinal subepithelial myofibroblasts. *Am J Physiol* 1999; 277(2 Pt 1): C183-201.
161. Provenzano PP *et al.* Collagen reorganization at the tumor-stromal interface facilitates local invasion. *BMC Med* 2006; 4: 38.
162. Quail DF and Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med* 2013; 19: 1423–1437.
163. Quail DF and Dannenberg AJ. The obese adipose tissue microenvironment in cancer development and progression. *Nat Rev Endocrinol* 2019; 15(3): 139–154.
164. Radisky DC, Kenny PA and Bissell MJ. Fibrosis and cancer: do myofibroblasts come also from epithelial cells via EMT? *J Cell Biochem* 2007; 101(4): 830–839.
165. Ren J *et al.* Carcinoma-associated fibroblasts promote the stemness and chemoresistance of colorectal cancer by transferring exosomal lncRNA H19. *Theranostics* 2018; 8:3932–48.
166. Reyes N *et al.* The small leucine rich proteoglycan fibromodulin is overexpressed in human prostate epithelial cancer cell lines in culture and human prostate cancer tissue. *Cancer Biomarkers* 2016; 16(1): 191–202.
167. Rhim AD *et al.* Stromal element act to restrain, rather than support, pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell* 2014; 25: 735-747.
168. Ribeiro AL and Okamoto OK. Combined Effects of Pericytes in the Tumor Microenvironment. *Stem Cells Int* 2015; 2015: 868475.
169. Ricard-Blum S. The collagen family. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011; 3(1): a004978.

170. Richards KE *et al.* Cancer-associated fibroblast exosomes regulate survival and proliferation of pancreatic cancer cells. *Oncogene* 2017; 36(13): 1770–1778.
171. Rummel S *et al.* Genomic (in)stability of the breast tumor microenvironment. *Mol Cancer Res* 2012; 10(12): 1526-31.
172. Sahai E *et al.* A framework for advancing our understanding of cancer associated fibroblasts. *Nat Rev Cancer* 2020; 20(3): 174-186.
173. Said N, Smith S, Sanchez-Carbayo M and Theodorescu D. Tumor endothelin-1 enhances metastatic colonization of the lung in mouse xenograft models of bladder cancer. *J Clin Invest* 2011; 121(1): 132–147.
174. Sameni M *et al.* MAME models for 4D live-cell imaging of tumor: microenvironment interactions that impact malignant progression. *J Vis Exp* 2012; 17(60): 3661.
175. Sandberg TP *et al.* Increased expression of cancer-associated fibroblast markers at the invasive front and its association with tumor-stroma ratio in colorectal cancer. *BMC Cancer* 2019; 19: 284.
176. Sato Y and Yanagita M. Resident fibroblasts in the kidney: a major driver of fibrosis and inflammation. *Inflamm Regen* 2017; 37: 17.
177. Schäfer M and Werner S. Cancer as an overhealing wound: an old hypothesis revisited. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9: 628-638.
178. Scharenberg MA *et al.* TGF- β -induced differentiation into myofibroblasts involves specific regulation of two MKL1 isoforms. *J Cell Sci* 2014; 127: 1079-1091.
179. Schatoff EM, Leach BI and Dow LE. Wnt signaling and colorectal cancer. *Curr Colorectal Cancer Rep* 2017; 13(2): 101-110.
180. Schmidt M, Sun G, Stacey MA, Mori L, Mattoli S. Identification of circulating fibrocytes as precursors of bronchial myofibroblasts in asthma. *J Immunol* 2003; 171: 380–9.
181. Schmidt M *et al.* The humoral immune system has a key prognostic impact in node-negative breast cancer. *Cancer Res* 2008; 68: 5405–5413.
182. Schreiber R, Old LJ and Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* 2011; 331(6024): 1565-70.
183. Schultz GS and Wysocki A. Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing. *Wound Repair Regen* 2009; 17(2): 153-62.
184. Sevenich L and Joyce JA. Pericellular proteolysis in cancer. *Genes Dev* 2014; 28: 2331-2347.
185. Shiga K *et al.* Cancer-associated fibroblasts: their characteristics and their roles in tumor growth. *Cancers (Basel)* 2015; 7(4): 2443-58.
186. Shukla A *et al.* CLIC4 regulates TGF- β -dependent myofibroblast differentiation to produce a cancer stroma. *Oncogene* 2014; 33: 842–850.
187. Sinha D *et al.* Pericytes promote malignant ovarian cancer progression in mice and predict poor prognosis in serous ovarian cancer patients. *Clin Cancer Res* 2015; 22(7): 1813–24.
188. Skandalis SS *et al.* Cross-talk between estradiol receptor and EGFR/IGF-IR signaling pathways in estrogen-responsive breast cancers: focus on the role and impact of proteoglycans. *Matrix Biol.* 2014; 35(): 182-93.
189. Slany A *et al.* Myofibroblasts are important contributors to human hepatocellular carcinoma: evidence for tumor promotion by proteome profiling. *Electrophoresis* 2013; 34(24): 3315-25.
190. Sobierajska K, Ciszewski WM, Sacewicz-Hofman I and Niewiarowska J. Endothelial cells in the tumor microenvironment. *Adv Exp Med Biol* 2020; 1234: 71-86.

