

A galektin-1 alapvető faktor a csontvelő eredetű
mesenchymalis őssejtek tumor fejlődést
serkentő hatásában

Ph.D. értekezés

Szebeni Gábor János

Témavezető: Monostori Éva, Ph.D., D.Sc.

SZTE TTIK, Biológia Doktori Iskola

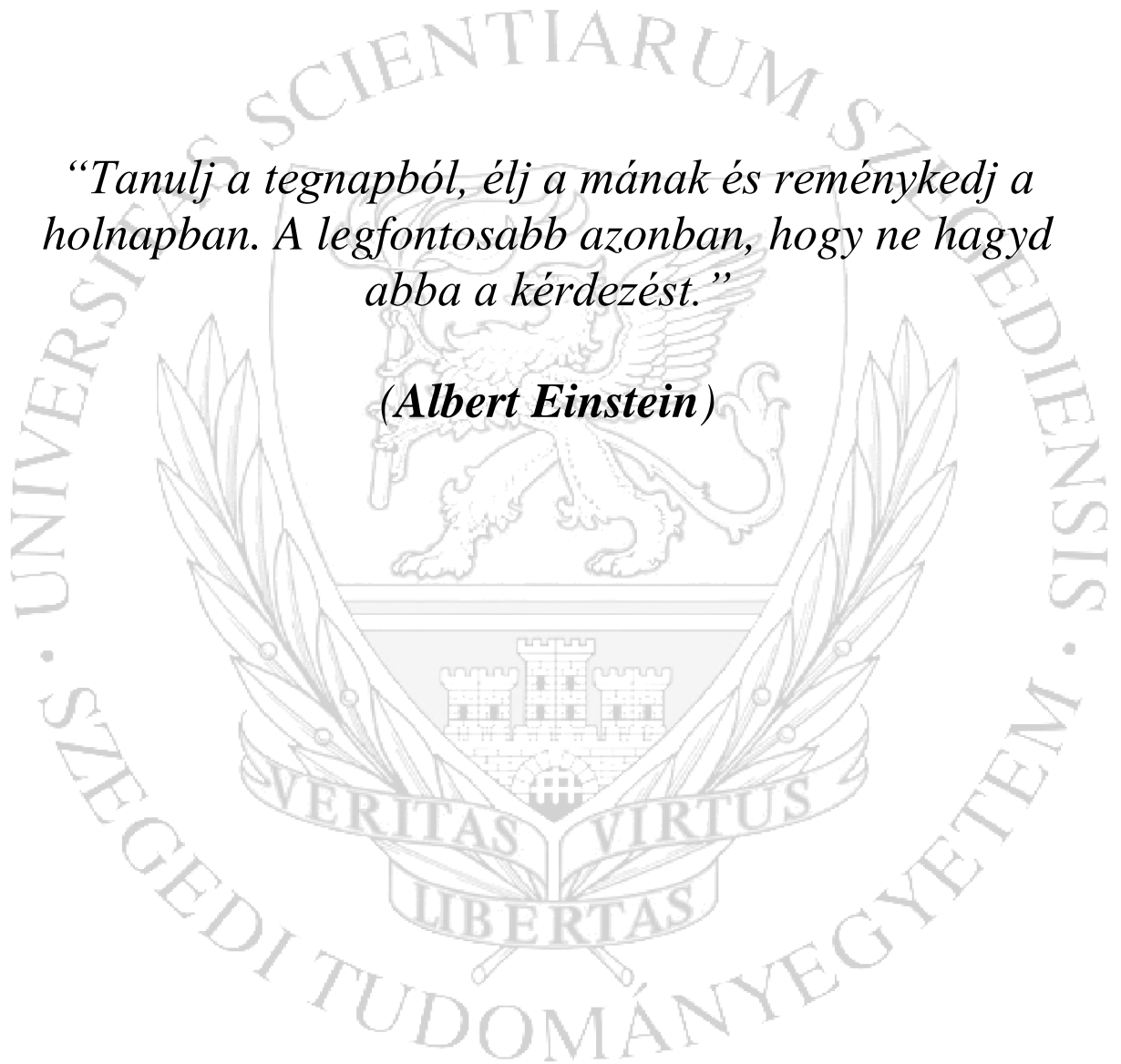
MTA SzBK, Genetikai Intézet

Szeged

2012

“Tanulj a tegnaptól, élj a mánap és reménykedj a holnapban. A legfontosabb azonban, hogy ne hagyd abba a kérdést.”

(Albert Einstein)



Tartalomjegyzék

I. Rövidítések jegyzéke.....	5
II. Bevezetés.....	6
II.1. Általánosan a tumor fejlődésről és a tumor sztróma szerepéről	6
II. 2. A mesenchymalis őssejtek általános jellemzése	8
II. 2. a. Az MSC-k tumor fejlődésben betöltött szerepe	10
II. 2. b. MSC-k a tumor immunprivilegiumban, vaszkularizációban és metasztázis képzésben.....	11
II. 3. A Gal-1 általános jellemzése.....	14
II. 3.a. A Galektin-1 tumor fejlődésben betöltött szerepe.....	15
II. 3.b. A Gal-1 és a tumor neo-angiogenesis kapcsolata	17
II. 3.c. Gal-1 szerepe a tumor sejtek adhéziós, migrációs és metasztázis képző folyamataiban.....	19
II. 4. Az MSC-ben termelődő Gal-1-gyel kapcsolatos eredmények.....	19
III. Célkitűzések.....	21
IV. Anyagok és módszerek.....	22
IV. 1. Az MSC-k izolálása.....	22
IV. 2. Emlős sejt kultúrák fenntartása.....	22
IV. 3. Áramlási citofluorimetriás vizsgálatok.....	22
IV. 4. Az MSC-k differenciáltatása	23
IV. 5. Az MSC-k Gal-1 siRNS transzfekciója.....	23
IV. 6. Egér tumor modell rendszer	25
IV. 7. SDS gél-elektroforézis és Western blot analízis.....	25
IV. 8. Szöveti vizsgálatok	26
IV. 9. <i>In vitro</i> kapilláris teszt	27
IV. 10. <i>In vitro</i> vándorlási teszt	27
IV. 11. Statisztikai analízis	28
IV. 12. Pufferek, oldatok készítése	28
V. Eredmények	31
V. 1. Az MSC és tumor sejt vonalak jellemzése	31
V. 2. A mesenchymalis őssejtek a tumor sejtek felé vándorolnak <i>in vitro</i> és galektin-1 termelésüktől függetlenül kimutathatóak a kifejtett emlőtumorokban.....	34

V. 3. Az MSC-k Gal-1 függő módon serkentik a tumor növekedést.....	36
V. 5. Az MSC eredetű Gal-1 fontos tényező a tumorok áttétképzésében	40
V. 6. Az endogén, sztróma eredetű Gal-1-nek döntő szerepe van a tumor növekedésben.....	42
VI. Diskusszió.....	45
VII. Irodalomjegyzék.....	49
VIII. Saját közlemények	62
IX. Összefoglalás	67
X. Summary	69
XI. Köszönetnyilvánítás.....	70

I. Rövidítések jegyzéke

αSMA:	α -smooth muscle actin (α -sima izom aktin)
ECM:	extracellular matrix (extracelluláris mátrix)
EGF:	epidermal growth factor (epidermális növekedési faktor)
FGF:	fibroblast growth factor (fibroblaszt növekedési faktor)
FITC:	fluoreszcein izotiocianát
FSP:	fibroblast specific protein (fibroblaszt specifikus fehérje)
Gal-1:	galektin-1
HIF-1α:	hipoxia induced factor-1 α (hipoxia indukálta faktor-1 α)
INF-γ:	interferon- γ
MSC:	mesenchymal stem cell (mesenchymalis őssejt)
MSC^{Gal-1^{-/-}}:	Gal-1 hiányos mesenchymalis őssejt
PDGF:	platelet-derived growth factor (vérlemezké eredetű növekedési faktor)
rhGal-1:	rekombináns humán galektin-1
R-PE:	R- Phycoerythrin
SCID:	severe combined immunodeficiency (súlyos, kombinált immunhiány)
scMSC:	véletlen nukleotid sorrendű (sc = scrambled) RNS transzfektált MSC
siMSC:	Gal-1 specifikus kis gátló (si = small interfering) RNS transzfektált MSC
TNF-α:	tumor nekrozis faktor - α
VEGF:	vascular endothelial growth factor (vaszkuláris endoteliális növekedési faktor)
vtMSC:	vad típusú mesenchymalis őssejt

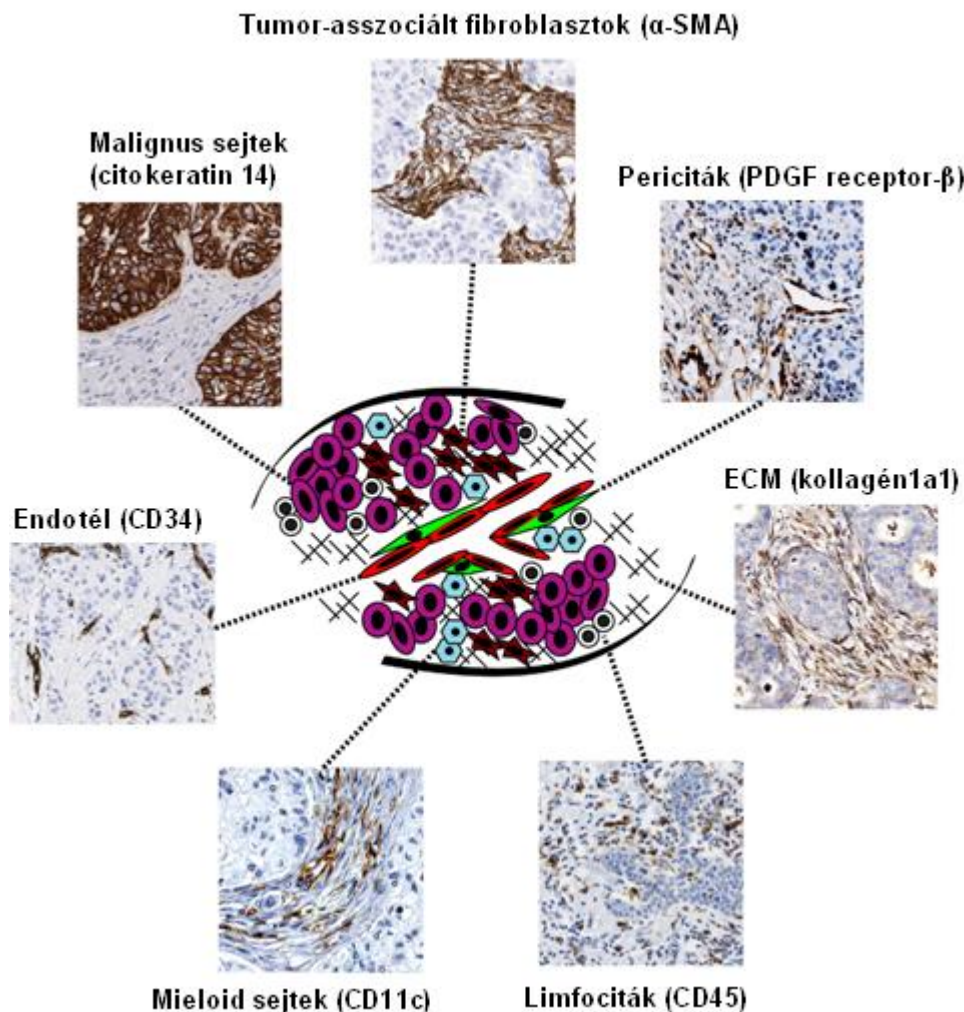
II. Bevezetés

II.1. Általánosan a tumor fejlődésről és a tumor sztróma szerepéről

Hanahan és Weinberg 2000-ben [1] összefoglalta a rák hat fő jellemzőjét. (1) Legtöbbször a daganat kialakulása egyetlen sejtől indul ki, amely osztódó sejt genetikailag instabillá válik, az onkogénekben funkció nyeresés, a tumor szupresszorokban funkció veszteses mutációkat halmoz fel, ezáltal a sejtciklusa kontrollálatlanná válik és korlátlan osztódásra képes. (2) Ezek a még jóindulatú sejtek a növekedési szignáloktól függetlenül magukat ill. (3) az osztódást gátló jelekre érzéketlenné válnak. (4) A kialakuló daganat új véregek képződése nélkül akár évtizedekig is nyugvó stádiumban marad, az angiogén váltást követően azonban az 1 mm-nél nagyobb átmérőjű tumorban új véregek alakulnak ki [2]. (5) A tumor sejtek elkerülik a differenciálódást és a programozott sejthalált, (6) átlépve a bazális laminán a már rosszindulatú daganat megtámadja a környező szöveteket, így áttéteket hoz létre. Egy bő évtizeddel később, az új kutatási eredmények tükrében indokoltá vált a rák még szélesebb látókörű megközelítése [3]. Napjainkban még két tényezővel bővítették ki a rákos szöveti elfajulás főbb jellemzőit. Egyrészt (7) a fiziológiás állapothoz képest megváltozik a daganat sejtek metabolizmusa, a Warburg-hatás [4] értelmében a mitokondriális terminális oxidáció helyett a glikolízist, majd a citoplazmában a tejsav fermentációját részesítik előnyben. (8) Másrészt a legtöbb tumor potenciálisan immunogén, bizonyos ráktípusokban már a tumor specifikus, ill. tumor-asszociált antigéneket is azonosították, azonban a rákos sejtek és mikrokozonyezetük számos stratégiával képes az ellenük irányuló immunválasz elkerülésére. A rák komplexitását csak akkor érthetjük meg, ha ismerjük a tumor szövetben, ill. a daganat mikrokozonyezetében lévő, különböző funkcióval bíró változatos sejtípusokat [5].

A rák kialakulásakor a tumoros sejtek közvetlen kozonyezete is egy patológias állapotnak megfelelő változásokon megy keresztül, a daganat fejlődésével párhuzamosan a tumor mikrokozonyezete, ill. a tumor sztróma ko-evolúciója során számos sejtípus (II. 1. ábra) hozzájárul a betegség előrehaladásához [6]. A tumor kötőszövetében lévő sztróma elemek (ECM) és sejtek (tumor-asszociált fibroblasztok, endotél és pericita sejtek, leukociták) szerkezeti vázat, immunológiai védelmet adnak és növekedési faktorokkal (pl. fibroblaszt - és hepatocita növekedési faktor) befolyásolják

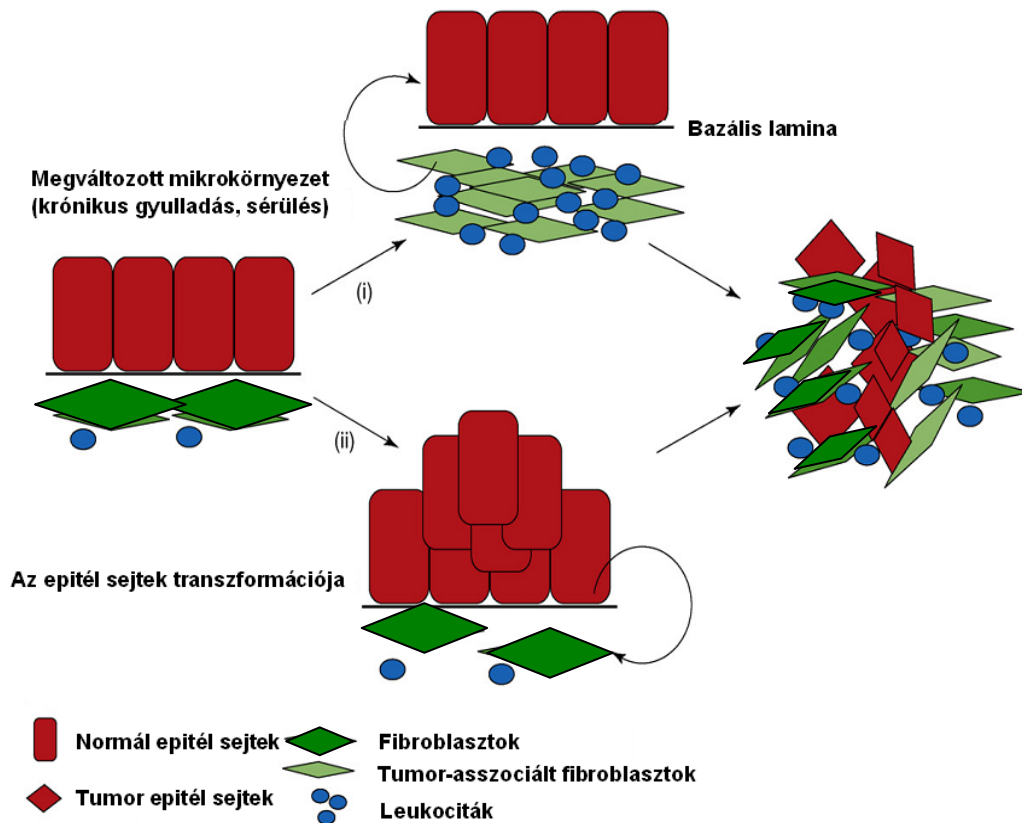
a malignus sejtek biológiai viselkedését, fokozzák a tumor sejtek áttétképzését és elősegítik a daganat neo-angiogenezisét.



II. 1. ábra: A tumort, ill. a tumor sztrómát felépítő különböző sejtípusok sematikus, valamint szövettani metszeteken történő általános bemutatása. Az adott, tumor sztrómát felépítő elemek mellett zárójelben a rájuk jellemző markert adtuk meg, mely alapján az immunfestést elvégezték. Készült [6] nyomán.

A tumor sztróma kialakulása, a daganat sejteket körbevevő kötőszöveti sejtek aktivált állapota a rákos elfajulással párhuzamosan jön létre, azonban a sztróma sejtekben végbemenő genetikai elváltozások még vita tárgyát képezik [7].

Kétféle elméleti modellt írtak le a tumor és sztróma sejtek ko-evolúcióját illetően epitel eredetű tumorok esetén [8]. Az egyik elmélet szerint, a tumor sztróma elemekben, különösen a tumor-asszociált fibroblasztokban (II. 2. ábra) megjelenő elváltozások támogatják az epitel sejtek osztódását (i), mások szerint a tumorosan transzformált sejtek parakrin módon befolyásolják a sztróma állapotát. (ii).



II. 2. ábra: A tumor és a tumor sztróma sejtek ko-evolúcióját bemutató sematikus ábra. Magyarázat a szövegben. Készült [8] nyomán.

Annyi azonban bizonyos, a tumor sejtek és a tumor mikro környezetében lévő sejt, valamint extracelluláris elemekben (kollagének, lamininek, proteoglikánok, fibronektinek, hialuronsav) lokálisan feldúsult jelátviteli molekulák között intenzív szignalizációs folyamatok zajlanak le [8,9].

A tumor-asszociált fibroblasztok egyik forrása a csontvelő, ill. a szövetekben lévő rezidens mesenchymalis őssejtek [10,11].

II. 2. A mesenchymalis őssejtek általános jellemzése

A mesenchymalis őssejtek vagy sztrómális sejtek (MSC-k) olyan multipotens progenitor sejtek, melyek mezodermális szövetek sejtjeivé, azaz csonttá, porcsejtté, zsírsejteké és csontvelő kötőszövvé képesek differenciálódni, valamint a vérképző őssejtek érését és osztódását serkentő növekedési faktorokat termelnek [12]. Leggyakrabban csontvelőből izolálják, de számos magzati és felnőtt szövetből is kivonhatók a rezidens MSC-k [13–15]. A klinikumban egészséges önkéntesek

csontvelőmintáiból (allogén), köldökzsínór vérből [16] vagy zsírleszívásból származó zsírszövetből (allogén) [17] izolálnak mesenchymalis őssejteket. Autológ MSC sejtek a kezelendő beteg csontvelő vagy zsír szöveteiből is nyerhetőek, melyek autológ sejttérápia során használhatók.

Az ISCT (= International Society for Cellular Therapy) javaslata alapján az MSC-k definiálására a minimális kritériumok a következők [18]:

- standard tenyésztési körülmények között adherensek a szövettenyésztő edény felületéhez,
- CD44, CD73, CD90 és CD105 pozitívak, de CD34 CD45, CD14, CD11b, vagy HLA-DR negatívak, és
- csont-, zsír- és porcsejteké egyaránt képesek *in vitro* differenciálódni, ezt nevezzük az MSC-k plaszticitásának.

Az MSC-k egyik fő feladata a vérsejtek differenciálódásának segítése és szabályozása a csontvelőben [12]. Emellett jól jellemzett az MSC-k erőteljes *in vitro* és *in vivo* immunszuppresszív hatása, mely gyakorlatilag az immunrendszer minden sejtjén érvényesül. Ezen hatásukat képesek kifejteni többek között az allogén sejtek és mitogének által stimulált T-sejt-proliferáció gátlásával [19,20], a T-sejtek válaszképtelenségének [21] vagy apoptózisának [22] indukciójával, a citokinek termelésének módosításával [23] és a dendritikus sejtek érésének és antigén prezentációjának gátlásával [24,25]. Az MSC-kről ezen kívül kimutatták, hogy meghosszabbítják a bőrtranszplantátumok túlélését [19] és csökkentik a kísérleti állatmodellekben előidézett sclerosis multiplex [26,27], kollagén indukált arthritis [28], és I típusú diabetes [29,30] tüneteit. Még fontosabb, hogy az MSC-k infúziójának jótékony hatása volt allogén csontvelő átültetésen átesett rosszindulatú hematológiai betegek szteroid-rezisztens graft-versus-host betegségének kezelésében [31].