191. Somerville RPT, Oblander SA and Apte SS. Matrix metalloproteinases: old dogs with new tricks. *Genome Biol* 2003; 4(6): 216.
192. Sperb N, Tsesmelis M and Wirth T. Crosstalk between tumor and stromal cells in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Int J Mol Sci* 2020; 21: 5486.
193. Su F, Overholtzet M, Besser D and Levine AJ. WISP-1 attenuates p53-mediated apoptosis in response to DNA damage through activation of the Akt kinase. *Genes Dev* 2002; 16(1): 46–57.
194. Sugimoto H, Mundel TM, Kieran MW and Kalluri R. Identification of fibroblast heterogeneity in the tumor microenvironment. *Cancer Biol Ther* 2006; 5(12): 1640-1646.
195. Suhovskih AV, Aidagulova SV, Kashuba VI and Grigorieva EV. Proteoglycans as potential microenvironmental biomarkers for colon cancer. *Cell Tissue Res* 2015; 361(3): 833-844.
196. Sun Z *et al.* Activated Wnt signaling induces myofibroblast differentiation of mesenchymal stem cells, contributing to pulmonary fibrosis. *Int J Mol Med* 2014; 33(5): 1097-109.
197. Sundaram GM, Quah S and Sampath P. Cancer: the dark side of wound healing. *FEBS J* 2018; 285(24): 4516-4534.
198. Talib WH, Alsayed AR, Farhan F and Kury LTA. Resveratrol and tumor microenvironment: mechanistic basis and therapeutic targets. *Molecules* 2020; 25(18): 4282.
199. Tang Y-A *et al.* Hypoxic tumor microenvironment activates GLI2 via HIF-1 α and TGF- β 2 to promote chemoresistance in colorectal cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2018; 115: E5990–E5999.
200. Tian M, Neil JR, Schiemann WP: Transforming growth factor-beta and the hallmarks of cancer. *Cellular signalling* 2011, 23(6): 951-962.
201. Troup S *et al.* Reduced expression of the small leucine-rich proteoglycans, lumican, and decorin is associated with poor outcome in node-negative invasive breast cancer. *Clin Cancer Res* 2003; 9(1): 207-14.
202. Tyan SW *et al.* Breast cancer cells induce stromal fibroblasts to secrete ADAMTS1 for cancer invasion through an epigenetic change. *PLoS One*. 2012; 7(4): e35128.
203. Ulazzi L *et al.* Nidogen 1 and 2 gene promoters are aberrantly methylated in human gastrointestinal cancer. *Mol Cancer* 2007; 6: 17.
204. van den Borne SW *et al.* Myocardial remodeling after infarction: the role of myofibroblasts. *Nat Rev Cardiol* 2010; 7: 30–7.
205. Van De Water L, Varney S and Tomasek JJ. Mechanoregulation of the myofibroblast in wound contraction, scarring and fibrosis: opportunities for new therapeutic intervention. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 2013; 2(4): 122-141.
206. Van Linthout S, Miteva K and Tschöpe C. Crosstalk between fibroblasts and inflammatory cells. *Cardiovasc Res* 2014; 102(2): 258-69.
207. Velnar T, Bailey T and Smrkolj B. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *Int J Med Res* 2009; 37(5): 1528-42.
208. Vizoso M *et al.* Aberrant DNA methylation in non-small cell lung cancer-associated fibroblasts. *Carcinogenesis* 2015; 36: 1453–63.
209. Vong S and Kalluri R. The role of stromal myofibroblast and extracellular matrix in tumor angiogenesis. *Genes Cancer* 2011; 2(12): 1139-1145.
210. Walker C *et al.* Role of extracellular matrix in development and cancer progression. *Int J Mol Sci* 2018; 19(10): 3028.

211. Walter K, Omura N, Hong SM, Griffith M, Goggins M. Pancreatic cancer associated fibroblasts display normal allelotypes. *Cancer Biol Ther* 2008; 7: 882–8.
212. Wang W *et al.* Intracellular action of matrix metalloproteinase-2 accounts for acute myocardial ischemia and reperfusion injury. *Circulation* 2002; 106: 1543–1549.
213. Wang M *et al.* Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. *J Cancer* 2017; 8(5): 761-73.
214. Wang YY *et al.* Mammary adipocytes stimulate breast cancer invasion through metabolic remodeling of tumor cells. *JCI Insight* 2017; 2(4): e87489.
215. Webber J *et al.* Cancer exosomes trigger fibroblast to myofibroblast differentiation. *Cancer Res* 2010; 70(23); 9621–30.
216. Webber JP *et al.* Differentiation of tumour-promoting stromal myofibroblasts by cancer exosomes. *Oncogene* 2015; 34: 290–302.
217. Weinberg RA. *The biology of cancer*. Garland Science, Taylor and Francis Group, 2007. ISBN 0-8153-4076-1.
218. Winer A, Adams S and Mignatti P. Matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy: turning past failures into future successes. *Mol Cancer Ther* 2018; 17(6): 1147-1155.
219. Winkler J, Abisoye-Ogunniyan A, Metcalf KJ and Werb Z. Concepts of extracellular matrix remodelling in tumour progression and metastasis. *Nat Commun* 2020; 11: 5120.
220. Wu QY *et al.* Expression and clinical significance of Tiam1 gene in esophageal carcinoma. *Int J Clin Exp Med* 2015; 8(11): 21229-34.
221. Wu Q *et al.* Cancer-associated adipocytes: key players in breast cancer progression. *J Hematol Oncol* 2019; 12: 95.
222. Xu J and Mosher D. Fibronectin and other adhesive glycoproteins. *The extracellular matrix: an overview* 2011; pp41-75.
223. Xu J *et al.* Matrix metalloproteinase expression and molecular interaction network analysis in gastric cancer. *Oncol Lett* 2016; 12(4): 2403-2408.
224. Yan C and Boyd DD. Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. *J Cell Physiol* 2007; 211: 19-26.
225. Yazdani S, Bansal R and Prakash J. Drug targeting to myofibroblasts: implication for fibrosis and cancer. *Adv Drug Deliv Rev* 2017; 121:101-116.
226. Yokozaki H *et al.* Cancer as a tissue: the significance of cancer-stroma interactions in the development, morphogenesis and progression of human upper digestive tract cancer. *Pathol Int* 2018; 68: 334–352.
227. Yoon S, Kang G and Eom GH. HDAC inhibitors: therapeutic potential in fibrosis-associated human diseases. *Int J Mol Sci* 2019; 20(6): 1329.
228. Yuan Y, Jiang YC, Sun CK and Chen QM. Role of the tumor microenvironment in tumor progression and clinical applications. *Oncol Rep* 2016; 35(5): 2499-2515.
229. Zhao Y, Liao Q, Zhu Y and Long H. Endothelin-1 promotes osteosarcoma cell invasion and survival against cisplatin-induced apoptosis. *Clin Orthop Relat Res* 2011; 469(11): 3190-9.
230. Zheng Z *et al.* Delayed wound closure in fibromodulin-deficient mice is associated with increased TGF- β 3 signaling. *J Investig Dermatol* 2011; 131: 769–778.

9. Angol nyelvű összefoglaló

The tumor microenvironment (TME) is now recognized as a critical player in cancer progression. Besides the restructured extracellular matrix (ECM), the tumor stroma consists of numerous mesenchymal cells recruited to the TME. In addition to neoplastic cells, the tumor stroma includes activated fibroblasts, various immune cells, endothelial cells, pericytes, and adipocytes, which all actively communicate with each other. Due to these reciprocal interactions, the stroma ultimately evolves into a tumor-promoting environment. In the cellular stroma of various epithelial cancers, the most abundant cells are the cancer-associated fibroblasts (CAF). An increasing body of evidence indicates that CAFs promote tumor growth and cancer cell dissemination. CAFs comprise a heterogeneous population of fibroblast cells, where the α -smooth muscle actin and vimentin expressing myofibroblasts represent the most prominent subtype. These spindle-shaped stromal cells were originally identified as key participants of wound healing, but they have a pivotal role in tumor development as well. They have the ability to express and secrete several extracellular proteins including matrix components, ECM proteases, growth factors, cytokines, and chemokines, thereby can actively influence cancer cell proliferation and survival and also trigger numerous reactions in the invasion-metastasis cascade. It is well known that the number, the arrangement, and the morphology of the myofibroblasts can be markedly different in tumor tissues than in normal tissues, however, the transcriptional features, the epigenetic pattern, and the genetic stability of these cells have not been fully characterized yet.

In order to investigate the possible genetic, epigenetic, transcriptional, and functional changes in tumor-associated stromal cells, myofibroblasts were isolated from tissue samples obtained from patients diagnosed with gastrointestinal tumors. Specimens were taken from the tumor tissues and also from the adjacent normal area (at least 3-4 cm distant from the tumors). The isolation and maintenance of myofibroblast cells were carried out by Professor Péter Hegyi's research group at the 1st Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, University of Szeged.

In the first step, variant analysis was performed on myofibroblasts to examine the genetic alterations in cancer predisposed genes and to identify single nucleotide polymorphisms. DNA sequences totaling 255 kbp in samples obtained from normal tissue-

derived and tumor-derived myofibroblast cells were analyzed by next-generation deep sequencing. The results clearly showed that tumor-derived myofibroblasts demonstrated just a few sequence variants not present in normal myofibroblasts. The low occurrence of somatic variants in myofibroblasts obtained from the tumor tissue suggests that the mutation frequency is not greatly elevated in tumor-associated cells.

Based on these findings, namely the lack of massive genetic alterations, we hypothesized that epigenetic modifications may be responsible for the development of the observed histological and supposedly, of the altered functional features of tumor tissue residing myofibroblasts. Since epigenetic alterations can markedly affect the morphology and the behavior of cells, a selected number of histone posttranslational modifications were examined by immunostaining and Western blot. The results of these experiments revealed that the global level of trimethylated H3K9 and of acetylated H4K16 was significantly lower in the tumor-derived myofibroblasts compared to the adjacent normal myofibroblast cells.

As a further step, we compared the expression patterns of selected genes linked to cancer progression between myofibroblasts obtained from normal and gastrointestinal tumor tissue. The mRNA levels of 190 chosen genes were determined on TaqMan low-density gene expression arrays. We found that several genes involved in invasion and metastasis, in ECM formation and remodeling, in the regulation of cellular growth, and in TGF- β and Wnt signaling pathways demonstrated altered expression in myofibroblast cultures derived from the tumor compared to those, isolated from the adjacent normal tissue of the patient.