A fent leírtak szerint az MSC-k szabályozzák az immunválaszt, mégpedig a Th1-es citotoxikus T-sejtek és a NK sejtek funkciójának gátlásával [27,32], tehát erős gyulladáscsökkentő hatással rendelkeznek. Bár az MSC-k ezen hatásainak pontos mechanizmusa még feltárára vár, az irodalmi adatok alapján a közvetlen sejt-sejt kölcsönhatásnak és a szolúbilis faktoroknak szerepe van. Az MSC által termelt szolúbilis faktorok, a hepatocita növekedési faktor (HGF), transzformáló növekedési faktor- β (TGF- β) [20] a prosztaglandin E2 (PGE2) [23], indolamin-2,3-dioxigenáz (IDO) [33], nitrogén-monoxid (NO) [34], szolúbilis HLA-G [35] és az IL-10 [36] mindannyian gyulladáscsökkentő mediátorok. Az MSC-k és az immunsejtek közötti

párbeszéd végeredményben szintén az MSC-k gyulladáscsökkentő funkciójára hat: az aktivált T-sejtek és az NK sejtek gyulladáscsökkentő citokineket, IFN- γ -t és TNF- α -t termelnek, melyek aztán úgy hatnak az MSC-kre, hogy azok PGE2-t, egy T-sejt-osztódást gátló faktort választanak ki. Az IFN- γ ezenfelül az MSC-kIDO expresszióját is serkenti, melynek eredményeképpen triptofán hiány, illetve a triptofán metabolitjainak növekedése alakul ki, gátolva a T és NK sejt osztódást [37,38]. Mindazonáltal a jelenlegi ismereteink szerint nem valószínű, hogy az MSC-k által termelt faktorok bármelyike egyedül lenne felelős az *in vitro* vagy *in vivo* immunszuppresszív hatásért.

II. 2. a. Az MSC-k tumor fejlődésben betöltött szerepe

A sebgyógyulás molekuláris és sejtes mechanizmusa, valamint a tumor fejlődés között számos közös pont van: gyulladáscsökkentő citokinek termelődnek, megnő az érfal permeabilitása, fibrin felhalmozódás történik, új vérerek alakulnak ki, fibroblasztok aktiválódnak stb. [39]. A szöveti és a csontvelői mesenchymalis őssejtek részt vesznek a szöveti megújulás, ill. szöveti regenerációs folyamatokban [12], sőt a fibroblasztok előalakjának is tekinthetők [40,41]. Amint sebzett vagy tumoros állatokban kimutatták, a véráramba kívülről bejuttatott MSC-k a sebekbe, sérült szövetekbe és tumorokba vándoroltak [42,43]. Számos faktort azonosítottak, melyek szerepet játszanak az MSC-k tumoros területre történő vándorlásában, ezek a VEGF, TGF- β 1, IL-8, NT-3 [44,45], EGF, HGF, FGF, PDGF [46,47] és MCP-1 (monocita kemotaktikus fehérje) [48]. Sőt, kimutatták, hogy szilárd tumorokra jellemző alacsony oxigén tenzió (hipoxia) hatására stabilizálódó és felhalmozódó HIF-1 α is elősegíti az MSC-k mobilizálódását a csontvelőből a perifériás vérbe [49], ahonnan a tumoros területre vándorolnak [11,50,51]. Tumoros környezetben az MSC-k különböző, szolúbilis tumor növekedést serkentő faktorok termelése révén, vagy önmaguk sztróma sejtekké (pl. tumor-asszociált fibroblasztok) differenciálódása által részt vesznek a rák pathogenezisében [11], ahol serkentik a tumor növekedést és az áttétképződést [52].

A mesterségesen előidézett tumoros állatmodellekben exogén MSC-k beadásával nyerték a kísérleti adatokat, de a multipotens sejtek beoltásakor mindig felvetődik a kérdés, hogy okozhatnak-e tumort. Rubio és mtsi. arról számoltak be, hogy az *in vitro* fenntartott emberi MSC-k spontán tumoros transzformáció mentek keresztül

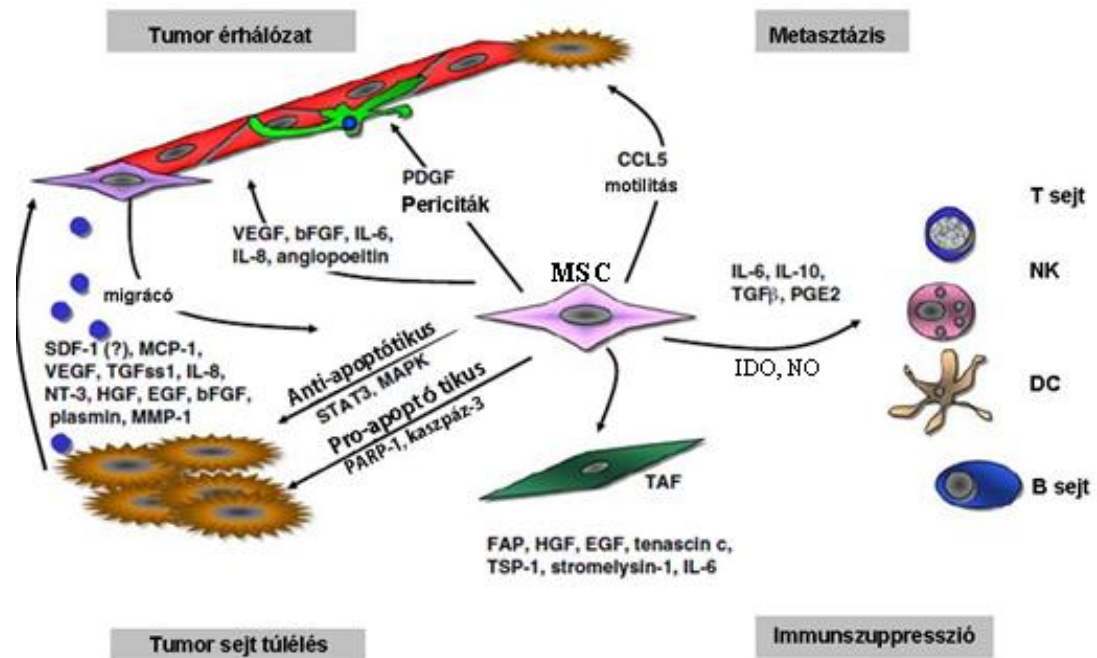
és immundeficiens egerekbe oltva tüdő, máj, vese, agy, szív stb. daganatok kialakulását iniciálták [53]. Rosland és mtsi. is leírták a humán MSC izolátumok malignus transzformációját, amelyek immundeficiens egerekben tüdő daganatokat okoztak [54]. Azonban a fenti kutató csoportok eredményeik revidálására kényszerültek, ugyanis bebizonyosodott, hogy az általuk használt MSC kultúrák humán HT1080 fibroszarkóma és U-2 OS oszteoszarkóma tumor sejtvonalakkal voltak szennyeződve [55,56].

A beoltott MSC-k tumor fejlődésre gyakorolt hatása még vitatott terület. Egy, a közelmúltban megjelent átfogó tanulmányban összefoglalták a tumor serkentő és gátló hatásukat leíró vizsgálatokat [57]. Például a Kaposi-szarkóma *in vivo* állatmodelljében az intravénásan bejuttatott humán MSC-k a tumorba vándoroltak és jelentősen gátolták a tumor növekedést (Khakoo és mtsi. 2006). Egy másik egér modellben az egér eredetű MSC-k gátolták a Lewis tüdő karcinóma növekedését és B16 melanómában a tüdőáttétek számát [58]. Más vizsgálatok kimutatták, hogy a csontvelő-eredetű őssejtek egerekben támogatják a tumor növekedést: amikor a tumor sejtekkel együtt MSC-t is oltottak, a fejlődő tumor intenzívebb vaszkularizációt, kiterjedtebb nekrozist és magasabb áttétképződési rátát mutatott, mint az MSC nélkül oltott tumorok (Zhu W és mtsi. 2006). Klopp és mtsi. megállapították, hogy számos tényező, körülmény befolyásolhatja az MSC-k tumor fejlődésre kifejtett hatását: például a kísérleti állatok életkora, melyből az MSC származik, az izolált MSC-k belső heterogenitása. Az adott kísérletben alkalmazott tumor modellek és a kísérleti állatok típusa (normál immunválaszra képes vagy SCID egerek) vagy az MSC beadásának módja (bőr alá vagy intravénásan) mind befolyásolhatják az MSC tumor fejlődésre gyakorolt hatását.

II. 2. b. MSC-k a tumor immunprivilegiumban, vaszkularizációban és metasztázis képzésben

Az is intenzív vita tárgya, hogy mi a beoltott MSC-k további sorsa a tumoros szövetekben. Az egyik álláspont szerint az MSC-k, mint multipotens sejtek, a tumor sztrómális elemek, a tumor-asszociált fibroblasztok [10], érendotélium [59] és sima izom [60] egyik sejtjes alapját képezik. Más közlemények viszont amellet érvelnek, hogy az MSC-k nem lokalizálódnak stabilan a tumorban, hanem azáltal befolyásolják a tumor genezist, hogy különböző immunszuppresszív (TGF- β , IDO, IL-10, PGE2) [32,38], érképzést segítő (VEGF, PDGF, FGF) [61], vagy metasztatikus (CCL5) [62,63] faktorokat termelnek.

A mesenchymalis őssejt eredetű tumor-asszociált fibroblasztok (TAF), a tumor mikro környezetében lévő meghatározó elemek, melyekre jellemző, hogy α SMA-t, FSP-t, vimentint, FAP-t termelnek és több ponton elősegítik a daganatok fejlődését (II. 3. ábra) [10,64,65]:



II. 3. ábra A primer daganatokban az MSC-k és tumor sejtek közötti kölcsönhatásokat bemutató sematikus ábra. Magyarázat a szövegben. Készült [65] nyomán.

(1) MSC hatása a tumorspecifikus immunválaszra: Az MSC-k tumor növekedést támogató tulajdonsága részben magyarázható az MSC-k immunszupresszív hatásával, és így a tumor specifikus immunválasz gátlásával. Az MSC-k különböző mediátorok: IDO, IL-10, NO, PGE2 termelése által az immunrendszer sejtjeinek széles spektrumán (T- és B-sejtek, NK-sejtek, dendritikus sejtek) fejtenek ki immunszupresszív hatást [32]. Ezt az elgondolást támogatja az az eredmény, amely szerint allogén recipiensben a B16 melanóma csak akkor volt képes növekedni, ha egyidejűleg MSC-t is oltanak a tumor sejtekkel együtt [66]. Az is alátámasztja a tumor-asszociált fibroblasztok részvételét a tumor fejlődésben, hogy, ha a rájuk jellemző fibroblaszt aktivátor fehérje (FAP) ellen vakcináltak, megnőtt a 4T1 emlő karcinómás egerek túlélése és a doxorubicin kemoterápia hatékonysága [67]

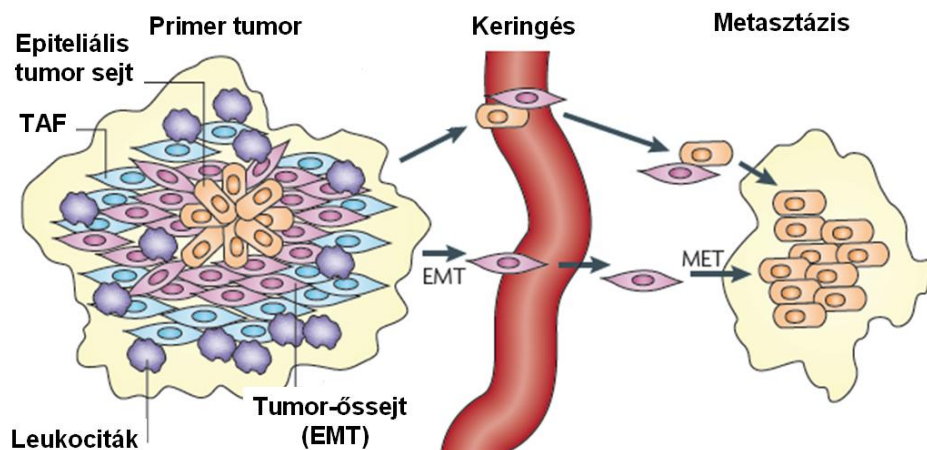
(2) MSC hatása a tumor vaszkularizációra: Az MSC-k a tumor szövetek [68–70] vaszkularizációját serkentik, amely alapvető fontosságú folyamat a tumor fejlődésben.

Az MSC transzdifferentiálódhatnak az erek felépítésében szerepet játszó perivaszkuláris pericitákká, endotél sejtekké és emellett számos szolúbilis angiogén faktort termelnek (II. 3. ábra) [65]. A VEGF a tumor sejtekből is felszabadul, mely elősegíti az MSC-k tumorba történő vándorlását, az MSC-k PDGF receptorán keresztüli aktiváció pedig az MSC-k endotél irányú differenciálódásához vezethet [71,72].

(3) MSC hatása a tumor sejtek túlélésére: A tumor-asszociált fibroblasztok tumor sejtek túlélésére gyakorolt pro- ill. anti-apoptotikus hatását is leírták. Ezt az ellentmondást az egyes tumor modellek és az MSC izolátumok eredetében és differenciáltsági fokában rejlő különbözőségnek tulajdonítják [65].

(4) MSC hatása a tumor áttétképzésére: Az emlő karcinóma sejtekből felszabaduló osteopontin hatására az MSC-k a CCL5 (RANTES) kemokint termelik [63], mely fokozza a tumor sejtek migrációját, invazivitását és ezáltal áttétek képzését [62]. A csontvelői MSC-k, ill. a tumor mikro környezetében lévő TAF-ok SDF-1 (CXCL12) – et termelnek, ez a sztróma eredetű faktor a tumor sejtek felszínén lévő CXCR4 receptorhoz kötődik, elősegíti a tumor sejtek szóródását, túlélését, a csontvelőbe lépését és az endotél sejtek aktiválása által a daganat neo-angiogenezisét [64,73,74].

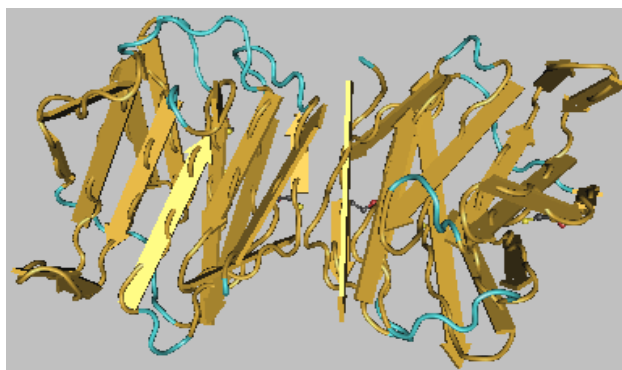
Az epitheliális eredetű daganatokban, mint pl. emlő vagy vastagbél karcinóma, leírták az epitheliális-mesenchymalis transzformáció (EMT) jelenségét, melynek során az epitheliális eredetű sejtek elveszítik sejt-sejt kapcsolataikat, sejt-polaritásukat és átrendeződik a citoszkeleton felépítése is. Az áttétképző, migráló tumor sejtek a szervezet távolabbi, disztális pontjain kitapadnak és mesenchymalis-epitheliális transzformáció (MET) révén visszaalakulnak (II. 4. ábra) [75]. Kimutatták pl. emlő karcinóma esetén, hogy az MSC-k ismeretlen módon elősegítik az epitheliális tumor sejtek mesenchymalis irányba történő transzformációját [76]. Az epitheliális-mesenchymalis átalakulás, miközben elősegíti az áttétek kialakulását, a daganaton belüli heterogenitás fokozása révén rontja a daganatok kemoterápiás válaszkészségét [77].



II. 4. ábra Az epiteliális és mesenchymalis állapotok közötti átmenet sematikus ábrázolása karcinóma progressziója során. Magyarázat a szövegben. Készült [75] nyomán.

II. 3. A Gal-1 általános jellemzése

A galektin-1-et, mint egy β -galaktozid kötő proteint, hemagglutinációs aktivitása alapján először Teichberg és mtsi. azonosították 1975-ben az elektromos angolna elektromos szervéből [78], majd rövidesen kimutatták borjúszív és tüdő [79] szövetből, valamint csirke embrióból [80]. A monomer proteint 135 aminosav építi fel, molekulatömege 14,5 kDa, globuláris szerkezetét egy 6-szálú és egy 5-szálú antiparalell β -lemez hozza létre, minden gerinces számos szövetében expresszálódik és rendkívül konzervált. A Gal-1 koncentráció függő módon dimerizációra képes, mely az N és C-terminális aminosavakon keresztül történik [81] (II. 5. ábra).



II. 5. ábra A galektin-1 dimer szerkezete
(forrás:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure>)

A Gal-1 hatásában nagyfokú pleiotrópia érvényesül: például a mioblasztnak miotubulusokká való összerendezése során gátolja az izomsejtek ECM-hez kötődését

(anti-adhéziós hatás) [82,83], ellenben a szagló neuronok axon növekedésében a Gal-1-ECM kötődés révén (adhéziós hatás) elősegíti az axon növekedését [84,85]. Annak ellenére, hogy tipikusan citoplazmatikus proteinek jellemzőit mutatja - N terminálisa acetilált, nem glikozilált, natív konformációja redukáló környezetet igényel és nem rendelkezik a szekrécióhoz szükséges szignál peptiddel [86] - ismeretlen, az ER/Golgi klasszikus útjától eltérő módon szekretálódik [87]. Intracelluláris lokalizációja (citoplazma és/vagy sejtmag) során szerepe lehet a pre-mRNS-ek érésében [88,89], valamint a mutáns H-Ras sejtmembránhoz történő rögzítésében és aktiválásában [90,91].

Termelődését különféle egészséges szövetben, izomsejtekben, tímuszban, nyirokszervekben, lépben, fejlődő agyban, retinában, testisben, májban, placentában [92] és a legtöbb tumorban kimutatták [93].

A Gal-1 számos fiziológiai és patológiai folyamatban részt vesz: sejt adhézió, sejt növekedés szabályozás [94], immunomoduláció [95], apoptózis [96–98], reprodukció [99].

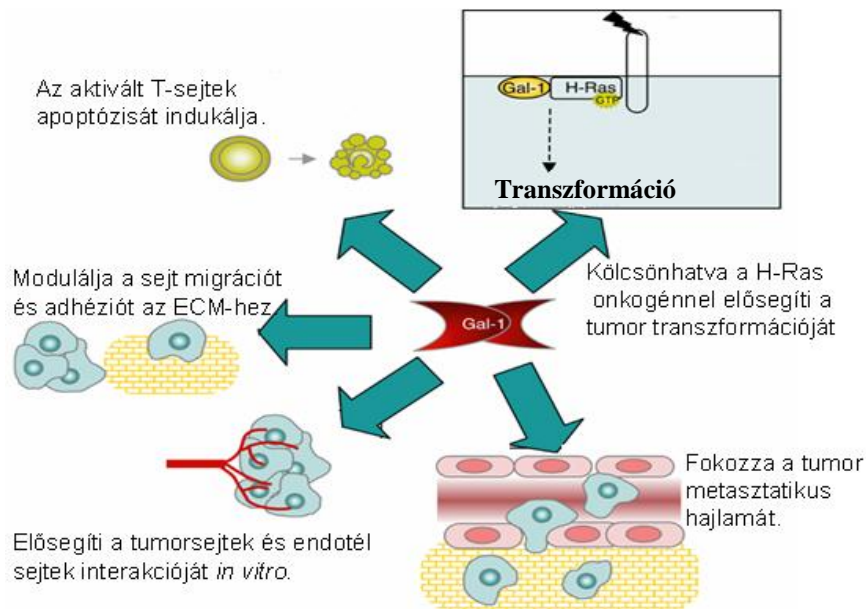
A Gal-1 sokrétű biológiai funkcióját meghatározza szabályozott szöveti és időbeli expressziója. Részt vesz az immunhomeosztázis fenntartásában azáltal, hogy az aktivált perifériális T-limfociták apoptózisát okozza, így endogén gyulladáscsökkentőként hozzájárul az immunválasz lecsengéséhez. Gyulladásgátló hatása abban is érvényesül, hogy a gyulladásos Th1-es T-sejt választ a Th2 sejtek aktivitása felé tolja és ezáltal gátolja a gyulladásos citokinek - INF- γ , IL-2, IL-12, TNF- α – termelődését [100]. Bizonyos autoimmun betegségekben ill. krónikus gyulladásban szerepet játszhat ennek a mechanizmusnak a károsodása, ugyanakkor a Gal-1 fehérje immunszuppresszív hatását felhasználva hatékony kezelési lehetőséget nyújthat [101]. Ezt igazolják a kísérletes autoimmun/gyulladásos betegségekben: myasthenia gravis, kísérletes autoimmun encephalomyelitis, graft versus host betegség, Con-A indukált hepatitis, rheumatoid arthritis állatmodellekben kapott eredmények, melyekben a Gal-1 alkalmazása megszüntette, vagy jelentősen csökkentette a betegségek klinikai tüneteit [102].

II. 3.a. A Galektin-1 tumor fejlődésben betöltött szerepe

A Gal-1 termelődése a legtöbb rákos szövetben kimutatható. A tumor sejtek és/vagy a tumorról asszociált sztrómális sejtek, a kötőszövet és/vagy endotél sejtek

magas Gal-1 termelését mutatták ki pl.: emlő és vastagbél daganatban [103–105], fej-nyak pikkelyes karcinómában [106], petefészekrákban [107], húgyhólyag karcinómában [93,108], gliómában [109], pajzsmirigy karcinómában [110], hasnyálmirigyrákban [111], prosztatarákban [112], vesesejtes karcinómában [113], tüdőrákban [114]; emlőtumor sztróma sejtekben [105,115,116], tumor endotéliumban [117]. Az irodalmi adatok szerint a Gal-1 mennyisége a tumor metasztatikus hajlamával és a betegség rossz prognózisával jelentős korrelációt mutat [102].

A tumor, ill. tumor sztróma eredetű Gal-1 hozzájárul a rákos sejtek védettségéhez a tumorspecifikus immunválasszal szemben azáltal, hogy a tumorszövetbe vándorló T-sejtek apoptózist okozza (II. 6. ábra) [96–98] ennek a folyamatnak a részletes molekuláris mechanizmusát csoportunkban tártuk fel [97,98,118].



II. 6. ábra A galektin-1 hatásai rákban
Magyarázat a szövegben. Készült [91]nyomán.

A Gal-1 a rákos sejtek áttétképzésének számos lépésében részt vehet. Immunszuppresszív faktorként sejt-sejt kapcsolódás által, illetve az ECM komponensekhez kötődve lokálisan feldúsulva az aktivált T sejtek migrációját gátolja és azok apoptózist okozza, fokozza a tumor sejtek migrációs képességét, majd kikapadását, és hozzájárul a hipoxia indukált angiogenezishez [102,119].