According to the results of the TaqMan array, the focus of our work shifted towards the presumed ECM remodeling and metastasis promoting features of tumor myofibroblasts. In order to validate our TaqMan array results, additional matching myofibroblast primary culture pairs were included in our subsequent experiments. First, the expression levels of several ECM proteoglycans and glycoproteins were analyzed by RT-qPCR and the detected mRNA quantities confirmed that the examined ECM proteins were expressed at lower levels in tumor-associated myofibroblasts, supporting the results of the TaqMan gene expression array.

The above mentioned TaqMan array results also indicated that genes encoding matrix modifying factors exhibited altered expression levels in tumor-associated myofibroblasts. Since these stromal cells can secrete a number of MMP enzymes into their surroundings, the expression pattern of MMP1, MMP2, MMP3, MMP10, and MMP12 in myofibroblasts was examined in tumor- and normal tissue-derived cells. Using RT-qPCR significantly increased

levels of mRNAs corresponding to MMP genes were measured in myofibroblasts isolated from the tumors compared to the normal tissue myofibroblast cells. Moreover, elevated amounts of MMP3 and MMP10 proteins were also detected in the lysates of tumor-derived myofibroblasts by Western blotting. On the other hand, no difference in the MMP2-related gelatinase activity was found either between lysates or the conditioned media of myofibroblast cells isolated from the tumor or from the healthy tissues. The qPCR and zymography results both confirmed that MMP9 is not expressed in the primary gastrointestinal myofibroblasts involved in our experiments.

To verify the tumor-promoting phenotype of cancer-associated myofibroblasts, the migratory capacity of tumor- and normal tissue-derived myofibroblasts were investigated. The migration activity of the cells was assessed in scratch wound assays in a 24-hour time frame. The results demonstrated that the tumor-derived myofibroblasts exhibited significantly higher migratory capacity compared to their normal tissue derived counterparts.

In conclusion, the results of this study indicate that myofibroblasts accumulating in the tumor stroma display alterations both in gene expression and function compared to healthy tissue derived counterparts, caused mainly by epigenetic rather than genetic modifications. The detected alterations are probably acquired in the tumor microenvironment and likely participate in the development of a tumor-promoting myofibroblast phenotype.

10. Publikációk listája

MTMT azonosító: 10029158

I. A doktori eljárás alapját képző közlemények

1. A dolgozat témájához kapcsolódó publikáció:

Ildikó Huliák, László Bodai, Máttyás Czepán, Dávid Kovács, Anikó Szabó, László Tiszlavicz, György Lázár, Zoltán Rakonczay jr, Péter Hegyi, Imre M Boros, Monika Kiricsi: *Genetic, epigenetic and transcriptional comparison of esophagus tumor-associated and adjacent normal myofibroblasts*. *Oncology Reports* 2019; 41(2): 839-852.

<https://doi.org/10.3892/or.2018.6909>

Q1; IF: 3.417

2. A doktori eljáráshoz felhasznált, de a dolgozat témájához nem kapcsolódó publikáció:

Ildikó Huliák, Ádám Sike, Sevil Zencir, Imre M. Boros: *The objectivity of reporters: interference between physically unlinked promoters affects gene reporter expression in transient transfection experiments*. *DNA and Cell Biology* 2012; 31(11):1580-4.

<https://doi.org/10.1089/dna.2012.1711>

Q2; IF: 2,344

II. Referált folyóiratban megjelent közlemények

Barbara N Borsos, **Ildikó Huliák**, Hajnalka Majoros, Zsuzsanna Újfaludi, Ákos Gyenis, Péter Pukler, Imre M Boros, Tibor Pankotai: *Human p53 interacts with the elongating RNAPII complex and is required for the release of actinomycin D induced transcription blockage*. *Scientific Reports* 2017; 7: 40960.

<https://doi.org/10.1038/srep40960>

Q1; IF: 4.122

Péter Bencsik, Krisztina Kupai, Zoltán Giricz, Anikó Görbe, **Ildikó Huliák**, Susanna Fürst, László Dux, Tamás Csont, Gábor Jancsó, Péter Ferdinandy: *Cardiac capsaicin-sensitive sensory nerves regulate myocardial relaxation via S-nitrosylation of SERCA: role of peroxynitrite*. British Journal of Pharmacology 2008; 153 (3): 488-96.
<https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707599>
Q1; IF: 4.902

Attila Kiss, László Juhász, **Ildikó Huliák**, Ágnes Végh: *Intracoronary infusion of peroxynitrite protects against ischaemia and reperfusion-induced arrhythmias in anaesthetised dogs without affecting mitochondrial KATP channels*. British Journal of Pharmacology 2008; 155(7): 1015-24.
<https://doi.org/10.1038/bjp.2008.344>
Q1; IF: 4.902

Összesített impakt faktor: 19,687

11. Köszönetnyilvánítás

Legelőször is szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, **Prof. Dr. Boros Imrének** és **Dr. Kiricsi Mónikának**, akik hosszú éveken át támogattak, megteremtették a munka anyagi és szellemi feltételeit, és akik nélkül a publikációk és maga a dolgozat sem készülhetett volna el. Hálás vagyok, hogy „atyai és anyai” türelemmel kivárták a dolgozatom megszületését és végig éreztették, hogy mellettem állnak és az esetleges szigorúbb szavaik is az én érdekemet szolgálják.