Gal-1-hez kötődő diszacharidok, laktobionsav és tiodigalaktózid (TDG), segítségével kevert limfocita kultúrában gátolni tudták a Gal-1 T-sejtekre kifejtett proliferációt gátló hatását, sőt *in vivo* TDG kezelés fokozta egy emlő tumor vakcina

hatékonyságát azáltal, hogy megnőtt a tumoros egerek túlélése [120]. Bahn és mtsi. a tumor sejtek által termelt Gal-1 kulcsszerepéről számoltak be. *In vivo* egér modellben kimutatták, hogy Lewis tüdő karcinóma (LLC) sejtek Gal-1 szintjének csökkentése lassabb tumor növekedést és a tüdő metasztázisok hiányát eredményezte a vad típusú LLC sejtekhez képest. Azonban a vad típusú tumor sejtek vad típusú és Gal-1 knock-out egérben hasonló kinetikával növekedtek és hasonló mértékű tüdő metasztázist okoztak, ami a tumor sejt eredetű és nem az endogén Gal-1 funkciójára mutat rá. A tumor eredetű Gal-1 apoptotikus hatású volt a CD4⁺ és CD8⁺ T-sejtekre, mely ebben a tanulmányban a Gal-1 angiogén hatásánál jelentősebbnek bizonyult [121]. Hasnyálmirigy csillagsejtjeiről is leírták, hogy Gal-1 függő módon a CD4⁺ és CD8⁺ T-sejtek apoptózist okozzák, mely hasnyálmirigyekben hozzájárul a tumor immunprivilegiumának kialakításához és fenntartásához [122]. A Gal-1 expresszió gátlása egér B16 melanóma modellben a daganatok méretének csökkenését eredményezte tumorspecifikus Th1-es effektor válasz kifejlődése által [123]. A Gal-1 csendesített B16F10 melanóma sejtek temozolomid kemoterápiás szer iránti érzékenysége is megnőtt [124]. Emberi Hs683 glióma sejtvonalban a Gal-1 fehérje szintjének csökkentése gátolta az angiogenezist és fokozta a xenograftok temozolomid kemoterápiás szerre adott válaszkésztségét [125]. Emberi szájüregi pikkely sejt karcinómából izolált tumor-asszociált fibroblasztok Gal-1 szintjének csökkentése az α -SMA, mint TAF-ra jellemző marker és az MCP-1, mint TAF eredetű metasztatikus faktor szintjének a csökkentéséhez vezetett. Ezeket a sejteket tumor sejtekkel együtt immundeficiens egérbe oltva lassult a tumor növekedés üteme, lecsökkent a keringésben lévő tumor sejtek száma és megnőtt az állatok túlélése a vad típusú TAF-fal oltott állatokhoz képest, igazolva a Gal-1 tumor növekedést serkentő funkcióját a TAF-ban [126].

II. 3.b. A Gal-1 és a tumor neo-angiogenesis kapcsolata

A daganatok növekedéséhez újonnan képződő vérerekre van szükség (neo-angiogenesis), melynek a közvetett kiváltója a hipoxiás környezet, közvetlen kiváltója pedig a hipoxiás környezetben aktiválódó faktorok, mint pl. a VEGF [3].

2005-ben egy speciális tömegspektrometriás eljárás segítségével először FaDu, humán légcső karcinóma sejteken, majd különböző tumor sejtvonalakon *in vitro* kimutatták a Gal-1 szintjének hipoxás környezetben történő emelkedését, melyet

Western blotting és polimeráz láncreakció segítségével is megerősítettek [119]. Majd *in vivo* SCID egereket transzplantáltak humán FaDu sejtekkel, melyeket hipoxia indukált promóter kontrollja alatt álló β -hCG-vel (β -humán chorion gonadotropin) transzfektáltak, majd az állatok egyik csoportját hipoxiás, a másikat normoxiás körülmények között tartották. A hipoxiás körülmények között tartott egerek szérumában a Gal-1 emelkedett szintje korrelált az egerek vizeletében megjelenő β -hCG szintjével. Fej-nyaki pikkely sejt karcinómában szenvedő betegek *ex vivo* tumor mintáiban a Gal-1 emelkedett szintje korrelált a hipoxiás markerként használt CA (szénsav anhidráz enzim) IX-cel [119]. Kimutatták, hogy a Gal-1 szintjének alacsony oxigén tenzió történő emelkedését a hipoxiára stabilizálódó HIF-1 α transzkripciós faktor okozza [127], mellyel a C/EBP α (CCAAT enhancer kötő fehérje) szinergista hatást fejt ki [128].

A galektin-1, mint hipoxiára aktiválódó faktor, tumorok angiogenezisében betöltött szerepét Arjan W. Griffioen csoportja kiváló tanulmányokban igazolta: *in vitro* a Gal-1 csendesített endotél sejtek migrációja és sejtosztódása csökkent [129]. Amikor *in vivo* kísérletekben vad típusú és Gal-1 hiányos (129P3/J) egereket oltottak szingén F9 teratokarcinóma sejtekkel, a Gal-1 deficiens egerekben a tumorok növekedése jelentősen lelassult, amit a szövettani vizsgálatok szerint azzal magyaráztak, hogy csökkent a tumorok mikroér denzitása. Ha vad típusú tumoros egereket anginex-szel kezeltek - mely a Gal-1-hez kötődő 33 aminosavból álló anti-angiogén szintetikus oligopeptid - csökkent tumor progressziót és kisebb mikroér denzitást tapasztaltak [129]. Gal-1 deficiens egerekben lassabb tumor növekedést és kisebb mértékű angiogenezist figyeltek meg, mely független volt a tumor típusától és a tumor sejtek Gal-1 termelésétől. ugyanis a magas Gal-1 expressziót mutató TC-1 tüdő karcinómával, és a korábban említett, Gal-1-et alacsony szinten termelő F9 teratokarcinómával hasonló eredményt kaptak. Az exogén Gal-1 hatására, a Gal-1^{-/-} endotél sejtek egy jelátviteli útvonal beindulását követően osztódtak, azonban a Gal-1 inhibitora, az anginex gátolta az endotél sejtek aktiválódását *in vitro* [130].

II. 3.c. Gal-1 szerepe a tumor sejtek adhézíós, migrációs és metasztázis képző folyamataiban

A Gal-1 az áttétképzés különböző folyamataiban vesz részt. Adhézíós szerepe révén elősegíti a tumor sejtek migrációját, a vér vagy nyirok erekbe való belépését (diapedézis) és a szervezet valamely pontján a megtapadásukat [90].

Humán csillagsejtes gliómában a Gal-1 emelkedett szintje szoros korrelációt mutatott a betegség előrehaladtával és ezzel összhangban a magasabb Gal-1 szintet mutató betegek hamarabb elhaláloztak. Emberi glióma xenograftok esetén megfigyelték, hogy a Gal-1 immunhisztokémiai festődése az invazív glioblasztóma sejtekben magasabb volt és a Gal-1 serkentette U373 glióma sejtek vándorlását *in vitro* kísérletekben [131]. A hasnyálmirigy adenokarcinóma sztrómájából származó hasnyálmirigy csillagsejtek termelte Gal-1 *in vitro* fokozta a tumor sejtek osztódását, rekombináns humán Gal-1 hatására pedig megnőtt a daganat sejtek migrációs képessége [132]. Májsejtes karcinóma sztrómájában is kimutatták a Gal-1 emelkedett szintjét, mely egyenesen korrelált a metasztázisok gyakoribb megjelenésével és a tumor sejtek véráramba lépésével [133]. Emberi emlő daganatos betegeknél kimutatták, hogy a tumor-asszociált sztróma sejtek Gal-1 szintje és az emlő daganatok nyirokcsomókba adott áttétképzése szorosan összefügg [105]. A kevésbé invazív szájüregi pikkely sejt karcinóma sejtekben a Gal-1 túltermelése az áttétképzés jelentős fokozódásával járt. Ezzel összhangban kimutatták, hogy Gal-1 hatására nőtt az MMP-9 és MMP-2 mátrix metalloproteázok expressziója és aktivitása, átrendeződött az aktin citoskeleton, nőtt a Cdc42 (Rho-GTPáz) aktivitása és ennek hatásaként a tumor sejtek filopodiumainak száma és hossza [134]. Humán szájüregi pikkely sejt karcinómából izolált tumor-asszociált fibroblasztok Gal-1 expressziójának csendesítése az MCP-1 termelés és a keringésben lévő tumor sejtek számának csökkenését eredményezte [126].

II. 4. Az MSC-ben termelődő Gal-1-gyel kapcsolatos eredmények

Az MSC-k ígéretes terápiás felhasználása különböző génexpressziós és proteomikai vizsgálatokat tett indokoltá. Először 2003-ban, majd 2004-ben az MSC-k génexpressziós vizsgálata során a Gal-1 mRNS-ét a leginkább kifejeződő gének között találták [135,136]. Ezt követően 2005-ben, egy proteomikai tanulmányban, biokémiai eszközökkel is kimutatták az MSC-ben termelődő, intracellulárisan és az ECM-ben

felhalmozódó Gal-1 fehérjét [137]. Immortalizált humán MSC-k extracelluláris mátrixában azonosított 50 angiogén faktor között is kimutatták a Gal-1-et, mely szükséges az endotél sejtek ECM-hez kapcsolódásához és tubulusok képzéséhez [138].

Beszámoltak az MSC termelte Gal-1 immunszuppresszív hatásáról is:

(1) siRNS segítségével Gal-1 csendesített MSC sejteket hoztak létre és bebizonyították, hogy az MSC-k Gal-1 függő módon gátolták a CD4⁺ és CD8⁺ T-sejtek osztódását és IL-2/anti-CD3 stimulált perifériás vér mononukleáris sejtek IFN- γ és TNF- α termelését [139].

(2) Az MSC neuropilin-1 által okozott T-sejt proliferáció gátlását anti-Gal-1 ellenanyaggal vagy szolúbilis rekombináns neuropilin-1 hozzáadásával meg tudták szüntetni [140].

(3) Ditiogalaktoziddal, mint a galektin-1 szénhidrát kötő régiójához kötődő szénhidrát hozzáadásával, megszüntették az MSC-k T-sejtekre irányuló osztódást gátló hatását [141].

(4) A Gal-1 fehérje expressziójának siRNS technika általi csökkentése gátolta az MSC-mediált T-sejt szuppressziót és egy másik kísérletben, a Gal-1-hez kötődő diszacharid, a β -laktóz szintén helyreállította az allogén T-sejtek válaszképességét [142].

Ezek az új eredmények *in vitro* rendszerben, egy-egy kiragadott sejtpopulációval kapcsolatos vizsgálatokban születtek és azt mutatják, hogy a Gal-1 expressziója és szekréciója az MSC-k immunmoduláló hatásának fontos komponense. Az MSC-eredetű Gal-1 *in vivo* tumor fejlődésre gyakorolt hatása még egyáltalán nem ismert.

III. Célkitűzések

Számos tanulmány ismert a mesenchymalis őssejtek (MSC) tumor fejlődésre gyakorolt hatásáról, a rendelkezésre álló adatok többsége szerint serkentik, és néhány közlemény szerint gátolják a daganatok fejlődését. A legújabb szakirodalmi eredmények alapján annyi azonban bizonyos, hogy nagyon sok paraméter (kísérleti állatok neme, életkora, törzse, az adott tumor modell, MSC izolátum eredete, beadás módja, mennyisége, stb...) befolyásolja az MSC-k rákban kifejtett szerepét.

A galektin-1 (Gal-1) fehérjéről ismert, hogy a tumor sejtek, ill. a tumor körüli sztróma elemek Gal-1 termelése nagyban hozzájárul a betegség rossz prognózisához. A tumor eredetű Gal-1 elősegíti az aktivált T-sejtek apoptózisát és ezáltal a daganatok immunprivilegiumát; valamint szabályozza a daganatok hipoxia indukált erezettségét és áttétképzését.

2003 óta ismert, hogy az MSC-k jelentős mennyiségű Gal-1-et termelnek, azonban a Gal-1 funkcióját ezekben a sejtekben csak korlátozottan vizsgálták. A legújabb vizsgálatok is csak az MSC eredetű Gal-1 *in vitro* immunszuppresszív hatását azonosították. Az MSC-k tumor fejlődésre gyakorolt hatása és az ebben a folyamatban részt vevő faktorok, - mint az MSC- eredetű Gal-1-, nagy része még ismeretlen. Ezért a következő feladatokat és kérdéseket fogalmaztuk meg:

- 1.) Célunk volt, hogy megvizsgáljuk, hogy állatmodellben a tumor sejtekkel együtt adott csontvelői mesenchymalis őssejtek által termelt Gal-1 befolyásolja-e a primer tumorok növekedését, erezettségét és a metasztázisok gyakoriságát?
- 2.) Az MSC-k termelte Gal-1-nek milyen hatása van a tumorok növekedésének gyakoriságára (incidenciájára) és a tumoros állatok túlélésére?
- 3.) Hogyan választható szét az MSC- és tumor sejt-eredetű Gal-1 hatása a tumor fejlődés során?

IV. Anyagok és módszerek

IV. 1. Az MSC-k izolálása

A mesenchymalis őssejteket a korábban leírtak szerint izoláltuk [143]. Röviden, 8-10 hetes, hím C57Bl/6-os egerek comb- ill. sípcsontjából szövettenyésztő médiummal (DMEM 10% magzati borjú szérum, 10% ló szérum (Invitrogen), 50 U/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin (Sigma-Aldrich) és 2 mM L-glutamin (Invitrogen), 5 U/ml heparin) kimostuk a csontvelőt. A sejteket kétszer mostuk Hank's pufferben, majd $2-5 \times 10^6$ sejt/cm² sűrűségben 25 cm²-es szövettenyésztő flasksra (BD Falcon) szélesztettük, és 37 °C-on, 5% CO₂ tartalmú, párasított inkubátorban tartottuk. A le nem tapadó sejteket a médium hetente kétszer történő cseréjével eltávolítottuk. Miután az MSC-k elérték a 70-90%-os fedettséget, a kultúrát kétszer mostuk PBS-sel, majd átoltásra kerültek, felszedésük 37 °C-on 5 percig 0,25%-os tripszin tartalmú 1 mM EDTA-val történt. A sejteket 75 cm²-es szövettenyésztő flasksra (BD Falcon) szélesztettük, majd tovább tenyésztettük. Az MSC izolátumok a 6-7. átoltásig tartalmaztak hematopoetikus (CD34⁺, granulocita-makrofág kolónia formáló) sejteket. Az MSC alapkultúrákat Dr. Uher Ferentől (Országos Vérellátó Szolgálat) kaptuk.

IV. 2. Emlős sejtkultúrák fenntartása

Az egér B16F10 melanóma [144] és 4T1 emlő karcinóma [145] sejteket penicillin/streptomocinnal (100 IU és 100 µg/ml), L-glutaminnal (2 mM) és 10% újszülött borjú szérummal (FCS, Gibco, Invitrogen) kiegészített RPMI-1640 (Gibco, Invitrogen) szövettenyésztő médiumban növesztettük. A H5V [146] sejteket és az egér MSC-eket penicillin/streptomocinnal, L-glutaminnal (2 mM) és 10% FCS-sel kiegészített DMEM médiumban tartottuk fenn. A sejtvonalakat 5% CO₂-ban 37 °C-on inkubátorban helyeztük el.

IV. 3. Áramlási citofluorimetriás vizsgálatok

Az MSC sejtfelszíni markerek jellemzését áramlási citofluorimetriával, FACSCalibur készülékkel (Beckton Dickinson) végeztük. A sejteket (2×10^5 sejt/minta)

immunfluoreszcencia (FACS) pufferben (ld. *pufferek, oldatok*) szuszpendáltuk. Vad típusú (vtMSC), és Gal-1 knockout ($MSC^{Gal-1^{-/-}}$) MSC-ket, valamint Gal-1 specifikus kis gátló RNS (siMSC) vagy kontroll, véletlen nukleotid sorrendű RNS (scMSCs) transzfektált MSC-ket jelöltünk elsődleges anti-CD34 FITC és anti-CD44, CD73, CD90, Sca-1, R-PE konjugált monoklonális ellenanyagokkal (BD Pharmingen), 20 percig 4 °C -on. A CD3ε, CD11b CD45R, Ly-6G, TER-119 markereket biotinilált elsődleges ellenanyaggal (BD Pharmingen), majd sztreptavidin-R-PE konjugátummal (Sigma-Aldrich) inkubáltuk 20-20 percig 4 °C-on, és áramlási citofluorimetriával analizáltuk a mintákat. A kiértékelést CellQuest programmal végeztük el (Beckton Dickinson).

IV. 4. Az MSC-k differenciálata

Az oszteogén differenciálatast konfluens MSC kultúrában végeztük, a sejteket két hétig dexametazonnal (10^{-8} M), β-glicerofoszfáttal (10 mM), és aszkorbinsavval (0,3 mM) (Sigma-Aldrich) kiegészített tápfolyadékban tartottuk. A kalcium felhalmozódását Alizarin Vörös S (Sigma-Aldrich) festékkel tettük láthatóvá, a háttérfestést Giemsa (Fluka Chemicals) festékkel végeztük. Olympus CKX41 inverz fénymikroszkóppal és Olympus Camedia C-5060 kamerával fényképeztük a mintákat.

Az adipogén differenciálatast is konfluens MSC kultúrában végeztük, a sejteket egy hétig dexametazonnal (10^{-7} M) és 3-izobutil-1-metilxantinnal (0,5 mM) (Sigma-Aldrich) kiegészített tápoldatban tartottuk. A sejteket 8% formalinban (Reanal) fixáltuk és a zsírcseppeket Oil Vörös O festékkel (Sigma-Aldrich) tettük láthatóvá, háttér festést metilén kézzel végeztük (Sigma-Aldrich). Olympus CKX41 inverz fénymikroszkóppal és Olympus Camedia C-5060 kamerával fényképeztük a mintákat.

A különböző MSC-ket a dolgozatban a következő módon jelöltem: vad típusú C57BL/6 egerből izolált MSC = vtMSC, B6.Cg-*Lgals1*^{tm1Rob}/J Gal-1^{-/-} egerből izolált MSC = $MSC^{Gal-1^{-/-}}$, Gal-1 specifikus kis gátló RNS transzfektált MSC = siMSC vagy kontroll, véletlen nukleotid sorrendű RNS transzfektált MSC = scMSC.

IV. 5. Az MSC-k Gal-1 siRNS transzfekeciója

A galektin-1 fehérje csendesítését már egy korábbi közleményünkben leírtak szerint végeztük el [147]. Az siRNS és sc(scrambled)RNS-t pSuperior RNAi

rendszerrel MSC sejtvonalba klónoztuk és így Gal-1-csendesített és scRNS-sel transzfektált kontroll sejteket kaptunk.

A következő primereket használtuk:

mGalec340siU:

5'-GATCCCCACATGGAGGCCATCAACTATTCAAGAGATAGTTGATGG
CCTCCATGTTTTTTA

mGalec340siL:

5'-AGCTTAAAAACATGGAGGCCATCAACTATCTCTTGAATAGTTGA
TGGCCTCCATGTGGG

mGalec340scU:

5'-GATCCCCACGAACAAATGCACGTGTTTCAAGAGAACACGTGCAT
TTGTTTCGTGTTTTTA

mGalec340scL:

5'-AGCTTAAAAACACGAACAAATGCACGTGTTCTCTTGAAACACGTG
CATTGTTTCGTGGGG

Galec120siU:

5'-GATCCCCAACCTGTGCCTGCACTTCATTCAAGAGATGAAGTGCAG
GCACAGGTTTTTTTA

Galec120siL:

5'-AGCTTAAAAAACCTGTGCCTGCACTTCATCTCTTGAATGAAGTGC
AGGCACAGGTTGGG

Galec120scU:

5'-GATCCCCCGTACACATACTTGCGCTTTCAAGAGAAGCGCAAGTAT
GTGTACGTTTTTA

Galec120scL:

5'-AGCTTAAAAACGTACACATACTTGCGCTTCTCTTGAAAGCGCAAG
TATGTGTACGGG

A primerek elnevezésénél a rövidítések a következők:

si: rövid interferáló hajtú-RNS („short interfering hairpin RNA”) egér eredetű galektin-1 ellen; Galec: galektin-1; sc scrambled (kontroll a megfelelő siRNS-hez); U: felső szál; L: alsó szál; 340 és 120: annak a nukleotidnak a pozíciója, melytől a 19bp oligonukleotid kezdődik. A primerek tervezéséhez az emberi Gal-1 (GenBank hivatkozási szám BC020675.1) és az egér Gal-1 (GenBank hivatkozási szám NM_008495.2) mRNS szekvenciákat használtuk fel.

A transzfektált MSC-eket G418 antibiotikumon szelektáltuk és stabil sejtvonalakat hoztunk létre. Ezek Gal-1 termelését Western blottinggal jellemeztük. Ezenkívül meghatároztuk, hogy megtartják-e MCS jellegüket az MSC markerek expresszióját és csont-, illetve zsírsejtté való differenciálódásukat tekintve.

IV. 6. Egér tumor modell rendszer

Nyolc-tíz hetes nőstény Balb/C egereket ortotopikusan 4T1 emlő karcinóma sejtekkel és hím C57BL/6 vagy Gal-1 hiányos B6.Cg-*Lgals1*^{tm1Rob}/J (törzs: 006337, Jackson Laboratory) egereket a jobb horpaszba, bőr alá B16F10 melanóma sejtekkel, oltottunk. A Gal-1 hiányos (MSC^{Gal-1^{-/-}}) vagy a különböző mennyiségű Gal-1 termelő MSC-eket (vtMSC, scMSC, siMSC) együtt oltottuk a tumor sejtekkel az adott kísérletnél leírtak szerint. A kísérleti állatokat egyedül vagy azonos nemű alomtársaikkal együtt tartottuk, vízhez és táphoz szabadon hozzáfértek. Az állatkísérleteket a hatályos jogszabályoknak megfelelően, állatkísérleti engedély birtokában végeztük.

A tumorokat a következő makroszkopikus paraméterek szerint vizsgáltuk: 1) Egy tolómérő segítségével legalább hetente kétszer mértük a tumorok méretét, melynek térfogatát (cm³) a következő képlet szerint számoltuk ki: $d^2 \times D \times 0.5$ [123], ahol d és D a kisebb, ill. a nagyobb átmérők. 2) A tapintható tumorok megjelenésének gyakoriságát (incidencia) a kísérleti állatok napi megfigyelésével állapítottuk meg. 3) Az állatok kialtatását követően a primer tumorokat és a legfőbb metasztatikus szervet, a tüdőt min. 48 óráig 4%-os formaldehidben (Molar Chemicals) fixáltuk, majd megmértük a tömegüket. 4) A tüdők felszínén lévő metasztatikus nodulusokat sztereomikroszkóp (Leitz Wetzlar) alatt számoltuk meg. 5) A kísérleti egerek túlélését Kaplan-Meier analízis szerint értékeltük.

IV. 7. SDS gél-elektroforézis és Western blot analízis

A sejteket (10⁷) lízis pufferben (1 ml) (ld. *pufferek, oldatok*) tártuk fel, a sejtmagokat és törmeléket 13000 rpm centrifugálással eltávolítottuk. A sejtlizátumot ugyanakkora mennyiségű, kétszeres töménységű redukáló SDS minta pufferrel (ld. *pufferek, oldatok pont*) elegyítettük és 12%- 17,5% -os grádiens SDS - poliakrilamid géltre (ld. *pufferek, oldatok*) vittünk fel 10⁵ MSC és 2x10⁵ 4T1 valamint B16F10 sejtéből készült mintát és pozitív kontrollként 100 ng rekombináns humán Gal-1-et (rhGal-1). A

fehérjék méret szerinti szétválasztása után a mintákat elektromos árammal transzfer pufferben (ld. *pufferek, oldatok*) nitrocellulóz membránra (Whatman[®] Protran[®]) transzferáltuk. A membrán szabad kötőhelyeit 1 órán át szobahőn 0,05% Tween 20-at tartalmazó 3% zselatinos (Sigma-Aldrich) TBS-ben (ld. *pufferek, oldatok*) telítettük. A Gal-1 kimutatásához a laboratóriumunkban készített nyúl poliklonális anti-Gal-1 ellenanyagot használtuk 1:2500 hígításban, felviteli kontrollként nyúl poliklonális anti β -aktin ellenanyagot alkalmaztunk (Abcam) 1:10000 hígításban. Az elsődleges ellenanyagokkal történt 1 órás 4 °C-os inkubációt követően a membránt TBS-Tween oldattal mostuk háromszor, majd HRP-vel kapcsolt anti-nyúl IgG-vel (DakoCytomation) kezeltük. Az immunreaktív fehérjéket ECL plus detekciós rendszerrel (GE Healthcare AmershamTM) röntgenfilmen exponálva (Agfa) tettük láthatóvá. A gélben maradt fehérjéket Coomassie festékes oldattal (*pufferek, oldatok pont*) festettük meg. Előre festett molekula markert (Fermentas, SM0671) használtunk a következő fehérjék molekulásúly szerinti azonosításához: monomer Gal-1 14,5 kDa, dimer Gal-1 29 kDa, β -aktin 43 kDa.

IV. 8. Szöveti vizsgálatok

A paraffinba ágyazott metszeteket elkészítését és a hematoxin-eozin festést (Sigma-Aldrich) az általános hisztológiai gyakorlat szerint végeztük el, a mintákat Carl Zeiss Axio Imager.Z1 mikroszkóppal vizsgáltuk meg és Carl Zeiss AxioCam MRc5 kamerával fényképeztük le.

A mikroér denzitást az AxioVision (AxioVs40 V 4.6.3.0 Copyright Carl Zeiss Imaging Solutions GmbH) szoftver segítségével, három független minta 10 véletlenszerűen kiválasztott, nem átfedő látómezőjében morfológiai alapon határoztuk meg. Egy mintában az erezett területek %-os nagysága, mikroér denzitása (MÉD) = 10 látómező átlagos erezett területe (μm^2) / látómező alapterülete (μm^2) x100. Az egyes minták relatív mikroér denzitása $\text{MÉD}^{\text{rel}} = \text{MÉD}^{(4\text{T1}+\text{MSC})} / \text{MÉD}^{4\text{T1}}$, ahol $\text{MÉD}^{(4\text{T1}+\text{MSC})}$ = a 4T1-el és MSC-vel oltott egerek mikroér denzitása a tumorban, $\text{MÉD}^{4\text{T1}}$ = a csak 4T1-el oltott egerek mikroér denzitása a tumorban. Három független minta relatív mikroér denzitásának átlagát ábrázoltuk grafikusán.

A tüdőben lévő metasztázis területeket (%) szintén az AxioVision (AxioVs40 V 4.6.3.0 Copyright Carl Zeiss Imaging Solutions GmbH) szoftver segítségével mértük meg: az összegzett makrometasztázisok területét (μm^2) elosztottuk a teljes tüdő

alapterületével(μm^2) x 100. A méréseket három független oltás mintáiban elvégeztük és egy kísérlet reprezentatív mintáit mutatjuk be.

A fagyasztott metszetek készítése során a tumorból kivágott mintát 4% formaldehidben min. 24 órát fixáltuk (Molar Chemicals), majd 30 percre szoba hőn 9% -os és 12 órára 4 °C -on 18%-os szacharóz (Sigma-Aldrich) oldatban inkubáltuk. A tumor szövetet O.C.T.TM -be (Tissue-Tek) ágyasztuk és -80 °C-on lefagyasztottuk, tároltuk. A 7 μm -es metszeteket kriosztáttal (Shandon Cryotome, Thermo-Electron Corporation) Leica (819) penge segítségével készítettük

Az MSC-eket a nyomon követhetőség érdekében, az oltás előtt CellTrackerTM CM-DiI (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (Invitrogen) karbocianin típusú piros festékekkel jelöltük meg, a sejtek elkülönítése érdekében a metszeteket pedig 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DAPI (Vector Laboratories) tartalmú Fluoromount G-vel (Southern Biotech) fedtük le. A mikroszkópos vizsgálatokat konfokális mikroszkóppal (Olympus FV 1000) végeztük el.

IV. 9. *In vitro* kapilláris teszt

Az előzetesen, a gyártó útmutatása szerint CellTrackerTM CM-DiI (Invitrogen) jelölt MSC-eket jelöletlen, egér szív kapilláris endotél, H5V sejtekkel tartottuk együtt 1:1 arányban. A sejteket 10% FCS, 1% L-Glutamin, Penicillin/Streptomycin és 50 μM 2-merkaptóetanollal (Sigma-Aldrich) kiegészített DMEM-ben, 24 lyukú lemezen (Orange) tenyésztettük. Kontroll mintaként az MSC vagy H5V sejteket külön-külön is tenyésztettük.

A kapilláris képződést a következő módon értékeltük: az együtt tartott sejtek öt véletlenszerűen kiválasztott, nem átfedő látómezőjét fluoreszcens mikroszkóppal (Olympus IX81) figyeltük meg és F-View II (Olympus) kamerával lefényképeztük. Három nappal az együtt tenyésztést követően, a CellR Imaging szoftver segítségével megmértük a kapilláris-szerű struktúrák hosszát.

IV. 10. *In vitro* vándorlási teszt

A vándorlási tesztet négyzethálós, kivehető rekesszel rendelkező tenyésztő edényben (ibiTreat Ibidi μ -Dish ^{35 mm,high} Grid-500, Ibidi) végeztük. Az egyik térrészbe CellTrackerTM CM-DiI (Invitrogen) jelölt 10^4 MSC-t ültettünk ki 70 μl tápoldatban (DMEM, 10% FCS), a másik térrészbe 3×10^4 4T1 emlő karcinóma sejtet tettünk ki,

szintén 70 µl tápfolyadékban (DMEM, 10% FCS). Azért, hogy gátoljuk a sejtek osztódását, a sejtek kitapadását követően a sejttenyésztő médiumot 5 mM hidroxüreával (Sigma-Aldrich) egészítettük ki, a kísérlet 37 °C-on és 5% CO₂ tartalmú termosztátban zajlott. Nyolc órával később a rekeszeket eltávolítottuk és 5 mM hidroxüreával kiegészített médiumot adtunk a sejtekhez. A kiindulási állapot rögzítése érdekében fluoreszcens mikroszkóp (Olympus IX81) és F-View II (Olympus) kamera segítségével felvételeket készítettünk. A kísérlet kezdetétől számított 16 órával később 4%-os paraformaldehid (Sigma-Aldrich) tartalmú PBS-ben 4 percig szobahőn fixáltuk a sejteket, majd PBS-sel mostuk a mintákat. A sejtmagokat 30 percig, 37 °C-on 100 ng/ml Hoechst33342-el (Sigma-Aldrich) festettük meg. Ismét felvételeket készítettünk. A migráló sejteket három független kísérlet 5-5 látómezőjében megszámloltuk, a migrációs távolságot a négyzethálós lemezen ismert távolságok alapján az ImageJ szoftver (szabadon elérhető NIH által fejlesztve) segítségével számoltuk ki. A relatív migrációs távolság = átlagos MSC vándorlási távolság / sejtmentes zóna hossza, három független kísérlet átlagát ábrázoltuk.

IV. 11. Statisztikai analízis

A statisztikai számításokat Microsoft Office Excel (2003) programmal végeztük el, kétszélű, kétmintás, egyenlő varianciájú Student-féle t-teszt formájában. A szignifikancia szintet a következő módon határoztuk meg: * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001.

IV. 12. Pufferek, oldatok készítése

RPMI sejttenyésztő médium:

- 1,04% (w/v) RPMI 1640 por (Gibco)
- 0,2% (w/v) NaHCO₃ (Reanal)
- 10 NE/ml penicillin (Biogal Gyógyszergyár Rt.)
- 0,1 mg/ml streptomycin (Egis Gyógyszergyár Rt.)
- sterilre szűrés után kiegészítve 0,63 mg/ml L-glutaminnal (Sigma-Aldrich),
- 5% (v/v) vagy 10% (v/v) hőinaktivált magzati borjúsérummal (FCS, Gibco)

Tripánkék oldat sejtyszámoláshoz:

- 0,16% (w/v) tripánkék (Reanal)
- 0.9% NaCl desztillált vízben (Merck)

PBS, pH 7,4:

1,8 mM NaH₂PO₄ (Reanal)
10 mM Na₂HPO₄ (Reanal)
135 mM NaCl (Merck)
3 mM KCl (Reanal)

FACS puffer:

PBS (ld. Előző)
0,1% (v/v) FCS (Invitrogen)
0,1% Na-azid (Sigma-Aldrich)

Redukáló SDS minta puffer (kétszeres töménységű):

125 mM Tris/HCl pH 6,8 (Fisher BioReagents)
20% (v/v) glicerin (Reanal)
4% (w/v) SDS (Sigma-Aldrich)
2% (v/v) 2-merkaptoetanol (Sigma-Aldrich)
brómfenolkék (Bio-Rad)

Koncentráló gél:

5% (w/v) akrilamid / 0,13% (w/v) bisz-akrilamid (Sigma-Aldrich)
125 mM Tris/HCl pH 6,8 (Fisher BioReagents)
0,1% (w/v) SDS (Sigma-Aldrich)
0,033% (w/v) ammónium-peroxi-diszulfát, (APS) (Sigma-Aldrich)
0,07% (v/v) N, N, N, N'-tetrametil-etilén-diamin, (TEMED) (Sigma-Aldrich)

Elválasztó gél:

7-15% (w/v) akrilamid / 0,182-0,39% (w/v) bisz-akrilamid (Sigma-Aldrich)
125 mM Tris/HCl pH 8,8 (Fisher BioReagents)
0,1% (w/v) SDS (Sigma-Aldrich)
0,033% (w/v) ammónium-peroxi-diszulfát, (APS) (Sigma-Aldrich)
0,07% (v/v) N, N, N, N'-tetrametil-etilén-diamin, (TEMED) (Sigma-Aldrich)

Futtató puffer:

25 mM Tris/HCl pH 8,3 (Fisher BioReagents)
194 mM glicin
0,1% (w/v) SDS (Sigma-Aldrich)

Coomassie Brilliant Blue G-250 fehérjeszeparáló gélek festéséhez:

0,1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250 (Reanal)
50% (v/v) metanol (Reanal)
10% (v/v) ecetsav (Reanal)

Transzfer puffer:

25 mM Tris-HCl pH 8,3 (Fisher BioReagents)
194 mM glicin (Molar Chemicals Kft.)
20% (v/v) metanol (Reanal)

TBS-Tween:

10 mM Tris-HCl pH 7,5 (Fisher BioReagents)
150 mM NaCl (Merck)
0,05% (v/v) Tween 20 (Sigma-Aldrich)

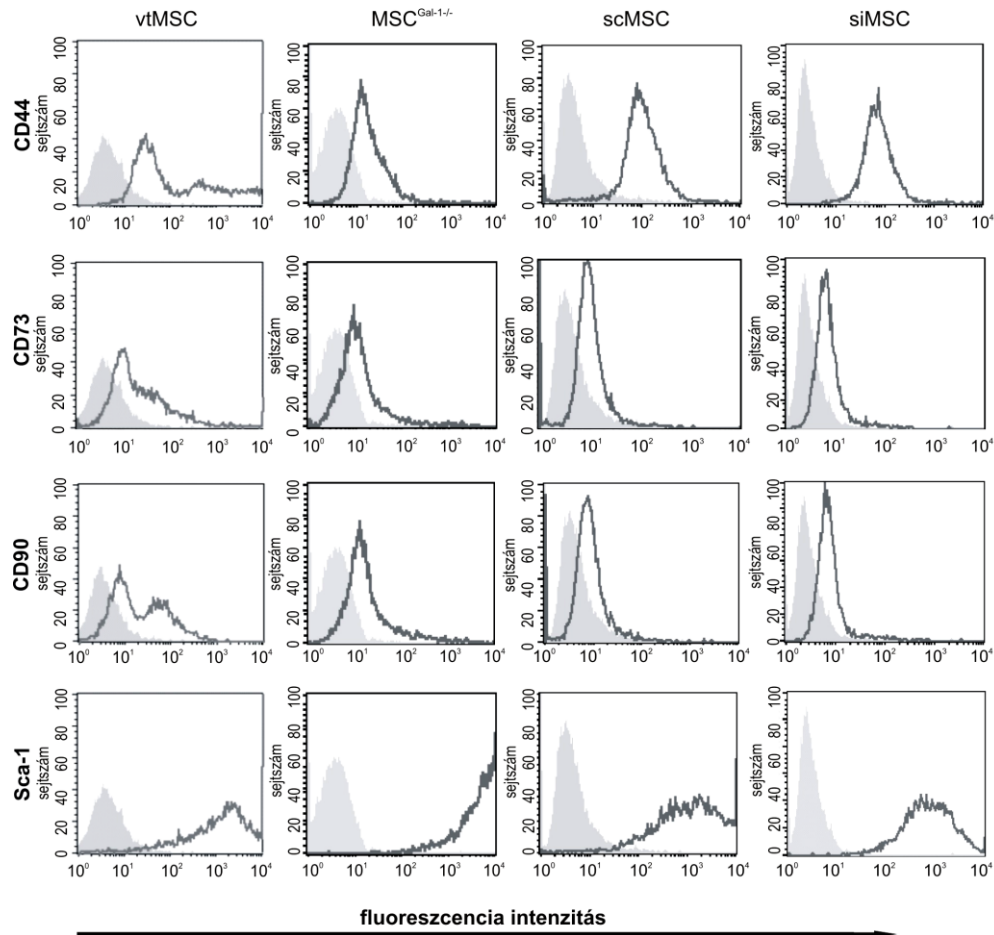
Lízis puffer:

50 mM Tris-HCl pH 7,5 (Fisher BioReagents)
150 mM NaCl (Merck)
1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich)
1 mM EDTA (Reanal)
1 mM PMSF (Sigma-Aldrich)

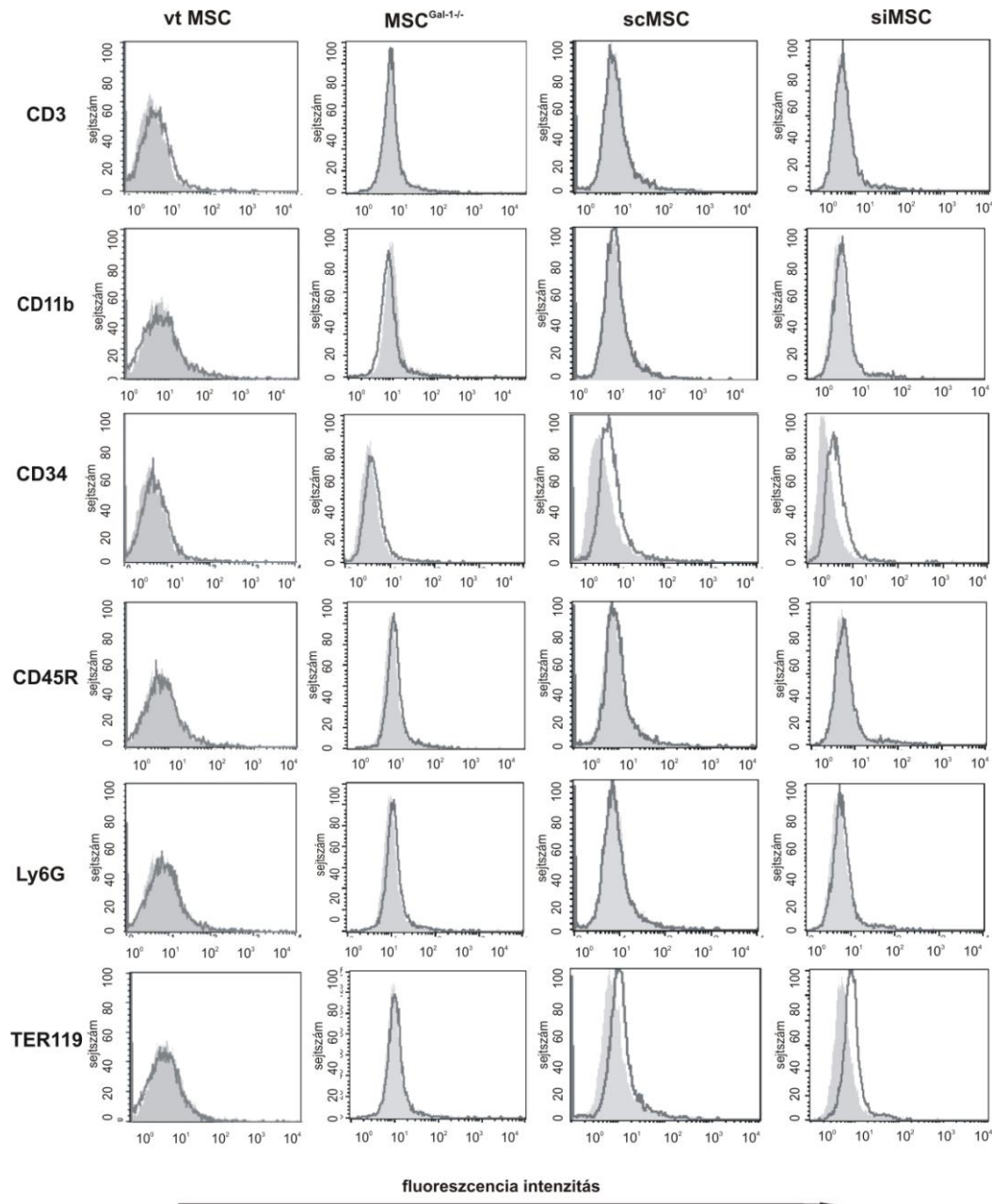
V. Eredmények

V. 1. Az MSC és tumor sejtvonalak jellemzése

A csontvelő eredetű mesenchymalis őssejtek sejtfelszíni markerei megfeleltek a Nemzetközi Sejtterápia Társaság (ISCT =International Society for Cellular Therapy) által megalkotott követelményeknek: mind a vad típusú (vtMSC), galektin-1 knockout ($MSC^{Gal-1^{-/-}}$), kontroll (scMSC) és galektin-1 specifikus siRNS transzfektált (siMSC) MSC kifejezte a CD44, CD73, CD90 és Sca-1 sejtfelszíni molekulákat (V. 1. ábra). Nem hordoztak semmilyen, vérképző ős- és elődsejtekre, illetve a különböző vérsajtfejlődési sorokra jellemző sejt felszíni hematopoetikus markert, azaz CD3, CD11b, CD34, CD45R, Ly6G, TER119 negatívak (V. 2. ábra).

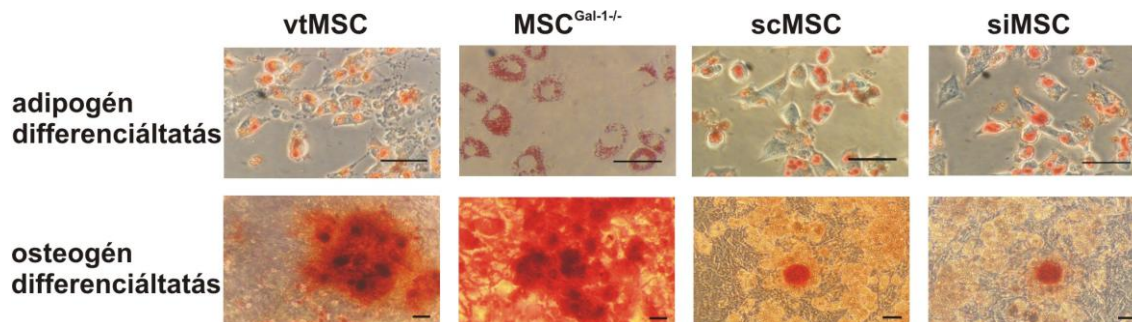


V. 1. ábra: Az MSC-k pozitív sejtfelszíni molekuláinak jellemzése. Vad típusú (vtMSC), és Gal-1 knockout ($MSC^{Gal-1^{-/-}}$) MSC-eket, valamint Gal-1 specifikus kis gátló RNS (siMSC) vagy kontroll, véletlen nukleotid sorrendű RNS (scMSC) transzfektált MSC-eket jelöltünk anti- CD44, CD73, CD90 és anti- Sca-1 R-PE konjugált monoklonális ellenanyagokkal és áramlási citofluorimetriával analizáltuk.