Köszönöm **Prof. Dr. Hegyi Péternek**, hogy lehetővé tette, hogy a dolgozatomban szereplő kísérletekhez felhasználhassam az általuk izolált miofibroblasztok sejteket, és hogy hozzájuthassak a kísérletekbe bevont betegek tumorjainak szövettani adataihoz. Hálás vagyok **Dr. Csepán Mátyásnak** és **Fuksz Zoltánné „Bözsörőnek”**, hogy idejükből sokat áldozva megtanítottak a miofibroblasztokkal való munkavégzésre és ha sejtekre volt szükségem, bármikor a rendelkezésemre álltak.

Külön köszönettel tartozom jelenlegi Tanszékvezetőmnek, **Dr. Bodai Lászlónak**, aki oroslánrészt vállalt a szekvenálási feladatokban és a közös munka szemléletformáló volt számomra. Ugyancsak nagyon hálás vagyok **Szabó Anikónak**, **Dr. Zsindely Nórának** és **Dr. Kovács Dávidnak**, hogy segítettek a gyerekeim születését követő időszak kísérleteinek kivitelezésében. Köszönöm segítőkész technikusainknak, **Pataki Edinának** és **Ökrösné „Kiskatinak”** a kísérletek megvalósításában nyújtott segítségüket, illetve hogy biztosították a laborok gördülékeny működéséhez nélkülözhetetlen alapokat.

Köszönettel tartozom továbbá a **Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék Munkatársainak**. Ha kérdésem volt, mindig volt kihez fordulni, mindig akadt olyan, aki tanáccsal látott el. Külön kiemelném a „**Nano-csoportot**”, akikkel olyan támogató baráti viszony alakult ki, ami nagyban elősegítette a munkát. **Igaz Nóri, Adamecz Dóri, Rusák-Makra Ildi**, köszöni nektek!

Végül, de nem utolsósorban köszönöm családomnak és barátaimnak a bátorítást. Külön hálás vagyok **Bandinak**, hogy mellettem állt és támogatott a munkában is az elmúlt majd' 10 évben. **Mamuci**, nagyon köszöni, hogy sokszor vigyáztál a gyerkőcökre!

12. Függelék

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
SZENT-GYÖRGYI ALBERT ORVOS-ÉS GYÓGYSZERÉSZTUDOMÁNYI CENTRUM
REGIONÁLIS HUMÁN ORVOSBIOLÓGIAI KUTATÁSETIKAI BIZOTTSÁGA

Helyben

Belső használatra

lkt. sz.: 37/2006.

Szakmai-etikai vélemény

Dr. Hegyi Péter tudományos főmunkatárs – SZTE ÁOK I. Belgyógyászati Klinika (6720 Szeged, Korányi fasor 8-10.)

Humán gasztrointesztinális epithel sejtek és myofibroblasztok szignalizációs folyamatainak vizsgálata in vitro körülmények között

témájú beadványához.

Bizottságunk a 2006. 03. 20-án érkezett fenti orvosi biológiai vizsgálatról szóló tervet kutatásetikai és orvosetikai szempontból értékelte és megállapította, hogy az abban foglaltak az egészségügyi miniszter 23/2002. valamint 24/2002 EüM rendeletében leírtaknak megfelelnek/nem felelnek meg*.

A részletes kutatáshoz, tervhez mellékelte vizsgálatba vett személyi adatlap mintát és a beleegyezési nyilatkozatot etikai-szakmai szempontból megfelelőnek /kifogásolhatónak* találtuk.

Az engedélyt kérvényezőktől a vizsgálatba bevont személyek érdekeit képviselő, a kutatásban közvetlenül részt nem vevő kijelölt intézeti orvos láttamozásával a kutatás elkezdésétől számított 12 hónap múlva 1 oldalas jelentést kérünk /csak a rendeletben foglaltak alapján* kérünk értesítést.

A vizsgálati program befejezését hasonló módon kérjük/nem kérjük* visszajelezni. Az Etikai Bizottság a GCP és a hatályos jogszabályok szerint működik.

Szeged, 2006. március 20.

Prof. Dr. Wittmann Tibor
egyetemi tanár

SZTE
Szent-Györgyi Albert
Orvos-és Gyógyszerésztudományi Centrum
Regionális Humán Orvosi biológiai
Kutatásetika Bizottság elnöke

Prof. Dr. Julez János
tanszékvezető egyetemi tanár

SZTE
Szent-Györgyi Albert
Orvos-és Gyógyszerésztudományi Centrum
Etikai Bizottság elnöke

* aláhúzással jelezzük a megfelelő véleményt. Kifogás esetén észrevétel a túloldalon vagy melléklet formájában csatolva.