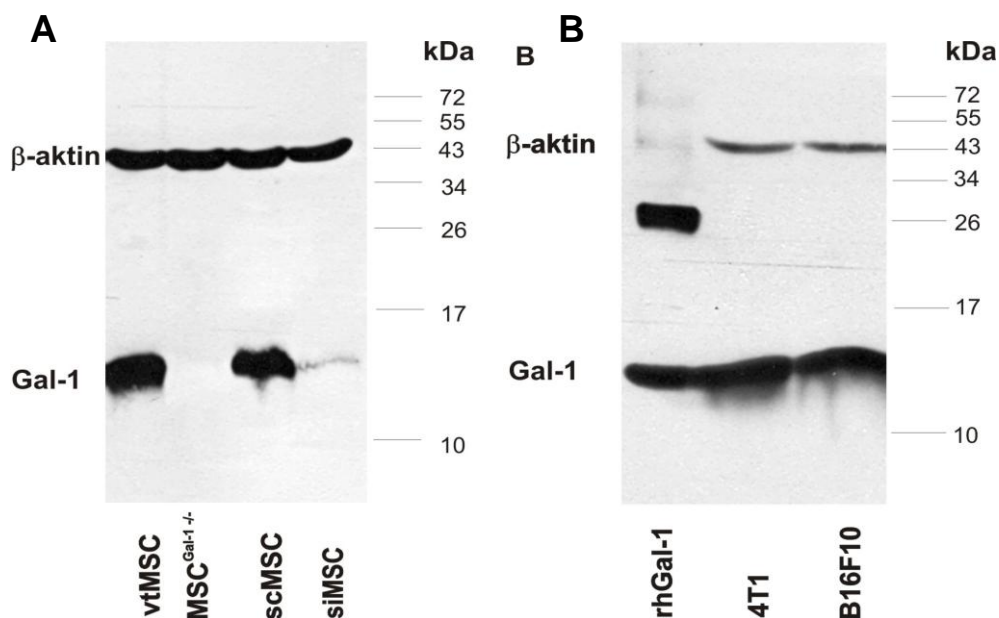
V. 2. ábra: Az MSC-k negatív sejtfelszíni molekuláinak jellemzése. Vad típusú (vtMSC), és Gal-1 knockout ($MSC^{Gal-1^{-/-}}$) MSC-eket, valamint Gal-1 specifikus kis gátló RNS (siMSC) vagy kontroll, véletlen nukleotid sorrendű RNS (scMSCs) transzfektált MSC-eket jelöltünk anti- CD34 FITC konjugált monoklonális ellenanyaggal és CD3e, CD11b CD45R, Ly-6G, TER-119 R-PE konjugált monoklonális ellenanyagokkal és áramlási citofluorimetriával analizáltuk.

Az MSC izolátumok (vtMSC, $MSC^{Gal-1^{-/-}}$) és a genetikailag módosított sejtek (scMSC, siMSC) egyaránt differenciálódtak *in vitro* a megfelelő morfogének jelenlétében adipocita és osteocita irányba (V. 3. ábra), bár az siRNS transzfektált MSC klónok esetében az osteogén differenciálódás kisebb mértékű volt.



V. 3. ábra: Az MSC-k adipogén és osteogén differenciálata. Vad típusú (vtMSC), és Gal-1 knockout ($MSC^{Gal-1/-}$) MSC-eket, valamint Gal-1 specifikus kis gátló RNS (siMSC) vagy kontroll, véletlen nukleotid sorrendű RNS (scMSCs) transzfektált MSC-eket tenyésztettünk adipogén (felső sor) ill. osteogén (alsó sor) médiumban. A lipid vakuólumokat Oil Vörös O -val, a kalcium lerakódásokat az extracelluláris mátrixban Alizarin Vörös S festékekkel tettük láthatóvá és inverz fénymikroszkópban fényképeztük. Mérete: 50 μ m.

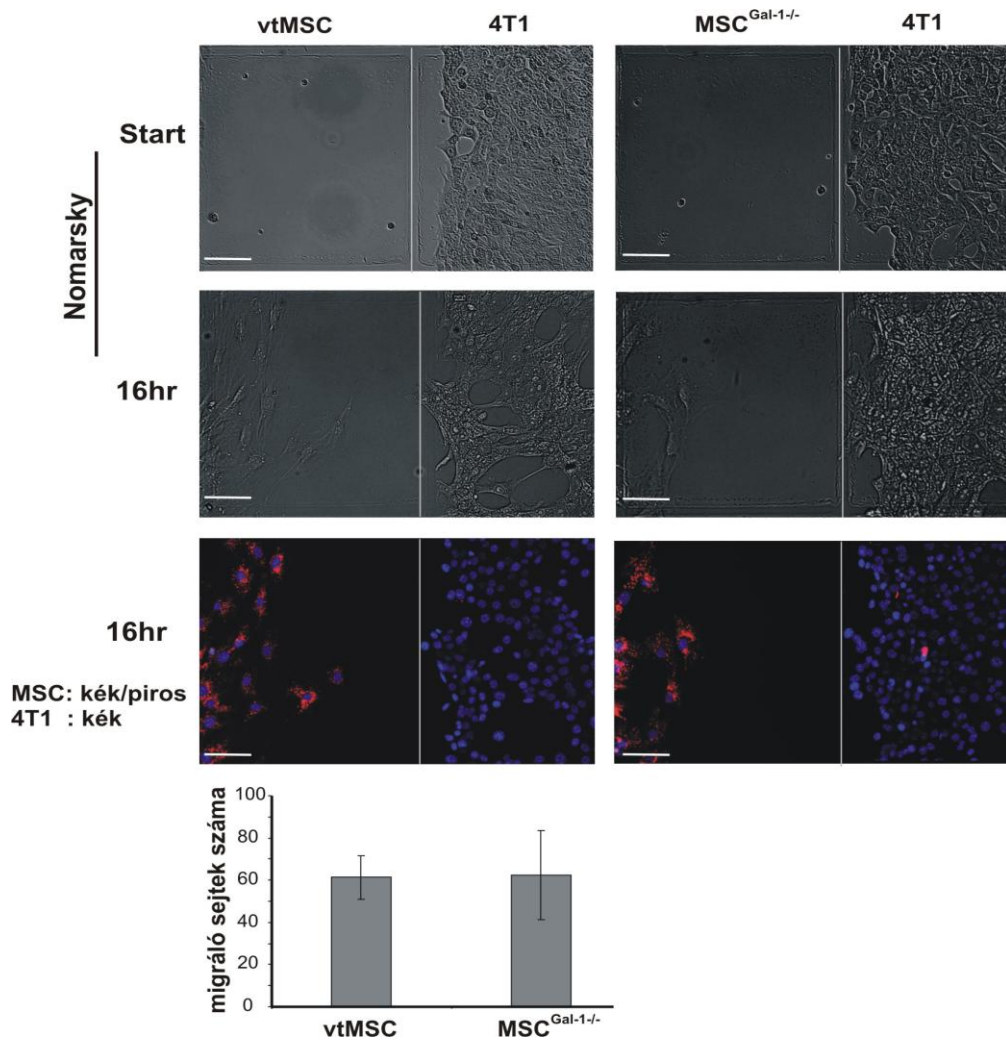
Western blot segítségével megvizsgáltuk a különböző MSC és tumor sejtek galektin-1 termelését. A Gal-1 knockout egérből izolált MSC nem termelt Gal-1-et, a vtMSC és scMSC valamint a 4T1 és B16F10 tumor sejtvonalak magas, míg az siMSC alacsony Gal-1 fehérje expressziót mutatott (V. 4. ábra).



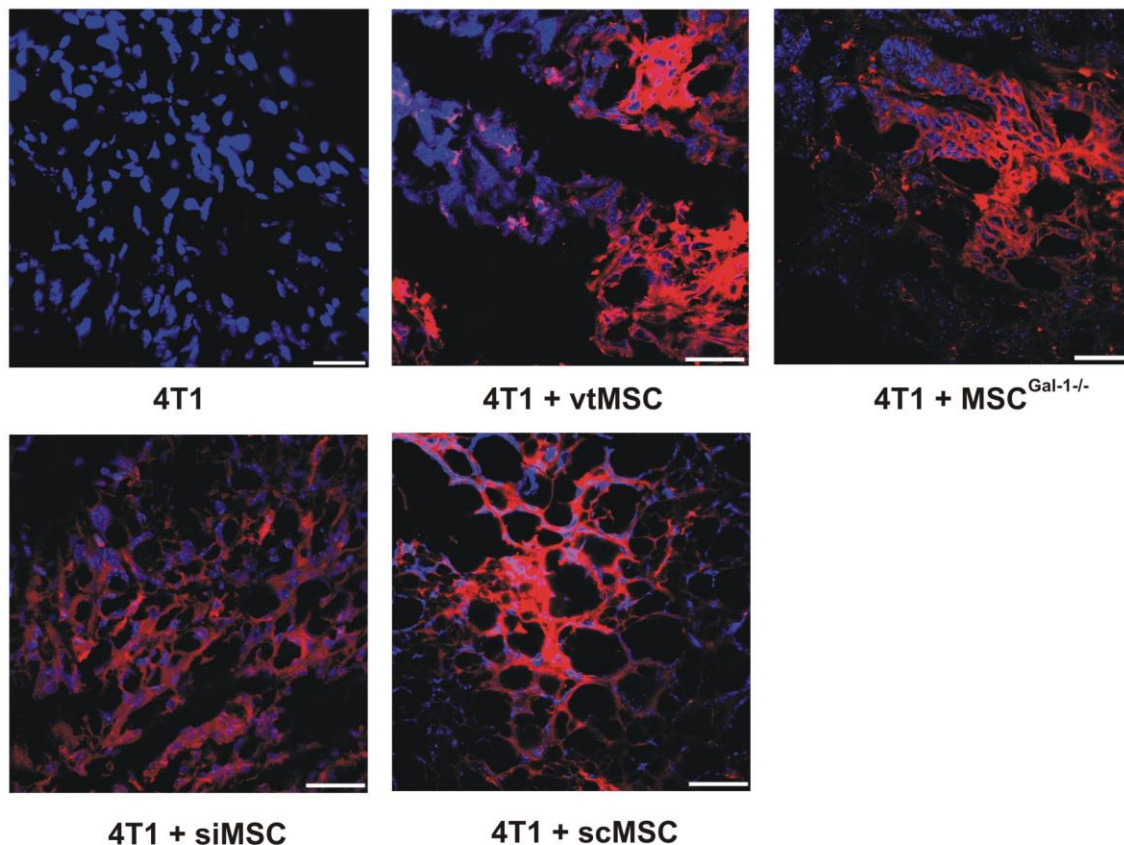
V. 4. ábra: Gal-1 termelés az MSC-kben és a tumor sejtvonalakban. A sejtlizátumokat vtMSC, $MSC^{Gal-1/-}$, scMSC és siMSC -ből (A) valamint 4T1 emlő karcinóma és B16F10 melanóma sejtekből, ill. rekombináns humán galektin-1-et (rhGal-1) (B) 12 %-17,5 % gradiens SDS-poliakrilamid géltre vittük fel, majd a méret szerint elválasztott fehérjéket nitrocellulóz membránra immobilizáltuk. A Gal-1-et nyúl anti-Gal-1 és anti-nyúl IgG-HRPO segítségével kemilumineszcens detekciós rendszerrel (ECL Plus) tettük láthatóvá. Nyúl anti- β -aktint használtunk felviteli kontrollként.

V. 2. A mesenchymalis őssejtek a tumor sejtek felé vándorolnak *in vitro* és galektin-1 termelésüktől függetlenül kimutathatóak a kifejtett emlőtumorokban

Biolumineszcens képalkotó technika segítségével számos tanulmányban kimutatták, hogy az MSC-k specifikusan a tumoros területre vándorolnak [50,51,148]. Azért, hogy meghatározzuk, hogy az MSC-ben termelődő Gal-1 szerepet játszik-e az MSC-k tumorba vándorlásában és a tumor ill. tumor mikrokörnyezeti túlélésében *in vitro* migrációs tesztet végeztünk el (V. 5. ábra).



V. 5. ábra: *In vitro* MSC vándorlási teszt a 4T1 sejtek felé. A speciális Ibidi sejtenyésztő lemez bal felére CM-DiI (piros) festett vtMSC vagy MSC^{Gal-1-/-}-et, a jobb felére 4T1 sejteket ültettünk ki, sejtosztódás gátló hidroxürea jelenlétében. 16 órával később, a 37 °C –on és 5% CO₂ termosztátban tartott sejteket fixáltuk és a sejtmagokat Hoechst33342 (kék) festékekkel tettük láthatóvá. A kezdeti és a végállapot Nomarsky felvétele látható az első, ill. a második sorban, valamint a végállapot Olympus IX81 fluoreszcens mikroszkópos felvétele a harmadik sorban. A négyzet alakú Ibidi lemezekben jól látható migrációs start vonalat a felvételek bal margójához illesztettük. A sejtmentes zónába vándorolt MSC-eket megszámláltuk és 3 független kísérlet átlageredményét ábrázoltuk (alsó diagram). Mércé:100 µm.

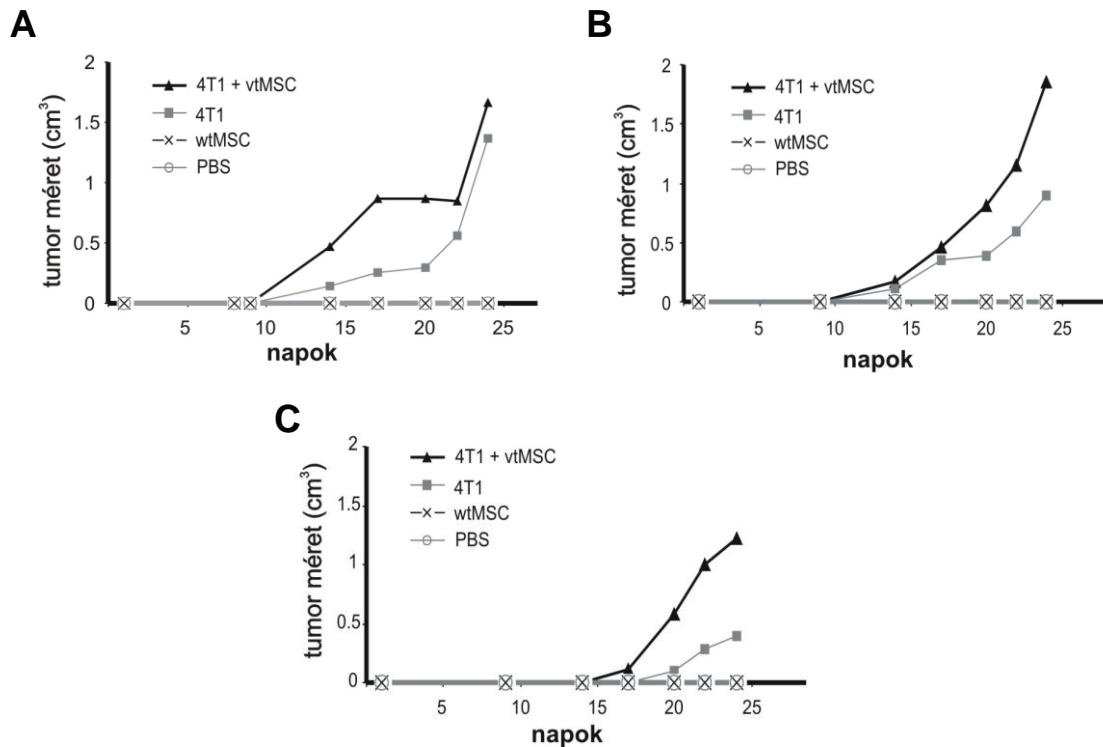


V. 6. ábra: Az MSC-ben termelődő Gal-1 nem befolyásolja a tumoron belüli eloszlásukat. Nőstény Balb/C egereket ortotopikusan oltottunk 10^3 4T1 sejttel egyedül (felső sor, bal) vagy együtt CM-DiI (piros) jelölt 10^5 vtMSC (felső sor, középen), $MSC^{Gal-1^{-/-}}$ (felső sor, jobb), siMSC (alsó sor, bal), scMSC (alsó sor, jobb) –vel. A primer tumorok fagyasztott metszetét DAPI-val (kék) festettük és konfokális mikroszkóppal analizáltuk. Három független kísérletből származó reprezentatív felvételek láthatók. Mércé: 30 μ m.

A Gal-1 hiánya a Gal-1 deficiens egérből izolált MSC-ben ($MSC^{Gal-1^{-/-}}$), ill. a csökkent Gal-1 termelés az siRNS technikával csendesített MSC-ben (siMSC, nem bemutatott adat) sem befolyásolta a 4T1 tumor sejtek felé történő vándorlásukat. Az MSC-k egyedül, a tumor sejtektől kapott kemotaktikus szignálok hiányában, azaz spontán nem migráltak (nem bemutatott adat). A fagyasztott tumor metszeteken kapott eredmények szerint a Gal-1 jelenléte (vtMSC, scMSC, siMSC) vagy hiánya ($MSC^{Gal-1^{-/-}}$) nem befolyásolta a fluoreszcensen jelölt MSC sejtek emlő tumoron belüli gyakoriságát és eloszlását (V. 6. ábra).

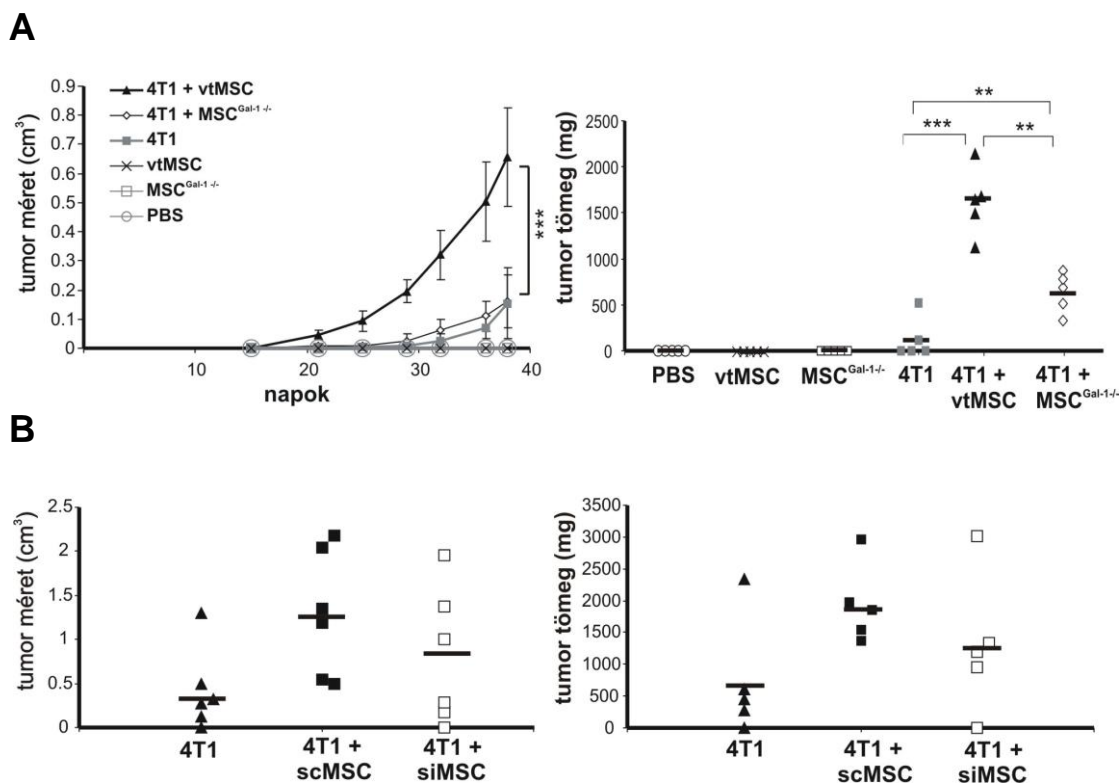
V. 3. Az MSC-k Gal-1 függő módon serkentik a tumor növekedést

Balb/C egereket oltottunk 4T1 emlő karcinóma sejtekkel és vtMSC ill. MSC^{Gal-1^{-/-}}-vel és követtük a tumor méretének növekedését. A tumor sejtek és MSC-k arányát változtatva 1:100 arányban tapasztaltuk a legkifejezettebb vtMSC hatást (V. 7. ábra), ezért a továbbiakban az emlő karcinómás kísérleteket ezzel a sejtszámmal végeztük.



V. 7. ábra: Az *in vivo* emlő tumor modellben alkalmazott 4T1 sejtszám beállítása. Különböző számú (A: 10^5 ; B: 10^4 ; C: 10^3) emlő karcinóma sejteket injektáltunk egyedül vagy 10^5 vtMSC sejtekkel Balb/C nőstény egerek emlő szövetébe és tolómérő segítségével rendszeresen mértük a daganatok méretét.

A vtMSC hatására a 4T1 emlő tumorok mérete az oltástól számított 38. napon 3,5-szeresére növekedett, sőt 12 nappal hamarabb megjelentek a tapintható tumorok a csak 4T1-el oltott egerekhez képest; hasonlóképpen a tumorok tömege jelentősen nagyobb volt a vtMSC kezelt egerekben (V. 8. A ábra). Ebben az időpontban a vtMSC-vel szemben a Gal-1 hiányos (MSC^{Gal-1^{-/-}}) sejtek nem okozták az emlő tumorok gyorsabb növekedését, 5 nappal később, a 43. napon detektálva megnövelték a tumorok súlyát, azonban hatásuk szignifikánsan elmaradt a vtMSC-k tumor fejlődésre gyakorolt pozitív hatásától (V. 8. A ábra).