Szegedi Tudományegyetem
Szent-Györgyi Albert Orvos- és Gyógyszerésztudományi Centrum

Human Investigation Review Board
University of Szeged
Albert Szent-Györgyi Medical and Pharmaceutical Centre

H-6701 Szeged
P.O.Box: 427
Hungary

The Human Investigation Review Board on its last meeting discussed the ethical relations of the research proposal to be carried out at the Department of

Dr. Hegyi Péter tudományos főmunkatárs – SZTE ÁOK I. Belgyógyászati Klinika (6720 Szeged, Korányi fasor 8-10.)

The title of the proposed project is:

Humán gasztrointesztinalis epithel sejtek és myofibroblasztok szignalizációs folyamatainak vizsgálata in vitro körülmények között

The scheme of the experiments complies with the ethics of research. It agrees with the declaration of the Medical Word Federation proclaimed in Helsinki in 1964, therefore, the Human Investigation Review Board does not raise any objection to it from ethical point of view and supports it.

Szeged, 2006. 03. 20.

Dr. Wittmann Tibor
President of the
Human Investigation Review Board
University of Szeged
Hungary

14. ábra. A betegek mintáinak feldolgozásához kapott etikai engedély beszkenelt képei.

<i>Gén rövidítés</i>	<i>Gén név</i>	TaqMan Assay ID
ATF2	activating transcription factor 2	Hs00153179_m1
ADAMTS1	ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 1	Hs00199608_m1
APC	adenomatosis polyposis coli	Hs00181051_m1
ADM	adrenomedullin	Hs00181605_m1
ITGA4	alfa-4 integrin	Hs00168433_m1
ANGPT1	angiopoietin1	Hs00181613_m1
ANGPT2	angiopoietin2	Hs00169867_m1
ANGPT4	angiopoietin4	Hs00907078_m1
BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2	Hs00608023_m1
Bax	BCL2-associated X protein	Hs00751844_s1
BID	BH3 interacting domain death agonist	Hs00609632_m1
BRMS1	breast cancer metastasis suppressor 1	Hs00363036_m1
CDH1	cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)	Hs00170423_m1
CDH5	cadherin 5, type 2	Hs00174344_m1
CREB1	cAMP responsive element binding protein 1	Hs00231713_m1
CEACAM1	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1	Hs00236077_m1
CASP1	caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase (interleukin 1, beta, convertase)	Hs00354836_m1
CASP8	caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase	Hs01018151_m1
CTNNA1	catenin (cadherin-associated protein), alpha 1, 102kDa	Hs00426996_m1
CD44	CD44 antigen (Indian blood group)	Hs00153304_m1
CD82	CD82 antigen	Hs00174463_m1
CDC42	cell division cycle 42 (GTP binding protein, 25kDa)	Hs00854939_g1
FIGF	c-fos induced growth factor (vascular endothelial growth factor D)	Hs00189521_m1
CXCL12	chemokine (C-X-C motif) ligand 12 (stromal cell-derived factor 1)	Hs00171022_m1
CXCR4	chemokine (C-X-C motif) receptor 4	Hs00607978_s1
COL1A1	collagen, type I, alpha 1	Hs00164004_m1
COL4A1	collagen, type IV, alpha 1	Hs01007469_m1
COL15A1	collagen, type XV, alpha 1	Hs01559630_m1
CTGF	connective tissue growth factor	Hs00170014_m1
CHUK	conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase	Hs00989502_m1
CREBBP	CREB binding protein (Rubinstein-Taybi syndrome)	Hs00231733_m1
CTBP1	C-terminal binding protein 1	Hs00179922_m1
CCND1	cyclin D1	Hs00277039_m1
CCNE1	cyclin E1	Hs00233356_m1
CDKN2A	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (melanoma, p16, inhibits CDK4)	Hs00233365_m1
DCN	Decorin	Hs00754870_s1
DCC	deleted in colorectal carcinoma	Hs00180437_m1
DNMT1	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 1	Hs00154749_m1
DUSP1	dual specificity phosphatase 1	Hs00610256_g1
EP300	E1A binding protein p300	Hs00914223_m1
ENPP2	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2	Hs00196470_m1