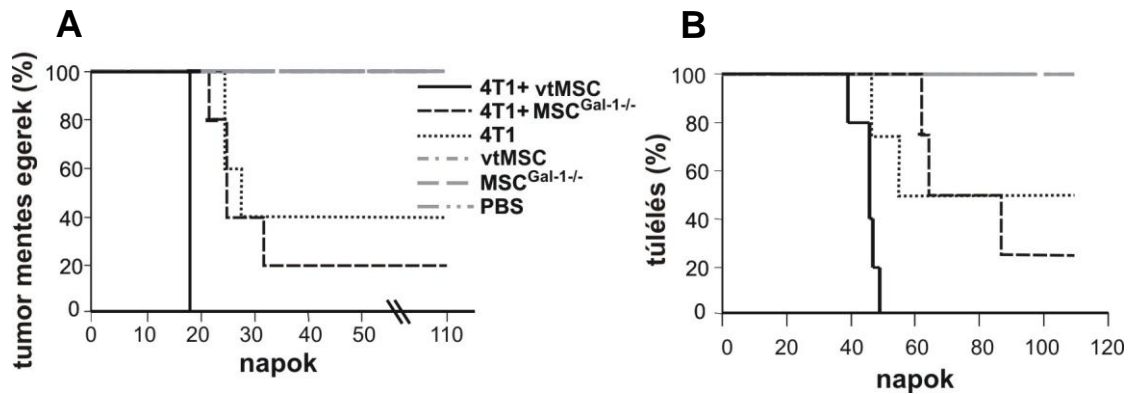


V. 8. ábra: A Gal-1 hiánya a Gal-1 knockout MSC-ben szignifikáns mértékben csökkentette a tumor növekedést serkentő hatást. Nőstény Balb/C egereket ortotopikusan oltottunk 10^3 4T1 sejtekkel egyedül vagy 10^5 vtMSC-vel, ill. MSC^{Gal-1-/-}-vel (A) és siMSC-vel vagy scMSC-vel (B). A tumor méretet minden 3. napon megmértük speciális tolmérő segítségével (A és B bal oldal). A tumorok tömegét az állatok kioltása és 4 %-os formaldehid fixálást követően mértük meg (A és B jobb oldal). A kontroll egereket PBS-el vagy tumor sejtek nélkül MSC sejtekkel oltottuk. Az átlag értékeket ábrázoltuk \pm szórás, a P értékeket (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$) a Student – féle t-próba segítségével számoltuk ki. A kísérleti egerek száma: A bal oldal: $n=10$, A jobb oldal: $n=5$, B bal oldal: $n=6$, B jobb oldal: $n=5$

A vtMSC-hez képest a Gal-1 fehérje szintjének csökkentése az MSC-ben (siMSC) némileg csökkentette a tumor növekedést, azonban nem tapasztaltunk szignifikáns változást (V. 8. B ábra), mely azt mutatja, hogy már csekély Gal-1 termelés is elegendő az MSC tumor fejlődésre gyakorolt hatásához. Az MSC-k önmagukban nem okoztak tumort 110 nappal az oltás után sem (V. 9. A ábra).

A tapintható tumorok gyakorisága és az állatok túlélése korrelált a tumorok méretével és tömegével, ugyanis a vtMSC –vel és 4T1-el kezelt egerekben a tapintható tumorok 20 napon belül kifejlődtek és az emlő karcinómás egerek 45 napon belül elhullottak. Az egyedül 4T1 sejtekkel, ill. a 4T1 sejtek mellett MSC^{Gal-1-/-}-vel kezelt egerekben az emlő daganatok lassabb ütemben nőttek, valamint 40, ill. 20%-ban nem

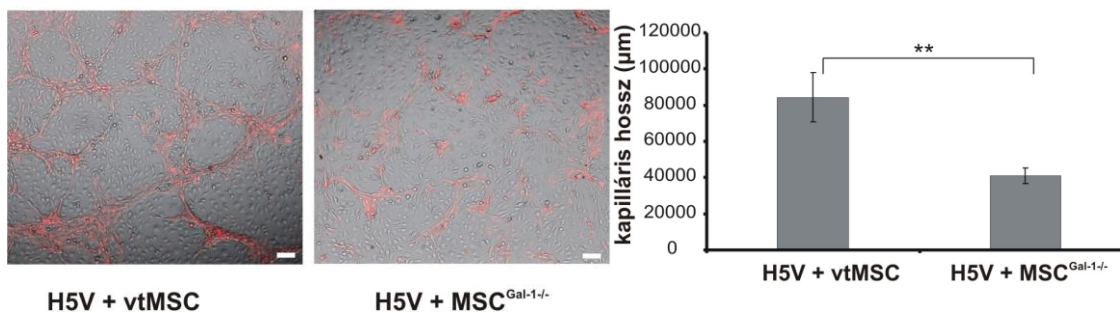
fejlődtek ki tapintható tumorok; az állatok 50, ill. 20%-a élt túl a 110 napos nyomon követés során (V. 9. ábra).



V. 9. ábra: Szemben a Gal-1 deficiens MSC-vel a vtMSC-k fokozták a daganatok gyakoriságát és csökkentették az emlőrákos egerek túlélését. A tumorok előfordulási gyakoriságát és az egyedül 10^3 4T1-gyel oltott, vagy 10^3 4T1-gyel és 10^5 vtMSC vagy MSC^{Gal-1-/-}-vel injektált állatok túlélését Kaplan-Meier analízis szerint értékeltük. A tapintható daganattal bíró egereket tekintettük tumorosnak. A túlélő és tumormentes egereket 110 napig figyeltük meg.

V. 4. A vtMSC okozta emelkedett mikroér denzitást a primer tumorokban befolyásolta az MSC-k Gal-1 termelése

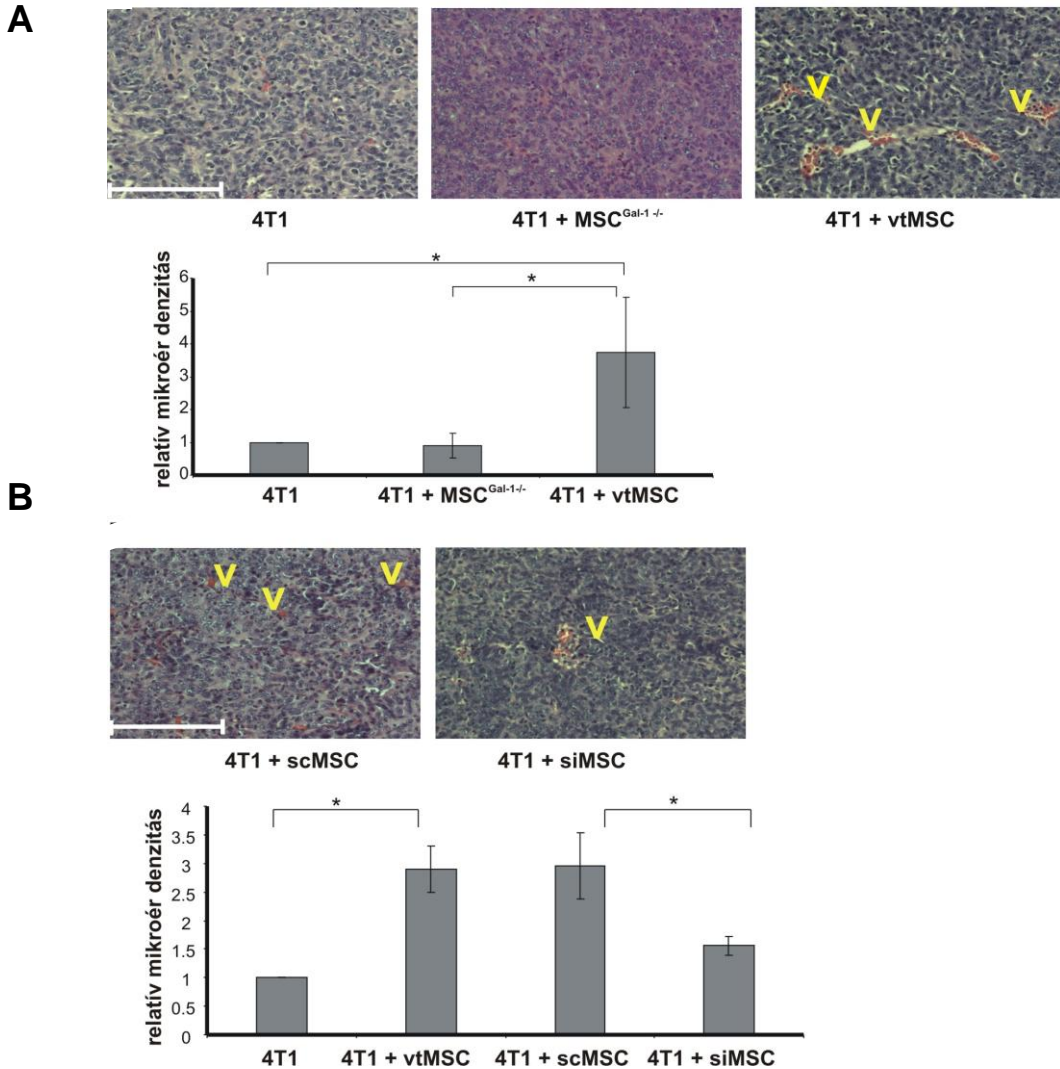
Korábbi tanulmányok beszámoltak róla, hogy az MSC-k fontos sejtes, a Gal-1 pedig molekuláris komponense a tumor fejlődésben kulcsszerepet betöltő érképződésnek.



V. 10. ábra: Az MSC eredetű Gal-1 befolyásolta a H5V endotelióma sejtek kapilláris-szerű struktúrák képzését *in vitro*. CM-DiI (piros) jelölt vtMSC vagy MSC^{Gal-1-/-} sejteket tenyésztettünk együtt eger szív kapilláris endotél (H5V) sejtekkel 1:1 arányban 3 napig (bal). A képződött tubulusok hosszát a két sejtípus közös tenyészetének öt véletlen látómezőjében megmértük három független kísérletben (jobb). ** $p < 0.01$. Mércze: 100 μm.

Ezért megvizsgáltuk, hogy a Gal-1-nek van-e szerepe az MSC mediálta tumor vaszkularizációban. *In vitro* kapilláris-szerű struktúrák képződtek H5V endotelióma és

vtMSC-k közös sejtenyésztésében, azonban a Gal-1 hiányos MSC-k esetében csökkent a kapillárisok száma és hossza (V. 10. ábra), a kontroll mintákban az MSC-k és a H5V sejtek külön-külön tenyésztve nem hoztak létre ilyen kapilláris-szerű struktúrákat.



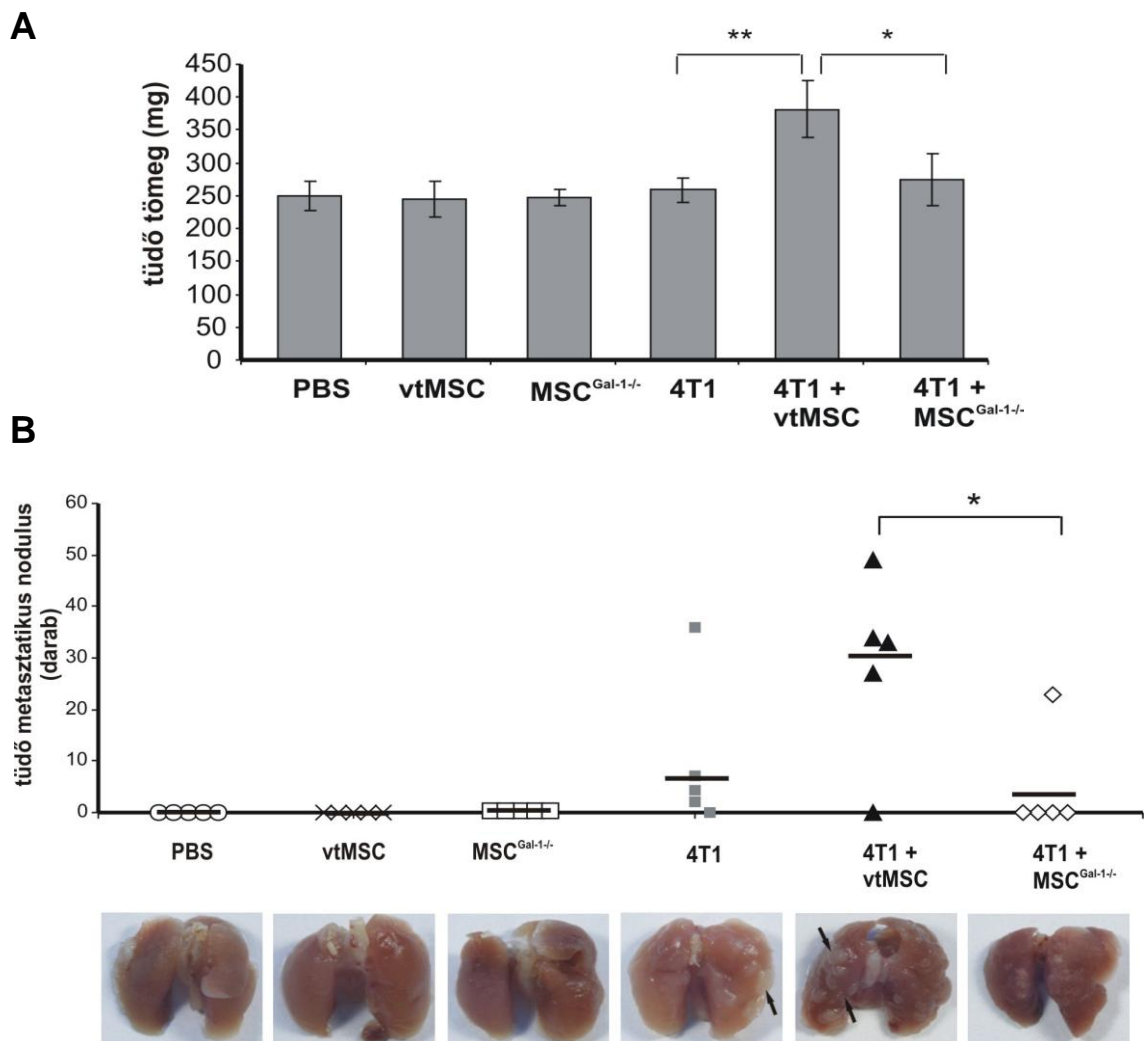
V. 11. ábra: Az MSC eredetű Gal-1 fokozta a 4T1 emlő tumorok erezettségét *in vivo*. (A és B) Nőstény Balb/C egereket ortotopikusan oltottunk 10^3 4T1 sejtekkel egyedül vagy 10^5 vtMSC-vel (A, bal), MSC^{Gal-1-/-}-vel (A, közép), scMSC-vel (B, bal) valamint siMSC-vel (B, jobb) együtt. Három független kísérlet reprezentatív szövettani felvétele látható. A vaszkularizált területek (V) morфомetrikus analízisét (A és B) az *Anyagok és módszerekben* leírtak szerint, paraffinba ágyazott hematoxin-eozin festett metszeteken végeztük el. A P értéket (* $p < 0,05$) a Student-féle t-próba segítségével számoltuk ki. Mércé: 100 μ m.

Ezzel összhangban az emlő tumorok erezettsége hasonló képet mutatott az egyedül 4T1 ill. a 4T1 sejtek mellett MSC^{Gal-1-/-} oltott egerekben, míg a vtMSC kezelés jelentősen serkentette a primer tumorok mikroér denzitását. A Gal-1 csendesített MSC-k (siMSC) érdekes módon szignifikánsan csökkentették az emlő tumorok erezettségét (V. 11.

ábra), míg a makroszkopikus (tumor méret, tömeg) paraméterekben tapasztalt csökkenés nem volt szignifikáns mértékű (V. 8. B ábra). A fenti eredmények szerint a Gal-1 az MSC-ben esszenciális szerepet játszik a tumorok új kapilláris hálózatának a kiépülésében.

V. 5. Az MSC eredetű Gal-1 fontos tényező a tumorok áttétképzésében

A tumor-asszociált fibroblasztok nemcsak a neo-angiogenezist, hanem a tumor sejtek szöveti burjánzását, áttétképződését is elősegítik [6].



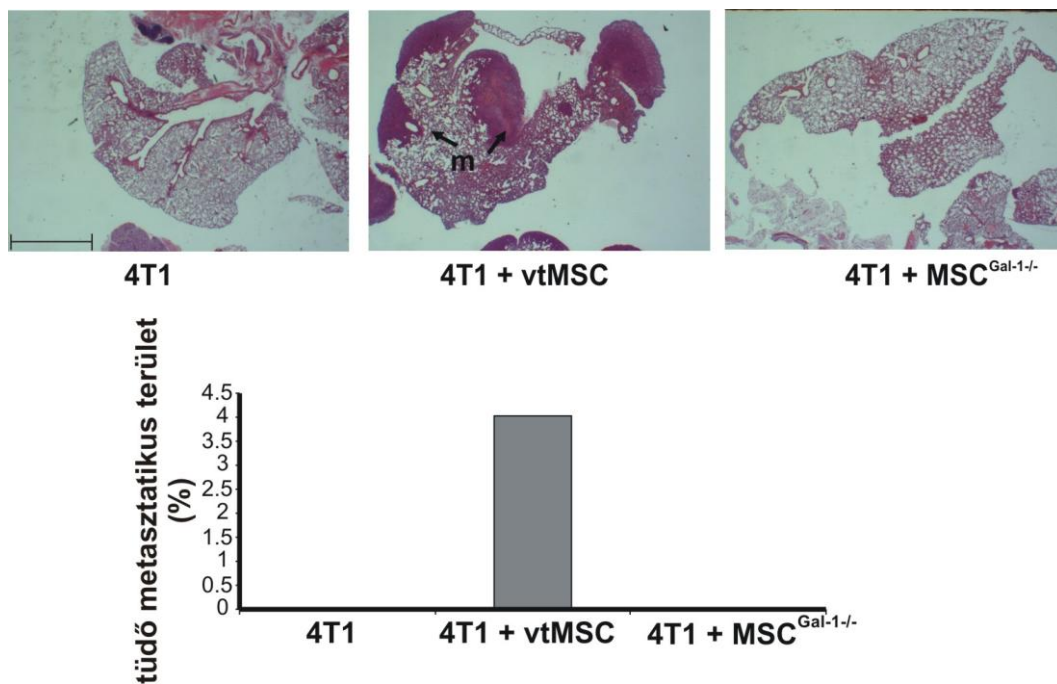
V. 12. ábra: Az MSC-ben termelődő Gal-1 kulcsszerepet játszik a tumor sejtek áttét képzésének elősegítésében. Az V. 8. ábra alatt leírtak szerint kezelt állatok kialtatását követően, a tüdőket 4% formaldehidben fixáltuk, megmértük a tömegüket (A) és sztereo mikroszkóp alatt megszámoltuk a tüdők felszínén lévő, az ábrán fekete nyilakkal jelölt metastatikus nodulusokat (B). A P értékeket (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$) a Student-féle t-próba segítségével számoltuk ki, $n=5$. A kontroll egereket PBS-sel, vtMSC-vel vagy MSC^{Gal-1-/-}-val oltottuk.

Azért, hogy meghatározzuk az MSC-ben termelődő Gal-1 metasztatikus gyakoriságára kifejtett szerepét, elvégeztük a tüdők, mint fő metasztatikus szervek, makroszkopikus analizisét is. A kísérleti állatok kialtatását követően megmértük a fixált tüdők tömegét, az átlag értékek 250 mg körül voltak, abban a csoportban mértünk magasabb értékeket (átlagban 370mg), amelyet vtMSC-vel kezeltünk (V. 12. A ábra).

A tüdők felszínén lévő metasztatikus nodulusokat sztereo mikroszkóp alatt megszámloltuk, a vtMSC oltott emlő karcinómás egerek tüdején szignifikánsabb több áttétes gócot figyeltünk meg, mint a 4T1, ill. 4T1 és MSC^{Gal-1^{-/-}} kezelt egerek esetében (V. 12. B ábra).

A szövettani vizsgálatok megerősítették a makroszkópos megfigyelések eredményeit. A metasztatikus területek aránya a teljes tüdő szövethez képest a vtMSC oltás hatására jelentős mértékben megnőtt szemben a csak 4T1-gyel, illetve az emlő karcinóma sejtek mellett MSC^{Gal-1^{-/-}} -vel oltott egerekhez képest (V. 13. ábra).

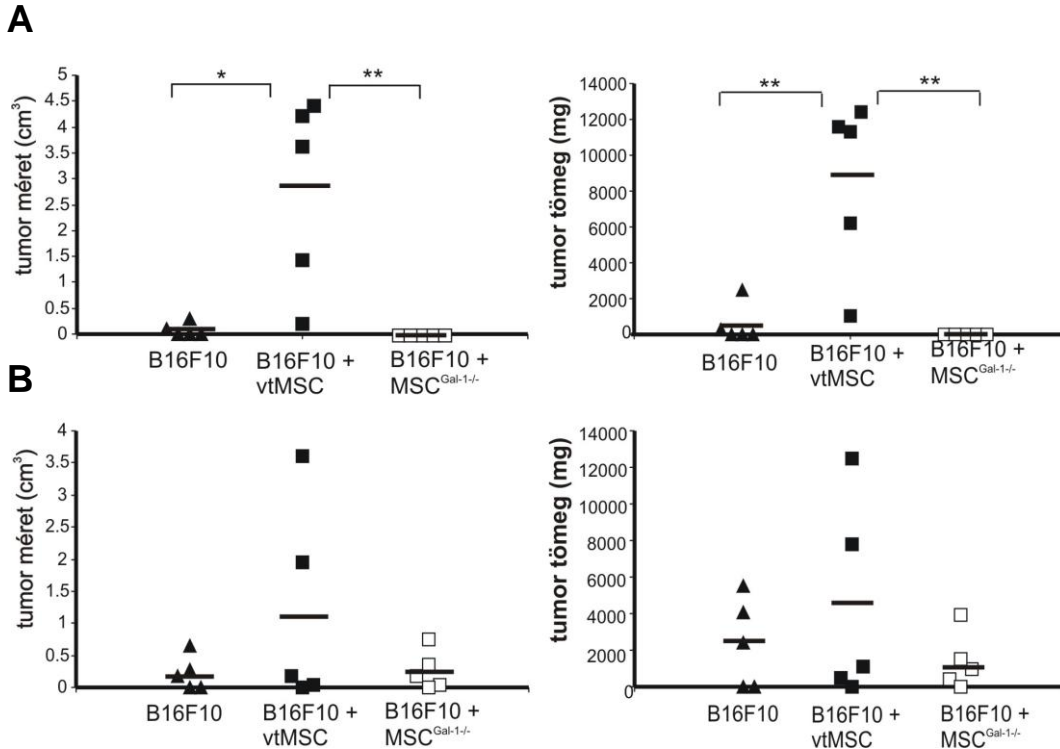
Ezen eredmények szerint az MSC-ben termelődő Gal-1 kulcsszereppel bír a tumor sejtek áttétképződésében.



V. 13. ábra: Az MSC-ben termelődő Gal-1 kulcsfaktor a tumor sejtek tüdőáttétképzésének elősegítésében. A fekete nyilakkal jelölt makrometasztázisokat (m) paraffinba ágyazott hematoxin-eozin festett metszeteken vizsgáltuk meg. A metasztatikus területek arányát (alsó grafikon) az *Anyagok és módszerekben* leírtak szerint határoztuk meg. Mércse: 1 mm.

V. 6. Az endogén, sztróma eredetű Gal-1-nek döntő szerepe van a tumor növekedésben

Annak érdekében, hogy megállapítsuk van-e az endogén Gal-1-nek tumor fejlődésre gyakorolt hatása, Gal-1 deficiens ($Gal-1^{-/-}$) B6.Cg-*Lgals1*^{tm1Rob}/J és vad típusú C57BL/6 egereket oltottunk szingén B16F10 melanóma sejtekkel és vtMSC vagy MSCs^{Gal-1^{-/-}}-vel, külön-külön (V. 14. A és B ábra).



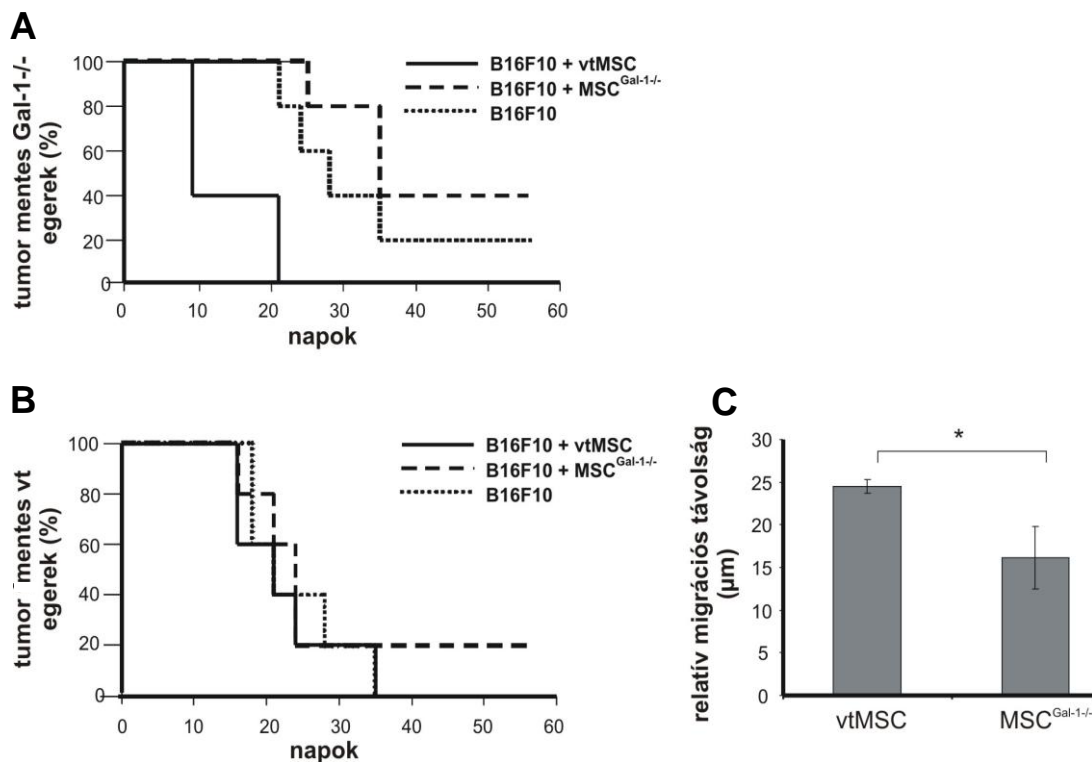
V. 14. ábra: Az MSC-ben termelődő Gal-1 elégséges faktora a korai tumor fejlődés támogatásának Gal-1 deficiens egerekben. Ötszáz B16F10 melanóma sejtet oltottunk 10^5 vtMSCs vagy MSC^{Gal-1^{-/-}}-vel Gal-1 knockout (B6.Cg-*Lgals1*^{tm1Rob}/J) (A) vagy vad típusú (C57BL/6) (B) egerekbe. A tumorok méretét (cm³) és tömegét (mg) ábrázoltuk az oltást követő 23. (bal) ill. a 24. (jobb) napon. A P értékeket (* p<0,05, ** p<0,01) a Student-féle t-próba segítségével számoltuk ki, n=5.

A $Gal-1^{-/-}$ egerekben alig észrevehető tumorok fejlődtek ki, ahhoz képest, amit a melanóma sejtek oltását követő 24. napon a vad típusú egereknél láttunk (V. 14. A ábra). A vad típusú mesenchymalis őssejtek (vtMSC) beadása serkentette a melanóma tumorok növekedését a vad típusú egerekben, bár szemben az emlő karcinómával (V.8. A ábra), az eltérés nem volt statisztikailag szignifikáns (V. 14. B ábra). A két tumor típus növekedése közötti különbség valószínűleg a melanóma extrém agresszivitásának tudható be. A $Gal-1^{-/-}$ egerekben, egy Gal-1-mentes háttérben már a vtMSC-k

szignifikáns módon fokozták a melanóma progresszióját. Ezzel szemben a Gal-1^{-/-} egerekben az MSCs^{Gal-1^{-/-}}-vel beadott melanóma sejtek az oltást követő 23. napon nem segítették elő a tumor növekedést (V. 14. A ábra).

A Gal-1 deficiens egerekben végzett kísérletekkel beigazolódtott, hogy a Gal-1 termelés az MSC-ben nélkülözhetetlen a tumor fejlődés támogatásában és az MSC eredetű Gal-1 a tumor termelte Gal-1 mellett kulcsszerepet játszik a daganat fejlődésében.

Ezek szerint a vtMSC a Gal-1 hiányos egerekben fokozta a tumor növekedést, az oltást követő 21. npra minden egérben kifejlődtek a melanóma daganatok. Azok a Gal-1 knockout egerek, amelyeket egyedül melanóma sejtekkel vagy MSCs^{Gal-1^{-/-}}-vel együtt oltottunk lassabb tumor növekedést mutattak, az első daganatok a 21. ill. a 25. napon fejlődtek ki, és a megfigyelés 56. napján 1, ill. 2 egér maradt tumormentes (V. 15. A ábra).



V. 15. ábra: A Gal-1 hiányos egerekben a vtMSC-k jelentősen felgyorsították a tumorok megjelenését. Ötszáz B16F10 melanóma sejtet oltottunk 10⁵ vtMSCs vagy MSC^{Gal-1^{-/-}}-val Gal-1 knockout (B6.Cg-Lgals1^{tm1Rob}/J) (A) vagy vad típusú (C57BL/6) (B) egerekbe. A tumorok előfordulási gyakoriságát Kaplan-Meier analízis szerint értékeltük. A tapintható daganattal bíró egereket tekintettük tumorosnak. A túlélő, tumormentes egereket 56 napig figyeltük meg. (C) *In vitro* MSC vándorlási teszt a 4T1 sejtek felé az V.1 ábránál leírtak szerint. A vtMSC és MSC^{Gal-1^{-/-}} sejtek relatív migrációs távolságát az *Anyagok és módszerekben* leírtak szerint határoztuk meg. A P értéket (* p<0,05) a Student-féle t-próba segítségével számoltuk ki.

A vad típusú egerekben a vtMSC alig befolyásolta a tapintható tumorok gyakoriságát, ez is a melanóma különösen agresszív jellegét mutatja (V. 15. B ábra).

Mint azt az *in vitro* migrációs tesztben láttunk, a Gal-1 hiánya az MSC-ben nem befolyásolta a tumor sejtek felé vándorló MSC-k számát (V. 5. ábra), azonban a vándorlási távolságuk lecsökkent (V. 15. C ábra), mely azt sugallja, hogy a Gal-1 termelés részben befolyásolhatja az endogén MSC-k mobilizációját a csontvelőből.

VI. Diszkusszió

A szilárd tumorok sztrómájának elemei intenzív érdeklődés középpontjába kerültek, ugyanis a legújabb kutatási eredmények szerint a tumor szövet számára egy jellegzetes, a daganatsejtek túlélését elősegítő mikrokörnyezetet biztosítanak. A tumor sztróma különböző sejttípusokból épül fel, többek között tumor-asszociált fibroblasztokból (TAF), myofibroblasztokból, endotél és immun sejtekből [6,10,65,149]. A tumor sztróma sejttállományának húsz százaléka a csontvelői mesenchymalis őssejtekből származik [11]. A tumor fejlődés során az MSC-k mobilizálódnak a keringésbe, majd a tumor területére vándorolnak és beágyazódnak a tumor mikrokörnyezetébe, ahol a daganat növekedését serkentik [61,150–153]. Az MSC-k fiziológias körülmények között a csontvelőben zajló hematopoézis megfelelő környezetének biztosítása mellett részt vesznek a szöveti megújulás és regeneráció folyamataiban [12]. Rákban, mint egy sebgyógyulást mimikáló [154], patológiás állapotban azonban az MSC-k hatása nemkívánatos következményekkel jár. Számos közleményben beszámoltak az MSC-k különböző mechanizmusok révén kifejtett *in vivo* tumor növekedést serkentő hatásáról: a mesenchymalis őssejtek differenciálódhatnak tumor-asszociált fibroblaszt irányba [10,43,155] elősegítik a daganatok neoangiogenezisét [68,156,157] és immunszuppresszív hatásuk által a rákra jellemző őssejt környezetet hoznak létre [32,66,158].

A beoltott exogén MSC-k ellenkező, tumor fejlődést gátló hatásáról is beszámoltak [57]. Az ellentmondásos adatokat, azzal magyarázzák, hogy az MSC-k hatását számos tényező befolyásolja, például az adott tumor típusa, a beadott MSC-k dózisa, az oltás módja és időzítése és a kultúrában fenntartott MSC-k heterogenitása. A mi eredményeink összhangban vannak azoknak a csoportoknak a közleményeivel, melyek szerint az MSC-k serkentik a tumor fejlődést. A vad típusú mesenchymalis őssejtek és 4T1 emlő karcinóma sejtek együtt oltása szignifikáns mértékben a tumor méret és tömeg növekedéséhez vezet. Sőt, a beoltott Gal-1 termelő MSC-k hatására az emlő tumorok gyakorisága növekszik és az állatok túlélése csökken. Ezzel szemben az általunk alkalmazott B16F10 melanóma modellben vad típusú egérben az MSC-k nem okoznak jelentős különbséget a tumorok előfordulási gyakoriságában, mely valószínűleg a melanóma különösen agresszív természetének tudható be.

Az MSC-k tumor növekedés serkentő hatását különböző, a tumor mikrokörnyezetébe kibocsájtott faktoroknak tulajdonítják [61], ezen tényezők közé soroljuk, mint az MSC-k tumor fejlődésre gyakorolt hatásában általunk újonnan azonosított és kulcsszerepet játszó, Gal-1 fehérjét. Génexpressziós és proteomikai tanulmányokban az MSC-k Gal-1 termelését és szekrécióját már korábban leírták [135–137], azonban ezekhez a leírásokhoz még nem társítottak funkciót. *In vitro* vizsgálatokból arra következtetnek, hogy a Gal-1-nek fontos szerepe lehet az MSC-k immunszupresszív hatásában [140,141]. Mindezek mellett az MSC eredetű Gal-1 rákban kifejtett funkciójáról még nincsenek adatok az irodalomban. A Gal-1 deficiens egerből izolált, Gal-1-et nem termelő MSC-k ($MSC^{Gal-1^{-/-}}$) a vad típusú MSC-khez (vtMSC) képest nem serkentik a tumor növekedést. A vad típusú és Gal-1 knockout MSC-k eltérő hatása nem annak tulajdonítható, hogy esetleg a Gal-1 hiányos sejtek nem tudnának a tumorban megtapadni és túlélni, mivel az MSC-k a Gal-1 termelés szintjétől függetlenül kimutathatók a kifejtett emlő tumorokban. A Gal-1 specifikus siRNS transzfektált, azaz csökkent mennyiségű Gal-1-et termelő MSC-k (siMSC) hatása a tumor növekedésre nem marad el szignifikáns mértékben a vtMSC hatásától, mely azt mutatja, hogy a Gal-1 fehérje teljes hiánya szükséges ahhoz, hogy megszűnjön az MSC-k tumor fejlődésre kifejtett pozitív hatása.

Alacsony oxigén tenzió, azaz hipoxia hatására az MSC-k mobilizálódnak a keringésbe [49]. Azonban nem csak a hipoxia, mintegy a szilárd tumorokra általánosan jellemző tulajdonság, hanem a hipoxia indukált faktor-1 α (HIF-1 α) által aktivált vérlemezke eredetű növekedési faktor (VEGF), és sztróma sejt eredetű factor-1 α (SDF-1 α) [159] is elősegítik az MSC-k perifériás vérbe történő mobilizációját. Az MSC-k különböző mechanizmusok révén serkentik a tumor növekedést, úgy mint a neoangiogenezis támogatásával [69], immunszupresszív tulajdonságuk révén, amellyel hozzájárulnak a tumorok immunprivilegiumához [19–25], valamint a tumor sejtek áttét képzésének fokozásával [62,63]. A Gal-1 fehérje mindhárom fenti folyamat mechanizmusában szerepet játszhat, sőt a Gal-1 termelés hipoxiás körülmények között szintén a HIF-1 α által szabályozott [127]. Aktivációt követően, mely a termelés indukcióját vagy magasabb szintű termelődést jelent, a Gal-1, mint proangiogén faktor részt vesz a tumorban zajló angiogenezisben [125,129,160]. *In vitro* vizsgálatainkban az MSC-ben termelődő Gal-1 fontos az MSC – H5V közös sejtenyészetében megjelenő kapilláris-szerű struktúrák kialakításában, ugyanis a Gal-1

deficiens MSC-k szignifikáns mértékben kevésbé hoznak létre ilyen képleteket. Ezeket az eredményeinket *in vivo* adatokkal is alá tudjuk támasztani. Amíg a vtMSC-k 4-szeresére növelik az emlő tumorok mikroér denzitását, addig az egyedül 4T1 emlő karcinóma sejtekkel oltott egerekhez képest az MSC^{Gal-1^{-/-}} sejteknek nincs hatása a vaszkularizációra. Az MSC-eredetű Gal-1 érzékelést elősegítő hatását Gal-1 csendesített MSC (siMSC) segítségével is megvizsgáltuk. Az siMSC-ben alacsony szinten megjelenő Gal-1 még elegendő az emlő tumorok növekedésének serkentéséhez, azonban az siMSC-ben csökkent mértékű Gal-1 termelés hatására a primer emlő tumorok érzettség már lecsökken.

Az irodalomban leírtak szerint, különböző modellekben vizsgálva a mesenchymalis őssejtek serkentik a tumor sejtek áttétképzését. SCID egérbe emberi MSC-eket és emberi emlő tumor sejteket együtt oltva megnő a rákos sejtek mozgékonyága és szóródása, ezáltal megnő a tüdő metasztázisok mértéke [62,63]. Ebben a modellben az emlő tumor eredetű oszteopontin parakrin módon elősegíti a kemotaktikus CCL5 fehérje termelődését az MSC-ben és a felszabaduló CCL5 fokozza a daganatsejtek migrációját, így áttétképzését. A Gal-1 fehérje is serkenti a rákos sejtek motilitását, azaz metasztatikus képességét, ugyanis elősegíti a daganat sejtek vándorlása során a tumor sejtek és az extracelluláris mátrix (ECM), valamint a rákos sejtek és az endotél sejtek közötti adhéziót [91]. A humán MSC-k által termelt ECM-ben lévő Gal-1 az MSC által indukált érzékelés során szükséges az MSC-k és az endotél sejtek közötti interakcióban [138]. Az emlő tumorról asszociált sztróma sejtekben termelődő Gal-1 szintje egyenesen arányos a tumor invazivitásával és a nyirokcsomó áttétek gyakoriságával [105]. Kísérleteink szerint az MSC-ben, mint a tumor kötőszövetes állományában lévő tumor-asszociált sztróma sejtek előalakjaiban, expresszálandó Gal-1 hozzájárul a 4T1 emlő karcinóma sejtek áttétképzéséhez. A makroszkópos vizsgálatok (tüdő tömege, metasztatikus nodulusok), ill. a mikroszkópos analízis (a makrometasztázisok aránya a tüdő szövetéhez képest) szerint a vtMSC-k szignifikáns módon serkentik a tüdő metasztázisok kifejlődését, ellenben a Gal-1 hiányos mesenchymalis őssejtek (MSC^{Gal-1^{-/-}}) nem befolyásolják ezen paraméterek értékeit a csak emlő tumor sejtekkel oltott állatokhoz képest.

Thijssen és munkatársai a tumor eredetű Gal-1 szerepét a daganatban zajló érzékelésben, Gal-1 knockout egerek segítségével meggyőzően mutatták be [130]. Az endogén Gal-1 hiányában (Gal-1^{-/-} egérben) az alacsony, ill. magas Gal-1 termelésű tumorok egyaránt lassabban növekedtek, azonban a magas Gal-1 expressziót mutató

TC1 tüdő karcinóma erezettségét kevésbé befolyásolta az endogén Gal-1 hiánya. Az MSC-ben lévő Gal-1 hatását a tumor növekedésre MSC és B16F10 melanóma sejtek Gal-1 hiányos egérbe történő oltásával vizsgáltuk. A vad típusú egerekben kapott eredményhez képest a vtMSC-k jelentős mértékben felgyorsították a melanóma növekedését, ezzel szemben az MSC^{Gal-1^{-/-}} és B16F10 melanómával, ill. a csak melanómával oltott egerekben csak kisebb esetszámban és később jelentek meg daganatok. Mindez azt mutatja, hogy a tumor mikroevolúciójában, még beoltott szingén tumorok esetében is, az MSC, tulajdonképpen az endogén sztróma eredetű Gal-1 fontos szerepet tölt be. Elképzelhető, hogy a Gal-1 deficiens MSC-k nem tudnak a tumoros területre vándorolni vagy nem támogatják a daganat növekedése szempontjából kulcsfontosságú angiogenezist. Ennek eldöntésére *in vitro* vizsgálatokat végeztünk el. A tumor sejtek felé vándorló vad típusú és Gal-1 knockout MSC-k számát nem befolyásolja a Gal-1 termelésükbeli különbség, azonban az MSC-k migrációs távolsága a Gal-1 hiányában szignifikáns módon lecsökken. Úgy gondoljuk, hogy az endogén MSC-k nem képesek a tumorba vándorolni a Gal-1 hiányos egerekben; következésképpen nem tudják helyileg kifejteni a vaszkularizációt serkentő hatásukat. Ez utóbbi feltevést az is alátámasztja, hogy a Gal-1 deficiens MSC-k *in vitro*, endotél sejtek közös tenyészetében nem képeznek kapilláris-szerű struktúrákat. Mindazonáltal a melanóma, ill. MSC^{Gal-1^{-/-}} és melanóma injektált Gal-1 knockout egerekben tapasztalt kései tumor megjelenés is igazolja a funkcionális, endogén tumor serkentő MSC hiányát. Ha vtMSC-ket oltunk melanóma sejtekkel együtt Gal-1 hiányos egérbe, a vtMSC-ben kifejeződő Gal-1 fehérje kompenzálja az endogén Gal-1 hiányát.

A saját nem közölt eredményeink és mások adatai [105,115,116] alapján az emberi emlő, prosztata vagy gyomor adenokarcinóma sztrómájában lévő magas Gal-1 fehérje szint egyenesen arányos az áttétek gyakoriságával, így a betegség rossz prognózisával. Mindezek figyelembe vétele szerint a tumor fejlődés kezdeti stádiumában a tumor sejt eredetű Gal-1 mellett a sztróma, ill. az MSC eredetű sztrómális elemek Gal-1 termelése meghatározó fontosságú terápiás célpont lehet.

VII. Irodalomjegyzék

1. Hanahan D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57–70.
2. Naumov GN, Bender E, Zurakowski D, Kang S-Y, Sampson D, et al. (2006) A model of human tumor dormancy: an angiogenic switch from the nonangiogenic phenotype. *J Natl Cancer Inst* 98: 316–325.
3. Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144: 646–674.
4. Warburg O, Wind F, Negelein E (1927) THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY. *J Gen Physiol* 8: 519–530.
5. Marx J (2008) Cancer biology. All in the stroma: cancer's Cosa Nostra. *Science* 320: 38–41.
6. Pietras K, Ostman A (2010) Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma. *Exp Cell Res* 316: 1324–1331.
7. Weinberg RA (2008) Coevolution in the tumor microenvironment. *Nat Genet* 40: 494–495.
8. Polyak K, Haviv I, Campbell IG (2009) Co-evolution of tumor cells and their microenvironment. *Trends Genet* 25: 30–38.
9. Gout S, Huot J (2008) Role of cancer microenvironment in metastasis: focus on colon cancer. *Cancer Microenviron* 1: 69–83.
10. Spaeth EL, Dembinski JL, Sasser AK, Watson K, Klopp A, et al. (2009) Mesenchymal stem cell transition to tumor-associated fibroblasts contributes to fibrovascular network expansion and tumor progression. *PLoS ONE* 4: e4992.
11. Quante M, Tu SP, Tomita H, Gonda T, Wang SSW, et al. (2011) Bone marrow-derived myofibroblasts contribute to the mesenchymal stem cell niche and promote tumor growth. *Cancer Cell* 19: 257–272.
12. Valtieri M, Sorrentino A (2008) The mesenchymal stromal cell contribution to homeostasis. *J Cell Physiol* 217: 296–300.
13. Hegyi B, Sági B, Kovács J, Kiss J, Urbán VS, et al. (2010) Identical, similar or different? Learning about immunomodulatory function of mesenchymal stem cells isolated from various mouse tissues: bone marrow, spleen, thymus and aorta wall. *Int Immunol* 22: 551–559.
14. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J (2007) Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells* 25: 2739–2749.