EGLN1	egl nine homolog 1 (C. elegans)	Hs00254392_m1
EPAS1	endothelial PAS domain protein 1	Hs01026149_m1
EDN1	endothelin 1	Hs00174961_m1
EPHB2	EPH receptor B2	Hs00362096_m1
EGF	epidermal growth factor (beta-urogastrone)	Hs00153181_m1
ETV4	ets variant gene 4 (E1A enhancer binding protein, E1AF)	Hs00385910_m1
FAT	FAT tumor suppressor homolog 1 (Drosophila)	Hs00170627_m1
FGA	fibrinogén, alfa-lánc	Hs00241027_m1
FGF1	fibroblast growth factor	Hs00265254_m1
FGF2	fibroblast growth factor 2	Hs00266645_m1
FGF4	fibroblast growth factor 4	Hs00173564_m1
FGFR4	fibroblast growth factor receptor 4	Hs00242558_m1
FMOD	fibromodulin	Hs00157619_m1
FN1	fibronectin	Hs01549940_m1
FN1	fibronectin 1	Hs00365058_m1
FRAP1	FK506 binding protein 12-rapamycin associated protein 1	Hs00234522_m1
FLT4	fms-related tyrosine kinase 4	Hs01047677_m1
FXYD5	FXYD domain containing ion transport regulator 5	Hs00204319_m1
GNRH1	gonadotropin-releasing hormone 1 (luteinizing-releasing hormone)	Hs00171272_m1
GRN	granulin	Hs00963711_g1
GDF8 (MTSN)	growth differentiation factor 8 (myostatin)	Hs00193363_m1
GRB2	growth factor receptor-bound protein 2	Hs00157817_m1
HMOX1	heme oxygenase (decycling) 1	Hs00157965_m1
HPSE	heparanase	Hs00180737_m1
HSPG2	heparán-szulfát 2	Hs01078536_m1
HGF	hepatocyte growth factor (hepapoietin A; scatter factor)	Hs00300159_m1
HDAC1	histone deacetylase 1	Hs02621185_s1
HDAC2	histone deacetylase 2	Hs00231032_m1
HDAC3	histone deacetylase 3	Hs00187320_m1
HIF1A	hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor)	Hs00936368_m1
HIF1AN	hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit inhibitor	Hs00215495_m1
HIG2	hypoxia-inducible protein 2	Hs00203383_m1
IHH	Indian hedgehog homolog (Drosophila)	Hs01081801_m1
ING4	inhibitor of growth family, member 4	Hs01088026_m1
IGF1	insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)	Hs00153126_m1
ITGA2	integrin, alpha 2	Hs00158127_m1
ITGAV	integrin, alpha V (vitronectin receptor, alpha polypeptide, antigen CD51)	Hs00233808_m1
KAT2A	K (lysine) acetyltransferase 2A (GCN5)	Hs00221499_m1
KDR	kinase insert domain receptor (a type III receptor tyrosine kinase)	Hs00176676_m1
KISS1	KiSS-1 metastasis-suppressor	Hs00158486_m1
KREMEN1	kringle containing transmembrane protein 1	Hs00230750_m1

LAMB1	laminin, beta 1	Hs00158620_m1
LYPD3	LY6/PLAUR domain containing 3	Hs00205233_m1
MGAT5	mannosyl (alpha-1,6-)-glycoprotein beta-1,6-N-acetyl-glucosaminyltransferase	Hs00159136_m1
MADD	MAP-kinase activating death domain	Hs00366249_m1
MMP1	matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase)	Hs00233958_m1
MMP14	matrix metalloproteinase 14 (membrane-inserted)	Hs01037009_g1
MMP7	matrix metalloproteinase 7 (matrilysin, uterine)	Hs00159163_m1
MMP9	matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase)	Hs00234579_m1
MT3	metallothionein 3 (growth inhibitory factor (neurotrophic))	Hs00359394_g1
MTA1	metastasis associated 1	Hs00183042_m1
MTSS1	metastasis suppressor 1	Hs00207341_m1
MDK	midkine (neurite growth-promoting factor 2)	Hs00171064_m1
MAPK1	mitogen-activated protein kinase 1	Hs00177066_m1
MAPK14	mitogen-activated protein kinase 14	Hs00176247_m1
MAPK3	mitogen-activated protein kinase 3	Hs00385075_m1
MAPK7	mitogen-activated protein kinase 7	Hs00611114_g1
MAPK8	mitogen-activated protein kinase 8	Hs00177083_m1
MAPK9	mitogen-activated protein kinase 9	Hs00177102_m1
MAP2K2	mitogen-activated protein kinase kinase 2	Hs00360961_m1
MAP2K3	mitogen-activated protein kinase kinase 3	Hs00177127_m1
MAP2K4	mitogen-activated protein kinase kinase 4	Hs00387426_m1
MAP2K5	mitogen-activated protein kinase kinase 5	Hs00177134_m1
MAP3K1	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1	Hs00394890_m1
MAP3K11	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 11	Hs00176759_m1
MAP3K5	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5	Hs00178726_m1
MAP3K8	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 8	Hs00178297_m1
MAPKAPK2	mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2	Hs00358962_m1
MYST2	MYST histone acetyltransferase 2	Hs00272972_m1
NRP1	neuropilin 1	Hs00826128_m1
NRP2	neuropilin 2	Hs00187290_m1
NID1	nidogen 1	Hs00159600_m1
NOS2A	nitric oxide synthase 2A (inducible, hepatocytes)	Hs00167248_m1
NOS3	nitric oxide synthase 3 (endothelial cell)	Hs00167166_m1
NOTCH1	Notch homolog 1, translocation-associated (Drosophila)	Hs00413187_m1
NFKB1	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1 (p105)	Hs00765730_m1
PAK1	p21/Cdc42/Rac1-activated kinase 1 (STE20 homolog, yeast)	Hs00176815_m1
PCAF	p300/CBP-associated factor	Hs00187332_m1
PTCH	patched homolog 1 (Drosophila)	Hs00181117_m1
PTEN	phosphatase and tensin homolog (mutated in multiple advanced cancers 1)	Hs01920652_s1
PLG	plasminogen	Hs00264877_m1
PLAU	plasminogen activator, urokinase	Hs01547055_g1

PLAUR	plasminogen activator, urokinase receptor	Hs00182181_m1
PDGFRA	platelet-derived growth factor receptor, alpha polypeptide	Hs00998026_m1
PDGFRB	platelet-derived growth factor receptor, beta polypeptide	Hs00387364_m1
PTN	pleiotrophin	Hs00383235_m1
PRKAA1	protein kinase, AMP-activated, alpha 1 catalytic subunit	Hs01562315_m1
PRKAA2	protein kinase, AMP-activated, alpha 2 catalytic subunit	Hs00178903_m1
PTK2B	PTK2B protein tyrosine kinase 2 beta	Hs00169444_m1
RHOC	ras homolog gene family, member C	Hs00733980_m1
RAC1	ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (rho family, small GTP binding protein Rac1)	Hs00251654_m1
RGS3	regulator of G-protein signalling 3	Hs00367777_m1
RB1	retinoblastoma 1 (including osteosarcoma)	Hs00153108_m1
ROCK1	Rho-associated, coil-coil containing protein kinase	Hs00178463_m1
ROCK2	Rho-associated, coil-coil containing protein kinase 2	Hs00178154_m1
TIE1	RTK, Ig-like és EGF-like domain?	Hs00178500_m1
S100A4	S100 calcium binding protein A4 (calcium protein, calvasculin, metastasin, murine placental homolog)	Hs00243202_m1
SERPINB5	serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 5	Hs00184728_m1
SERPINE1	serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1	Hs00167155_m1
SHC1	SHC (Src homology 2 domain containing) transforming protein 1	Hs00427539_m1
SIRT1	sirtuin (silent mating type information regulation 2 homolog) 1 (S. cerevisiae)	Hs00202021_m1
SMURF1	SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 1	Hs00410929_m1
SMURF2	SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 2	Hs00224203_m1
SMAD1	SMAD, Mothers against dpp homolog 1	Hs00195432_m1
SMAD2	SMAD, Mothers against dpp homolog 2	Hs00183425_m1
SMAD3	SMAD, Mothers against dpp homolog 3	Hs00232222_m1
SMAD4	SMAD, Mothers against dpp homolog 4	Hs00232068_m1
SMAD5	SMAD, mothers against dpp homolog 5	Hs00195437_m1
SMAD6	SMAD, mothers against DPP homolog 6	Hs00178579_m1
SMAD7	SMAD, mothers against DPP homolog 7	Hs00178696_m1
SLC9A1	solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), member 1	Hs00300047_m1
SHH	sonic hedgehog homolog (Drosophila)	Hs00179843_m1
SP1	Sp1 transcription factor	Hs00293689_s1
SYK	spleen tyrosine kinase	Hs00374292_m1
SOD3	superoxide dismutase 3, extracellular	Hs00162090_m1
TIAM1	T-cell lymphoma invasion and metastasis 1	Hs00180075_m1
THBS1	thrombospondin 1	Hs00962914_m1
TIMP1	TIMP metalloproteinase inhibitor 1	Hs00171558_m1
TIMP2	TIMP metalloproteinase inhibitor 2	Hs00234278_m1
TIMP4	TIMP metalloproteinase inhibitor 4	Hs00162784_m1
TCF20	transcription factor 20 (AR1)	Hs00390028_m1
TADA2L	transcriptional adaptor 2 (ADA2 homolog, yeast)-like	Hs00370268_m1
TADA3L	transcriptional adaptor 3 (NGG1 homolog, yeast)-like	Hs00359540_g1

TGFBR3	Transforming growth factor beta receptor III	Hs00234257_m1
TGFB1	transforming growth factor, beta 1 (Camurati-Engelmann disease)	Hs99999918_m1
BIGH3	transforming growth factor, beta induced, 68 kDa	Hs00932747_m1
TGFBR1	transforming growth factor, beta receptor I (activin A receptor type II-like kinase, 53kDa)	Hs00610319_m1
TGFBR2	transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa)	Hs00559661_m1
TNFSF10	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	Hs00234356_m1
TP53	tumor protein p53 (Li-Fraumeni syndrome)	Hs00153349_m1
TACSTD1	tumor-associated calcium signal transducer 1	Hs00158980_m1
UCP2	uncoupling protein 2 (mitochondrial, proton carrier)	Hs01075227_m1
VEGF	vascular endothelial growth factor	Hs00900054_m1
VEGFB	vascular endothelial growth factor B	Hs00173634_m1
VEGFC	vascular endothelial growth factor C	Hs00153458_m1
FOS	v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	Hs00170630_m1
VHL	von Hippel-Lindau tumor suppressor	Hs01650959_m1
BRAF	v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1	Hs00269944_m1
RAF1	v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1	Hs00234119_m1
RELA	v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A, NF-kappa B, p65 (avian)	Hs00153294_m1
WNT1	wingless-type MMTV integration site family, member 1	Hs00180529_m1
WNT5A	wingless-type MMTV integration site family, member 5A	Hs00180103_m1
WISP1	WNT1 inducible signaling pathway protein 1	Hs00365573_m1
ACTB	actin, beta	Hs99999903_m1
B2M	beta-2-microglobulin	Hs99999907_m1
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Hs99999905_m1
GUSB	glucuronidase, beta	Hs99999908_m1
18S	18S rRNA	manufacturing control

9. táblázat. A TaqMan kis denzitású génexpressziós array vizsgálatba bevont gének listája.