15. Fox JM, Chamberlain G, Ashton BA, Middleton J (2007) Recent advances into the understanding of mesenchymal stem cell trafficking. *Br J Haematol* 137: 491–502.
16. Malgieri A, Kantzari E, Patrizi MP, Gambardella S (2010) Bone marrow and umbilical cord blood human mesenchymal stem cells: state of the art. *Int J Clin Exp Med* 3: 248–269.
17. Schreml S, Babilas P, Fruth S, Orsó E, Schmitz G, et al. (2009) Harvesting human adipose tissue-derived adult stem cells: resection versus liposuction. *Cytotherapy* 11: 947–957.
18. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, et al. (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8: 315–317.
19. Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, et al. (2002) Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol* 30: 42–48.
20. Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, et al. (2002) Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 99: 3838–3843.
21. Glennie S, Soeiro I, Dyson PJ, Lam EW-F, Dazzi F (2005) Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood* 105: 2821–2827.
22. Plumas J, Chaperot L, Richard M-J, Molens J-P, Bensa J-C, et al. (2005) Mesenchymal stem cells induce apoptosis of activated T cells. *Leukemia* 19: 1597–1604.
23. Aggarwal S, Pittenger MF (2005) Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 105: 1815–1822.
24. Beyth S, Borovsky Z, Mevorach D, Liebergall M, Gazit Z, et al. (2005) Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood* 105: 2214–2219.
25. Nauta AJ, Kruisselbrink AB, Lurvink E, Willemze R, Fibbe WE (2006) Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34+-derived and monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 177: 2080–2087.
26. Zappia E, Casazza S, Pedemonte E, Benvenuto F, Bonanni I, et al. (2005) Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood* 106: 1755–1761.
27. Gerdoni E, Gallo B, Casazza S, Musio S, Bonanni I, et al. (2007) Mesenchymal stem cells effectively modulate pathogenic immune response in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Ann Neurol* 61: 219–227.

28. Augello A, Tasso R, Negrini SM, Cancedda R, Pennesi G (2007) Cell therapy using allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells prevents tissue damage in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 56: 1175–1186.
29. Lee RH, Seo MJ, Reger RL, Spees JL, Pulin AA, et al. (2006) Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/scid mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 17438–17443.
30. Urbán VS, Kiss J, Kovács J, Góczy E, Vas V, et al. (2008) Mesenchymal stem cells cooperate with bone marrow cells in therapy of diabetes. *Stem Cells* 26: 244–253.
31. Ringdén O, Uzunel M, Rasmusson I, Remberger M, Sundberg B, et al. (2006) Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. *Transplantation* 81: 1390–1397.
32. Nauta AJ, Fibbe WE (2007) Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood* 110: 3499–3506.
33. Meisel R, Zibert A, Laryea M, Göbel U, Däubener W, et al. (2004) Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood* 103: 4619–4621.
34. Sato K, Ozaki K, Oh I, Meguro A, Hatanaka K, et al. (2007) Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Blood* 109: 228–234.
35. Selmani Z, Naji A, Zidi I, Favier B, Gaiffe E, et al. (2008) Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ regulatory T cells. *Stem Cells* 26: 212–222.
36. Yang S-H, Park M-J, Yoon I-H, Kim S-Y, Hong S-H, et al. (2009) Soluble mediators from mesenchymal stem cells suppress T cell proliferation by inducing IL-10. *Exp Mol Med* 41: 315–324.
37. English K, Barry FP, Field-Corbett CP, Mahon BP (2007) IFN-gamma and TNF-alpha differentially regulate immunomodulation by murine mesenchymal stem cells. *Immunol Lett* 110: 91–100.
38. Ryan JM, Barry F, Murphy JM, Mahon BP (2007) Interferon-gamma does not break, but promotes the immunosuppressive capacity of adult human mesenchymal stem cells. *Clin Exp Immunol* 149: 353–363.
39. Schäfer M, Werner S (2008) Cancer as an overhealing wound: an old hypothesis revisited. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 628–638.
40. Filipak M, Estervig DN, Tzen CY, Mino P, Hoerl BJ, et al. (1989) Integrated control of proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells. *Environ Health Perspect* 80: 117–125.

41. Haniffa MA, Collin MP, Buckley CD, Dazzi F (2009) Mesenchymal stem cells: the fibroblasts' new clothes? *Haematologica* 94: 258–263.
42. Karp JM, Leng Teo GS (2009) Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details. *Cell Stem Cell* 4: 206–216.
43. Studeny M, Marini FC, Dembinski JL, Zompetta C, Cabreira-Hansen M, et al. (2004) Mesenchymal stem cells: potential precursors for tumor stroma and targeted-delivery vehicles for anticancer agents. *J Natl Cancer Inst* 96: 1593–1603.
44. Schichor C, Birnbaum T, Etminan N, Schnell O, Grau S, et al. (2006) Vascular endothelial growth factor A contributes to glioma-induced migration of human marrow stromal cells (hMSC). *Exp Neurol* 199: 301–310.
45. Birnbaum T, Roeder J, Schankin CJ, Padovan CS, Schichor C, et al. (2007) Malignant gliomas actively recruit bone marrow stromal cells by secreting angiogenic cytokines. *J Neurooncol* 83: 241–247.
46. Feng B, Chen L (2009) Review of mesenchymal stem cells and tumors: executioner or coconspirator? *Cancer Biother Radiopharm* 24: 717–721.
47. Spaeth E, Klopp A, Dembinski J, Andreeff M, Marini F (2008) Inflammation and tumor microenvironments: defining the migratory itinerary of mesenchymal stem cells. *Gene Ther* 15: 730–738..
48. Dwyer RM, Potter-Beirne SM, Harrington KA, Lowery AJ, Hennessy E, et al. (2007) Monocyte chemoattractant protein-1 secreted by primary breast tumors stimulates migration of mesenchymal stem cells. *Clin Cancer Res* 13: 5020–5027.
49. Rochefort GY, Delorme B, Lopez A, Héroult O, Bonnet P, et al. (2006) Multipotential mesenchymal stem cells are mobilized into peripheral blood by hypoxia. *Stem Cells* 24: 2202–2208.
50. Kidd S, Spaeth E, Dembinski JL, Dietrich M, Watson K, et al. (2009) Direct evidence of mesenchymal stem cell tropism for tumor and wounding microenvironments using in vivo bioluminescent imaging. *Stem Cells* 27: 2614–2623.
51. Wang H, Cao F, De A, Cao Y, Contag C, et al. (2009) Trafficking mesenchymal stem cell engraftment and differentiation in tumor-bearing mice by bioluminescence imaging. *Stem Cells* 27: 1548–1558.
52. Lazennec G, Jorgensen C (2008) Concise review: adult multipotent stromal cells and cancer: risk or benefit? *Stem Cells* 26: 1387–1394.
53. Rubio D, Garcia-Castro J, Martín MC, de la Fuente R, Cigudosa JC, et al. (2005) Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res* 65: 3035–3039.
54. Røslund GV, Svendsen A, Torsvik A, Sobala E, McCormack E, et al. (2009) Long-term cultures of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells

- frequently undergo spontaneous malignant transformation. *Cancer Res* 69: 5331–5339.
55. Garcia S, Bernad A, Martín MC, Cigudosa JC, Garcia-Castro J, et al. (2010) Pitfalls in spontaneous in vitro transformation of human mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res* 316: 1648–1650.
 56. Torsvik A, Røslund GV, Svendsen A, Molven A, Immervoll H, et al. (2010) Spontaneous malignant transformation of human mesenchymal stem cells reflects cross-contamination: putting the research field on track - letter. *Cancer Res* 70: 6393–6396.
 57. Klopp AH, Gupta A, Spaeth E, Andreeff M, Marini F 3rd (2011) Concise review: Dissecting a discrepancy in the literature: do mesenchymal stem cells support or suppress tumor growth? *Stem Cells* 29: 11–19.
 58. Maestroni GJ, Hertens E, Galli P (1999) Factor(s) from nonmacrophage bone marrow stromal cells inhibit Lewis lung carcinoma and B16 melanoma growth in mice. *Cell Mol Life Sci* 55: 663–667.
 59. Oswald J, Boxberger S, Jørgensen B, Feldmann S, Ehninger G, et al. (2004) Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem Cells* 22: 377–384.
 60. Gong Z, Niklason LE (2011) Use of human mesenchymal stem cells as alternative source of smooth muscle cells in vessel engineering. *Methods Mol Biol* 698: 279–294.
 61. Roorda BD, ter Elst A, Kamps WA, de Bont ESJM (2009) Bone marrow-derived cells and tumor growth: contribution of bone marrow-derived cells to tumor micro-environments with special focus on mesenchymal stem cells. *Crit Rev Oncol Hematol* 69: 187–198.
 62. Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, Sullivan A, Brooks MW, et al. (2007) Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* 449: 557–563.
 63. Mi Z, Bhattacharya SD, Kim VM, Guo H, Talbot LJ, et al. (2011) Osteopontin promotes CCL5-mesenchymal stromal cell-mediated breast cancer metastasis. *Carcinogenesis* 32: 477–487.
 64. Mishra PJ, Mishra PJ, Humeniuk R, Medina DJ, Alexe G, et al. (2008) Carcinoma-associated fibroblast-like differentiation of human mesenchymal stem cells. *Cancer Res* 68: 4331–4339.
 65. Bergfeld SA, DeClerck YA (2010) Bone marrow-derived mesenchymal stem cells and the tumor microenvironment. *Cancer Metastasis Rev* 29: 249–261.
 66. Djouad F, Plence P, Bony C, Tropel P, Apparailly F, et al. (2003) Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood* 102: 3837–3844.

67. Liao D, Luo Y, Markowitz D, Xiang R, Reisfeld RA (2009) Cancer associated fibroblasts promote tumor growth and metastasis by modulating the tumor immune microenvironment in a 4T1 murine breast cancer model. *PLoS ONE* 4: e7965.
68. Sun B, Zhang S, Ni C, Zhang D, Liu Y, et al. (2005) Correlation between melanoma angiogenesis and the mesenchymal stem cells and endothelial progenitor cells derived from bone marrow. *Stem Cells Dev* 14: 292–298.
69. Suzuki K, Sun R, Origuchi M, Kanehira M, Takahata T, et al. (2011) Mesenchymal stromal cells promote tumor growth through the enhancement of neovascularization. *Mol Med* 17: 579–587.
70. Oskowitz A, McFerrin H, Gutschow M, Carter ML, Pochampally R (2011) Serum-deprived human multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs) are highly angiogenic. *Stem Cell Res* 6: 215–225.
71. Ball SG, Shuttleworth CA, Kielty CM (2010) Platelet-derived growth factor receptors regulate mesenchymal stem cell fate: implications for neovascularization. *Expert Opin Biol Ther* 10: 57–71.
72. Furuya M, Yonemitsu Y, Aoki I (2009) III. Angiogenesis: complexity of tumor vasculature and microenvironment. *Curr Pharm Des* 15: 1854–1867.
73. Burger JA, Kipps TJ (2006) CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. *Blood* 107: 1761–1767.
74. Corcoran KE, Trzaska KA, Fernandes H, Bryan M, Taborga M, et al. (2008) Mesenchymal stem cells in early entry of breast cancer into bone marrow. *PLoS ONE* 3: e2563.
75. Polyak K, Weinberg RA (2009) Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer* 9: 265–273.
76. Martin FT, Dwyer RM, Kelly J, Khan S, Murphy JM, et al. (2010) Potential role of mesenchymal stem cells (MSCs) in the breast tumour microenvironment: stimulation of epithelial to mesenchymal transition (EMT). *Breast Cancer Res Treat* 124: 317–326.
77. Iwatsuki M, Mimori K, Yokobori T, Ishi H, Beppu T, et al. (2010) Epithelial-mesenchymal transition in cancer development and its clinical significance. *Cancer Sci* 101: 293–299.
78. Teichberg VI, Silman I, Beitsch DD, Resheff G (1975) A beta-D-galactoside binding protein from electric organ tissue of *Electrophorus electricus*. *Proc Natl Acad Sci USA* 72: 1383–1387.
79. de Waard A, Hickman S, Kornfeld S (1976) Isolation and properties of beta-galactoside binding lectins of calf heart and lung. *J Biol Chem* 251: 7581–7587.
80. Kobiler D, Barondes SH (1977) Lectin activity from embryonic chick brain, heart, and liver: changes with development. *Dev Biol* 60: 326–330.

81. Leffler H, Carlsson S, Hedlund M, Qian Y, Poirier F (2004) Introduction to galectins. *Glycoconj J* 19: 433–440.
82. Cooper DN, Massa SM, Barondes SH (1991) Endogenous muscle lectin inhibits myoblast adhesion to laminin. *J Cell Biol* 115: 1437–1448.
83. Gu M, Wang W, Song WK, Cooper DN, Kaufman SJ (1994) Selective modulation of the interaction of alpha 7 beta 1 integrin with fibronectin and laminin by L-14 lectin during skeletal muscle differentiation. *J Cell Sci* 107 (Pt 1): 175–181.
84. McGraw J, Gaudet AD, Oschipok LW, Kadoya T, Horie H, et al. (2005) Regulation of neuronal and glial galectin-1 expression by peripheral and central axotomy of rat primary afferent neurons. *Exp Neurol* 195: 103–114.
85. Puche AC, Key B (1995) Identification of cells expressing galectin-1, a galactose-binding receptor, in the rat olfactory system. *J Comp Neurol* 357: 513–523.
86. Clerch LB, Whitney P, Hass M, Brew K, Miller T, et al. (1988) Sequence of a full-length cDNA for rat lung beta-galactoside-binding protein: primary and secondary structure of the lectin. *Biochemistry* 27: 692–699.
87. Hughes RC (1999) Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 1473: 172–185.
88. Vyakarnam A, Dagher SF, Wang JL, Patterson RJ (1997) Evidence for a role for galectin-1 in pre-mRNA splicing. *Mol Cell Biol* 17: 4730–4737.
89. Park JW, Voss PG, Grabski S, Wang JL, Patterson RJ (2001) Association of galectin-1 and galectin-3 with Gemin4 in complexes containing the SMN protein. *Nucleic Acids Res* 29: 3595–3602.
90. Liu F-T, Rabinovich GA (2005) Galectins as modulators of tumour progression. *Nat Rev Cancer* 5: 29–41.
91. Rabinovich GA (2005) Galectin-1 as a potential cancer target. *Br J Cancer* 92: 1188–1192.
92. Perillo NL, Marcus ME, Baum LG (1998) Galectins: versatile modulators of cell adhesion, cell proliferation, and cell death. *J Mol Med* 76: 402–412.
93. Danguy A, Camby I, Kiss R (2002) Galectins and cancer. *Biochim Biophys Acta* 1572: 285–293.
94. Adams L, Scott GK, Weinberg CS (1996) Biphasic modulation of cell growth by recombinant human galectin-1. *Biochim Biophys Acta* 1312: 137–144.
95. Dhirapong A, Lleo A, Leung P, Gershwin ME, Liu F-T (2009) The immunological potential of galectin-1 and -3. *Autoimmun Rev* 8: 360–363.

96. Perillo NL, Pace KE, Seilhamer JJ, Baum LG (1995) Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. *Nature* 378: 736–739.
97. Ion G, Fajka-Boja R, Kovács F, Szebeni G, Gombos I, et al. (2006) Acid sphingomyelinase mediated release of ceramide is essential to trigger the mitochondrial pathway of apoptosis by galectin-1. *Cell Signal* 18: 1887–1896.
98. Kovács-Sólyom F, Blaskó A, Fajka-Boja R, Katona RL, Végh L, et al. (2010) Mechanism of tumor cell-induced T-cell apoptosis mediated by galectin-1. *Immunol Lett* 127: 108–118.
99. Blois SM, Ilarregui JM, Tometten M, Garcia M, Orsal AS, et al. (2007) A pivotal role for galectin-1 in fetomaternal tolerance. *Nat Med* 13: 1450–1457.
100. Rabinovich GA, Rubinstein N, Fainboim L (2002) Unlocking the secrets of galectins: a challenge at the frontier of glyco-immunology. *J Leukoc Biol* 71: 741–752.
101. Rabinovich GA (2000) Apoptosis as a target for gene therapy in rheumatoid arthritis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95 Suppl 1: 225–233.
102. Camby I, Le Mercier M, Lefranc F, Kiss R (2006) Galectin-1: a small protein with major functions. *Glycobiology* 16: 137R–157R.
103. André S, Kojima S, Yamazaki N, Fink C, Kaltner H, et al. (1999) Galectins-1 and -3 and their ligands in tumor biology. Non-uniform properties in cell-surface presentation and modulation of adhesion to matrix glycoproteins for various tumor cell lines, in biodistribution of free and liposome-bound galectins and in their expression by breast and colorectal carcinomas with/without metastatic propensity. *J Cancer Res Clin Oncol* 125: 461–474.
104. Irimura T, Matsushita Y, Sutton RC, Carralero D, Ohannesian DW, et al. (1991) Increased content of an endogenous lactose-binding lectin in human colorectal carcinoma progressed to metastatic stages. *Cancer Res* 51: 387–393.
105. Jung E-J, Moon H-G, Cho BI, Jeong C-Y, Joo Y-T, et al. (2007) Galectin-1 expression in cancer-associated stromal cells correlates tumor invasiveness and tumor progression in breast cancer. *Int J Cancer* 120: 2331–2338.
106. Gillenwater A, Xu XC, el-Naggar AK, Clayman GL, Lotan R (1996) Expression of galectins in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck* 18: 422–432.
107. van den Brûle F, Califice S, Garnier F, Fernandez PL, Berchuck A, et al. (2003) Galectin-1 accumulation in the ovary carcinoma peritumoral stroma is induced by ovary carcinoma cells and affects both cancer cell proliferation and adhesion to laminin-1 and fibronectin. *Lab Invest* 83: 377–386.
108. Cindolo L, Benvenuto G, Salvatore P, Pero R, Salvatore G, et al. (1999) galectin-1 and galectin-3 expression in human bladder transitional-cell carcinomas. *Int J Cancer* 84: 39–43.

109. Yamaoka K, Mishima K, Nagashima Y, Asai A, Sanai Y, et al. (2000) Expression of galectin-1 mRNA correlates with the malignant potential of human gliomas and expression of antisense galectin-1 inhibits the growth of 9 glioma cells. *J Neurosci Res* 59: 722–730.
110. Chiariotti L, Berlingieri MT, De Rosa P, Battaglia C, Berger N, et al. (1992) Increased expression of the negative growth factor, galactoside-binding protein, gene in transformed thyroid cells and in human thyroid carcinomas. *Oncogene* 7: 2507–2511.
111. Berberat PO, Friess H, Wang L, Zhu Z, Bley T, et al. (2001) Comparative analysis of galectins in primary tumors and tumor metastasis in human pancreatic cancer. *J Histochem Cytochem* 49: 539–549.
112. Ellerhorst J, Troncoso P, Xu XC, Lee J, Lotan R (1999) Galectin-1 and galectin-3 expression in human prostate tissue and prostate cancer. *Urol Res* 27: 362–367.
113. François C, van Velthoven R, De Lathouwer O, Moreno C, Peltier A, et al. (1999) Galectin-1 and galectin-3 binding pattern expression in renal cell carcinomas. *Am J Clin Pathol* 112: 194–203.
114. Kuo P-L, Hung J-Y, Huang S-K, Chou S-H, Cheng D-E, et al. (2011) Lung cancer-derived galectin-1 mediates dendritic cell anergy through inhibitor of DNA binding 3/IL-10 signaling pathway. *J Immunol* 186: 1521–1530.
115. van den Brûle FA, Waltregny D, Castronovo V (2001) Increased expression of galectin-1 in carcinoma-associated stroma predicts poor outcome in prostate carcinoma patients. *J Pathol* 193: 80–87.
116. Bektas S, Bahadir B, Ucan BH, Ozdamar SO (2010) CD24 and galectin-1 expressions in gastric adenocarcinoma and clinicopathologic significance. *Pathol Oncol Res* 16: 569–577.
117. Thijssen VLJL, Poirier F, Baum LG, Griffioen AW (2007) Galectins in the tumor endothelium: opportunities for combined cancer therapy. *Blood* 110: 2819–2827.
118. Ion G, Fajka-Boja R, Tóth GK, Caron M, Monostori E (2005) Role of p56lck and ZAP70-mediated tyrosine phosphorylation in galectin-1-induced cell death. *Cell Death Differ* 12: 1145–1147.
119. Le Q-T, Shi G, Cao H, Nelson DW, Wang Y, et al. (2005) Galectin-1: a link between tumor hypoxia and tumor immune privilege. *J Clin Oncol* 23: 8932–8941.
120. Stannard KA, Collins PM, Ito K, Sullivan EM, Scott SA, et al. (2010) Galectin inhibitory disaccharides promote tumour immunity in a breast cancer model. *Cancer Lett* 299: 95–110.
121. Banh A, Zhang J, Cao H, Bouley DM, Kwok S, et al. (2011) Tumor Galectin-1 Mediates Tumor Growth and Metastasis through Regulation of T-Cell Apoptosis. *Cancer Res* 71: 4423–4431.

122. Tang D, Yuan Z, Xue X, Lu Z, Zhang Y, et al. (2011) High expression of Galectin-1 in pancreatic stellate cells plays a role in the development and maintenance of an immunosuppressive microenvironment in pancreatic cancer. *IntJCancer*. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21780106>. Accessed 17 August 2011.
123. Rubinstein N, Alvarez M, Zwirner NW, Toscano MA, Ilarregui JM, et al. (2004) Targeted inhibition of galectin-1 gene expression in tumor cells results in heightened T cell-mediated rejection; A potential mechanism of tumor-immune privilege. *Cancer Cell* 5: 241–251.
124. Mathieu V, Le Mercier M, De Neve N, Sauvage S, Gras T, et al. (2007) Galectin-1 knockdown increases sensitivity to temozolomide in a B16F10 mouse metastatic melanoma model. *J Invest Dermatol* 127: 2399–2410.
125. Le Mercier M, Mathieu V, Haibe-Kains B, Bontempi G, Mijatovic T, et al. (2008) Knocking down galectin 1 in human hs683 glioblastoma cells impairs both angiogenesis and endoplasmic reticulum stress responses. *J Neuropathol Exp Neurol* 67: 456–469.
126. Wu M-H, Hong H-C, Hong T-M, Chiang W-F, Jin Y-T, et al. (2011) Targeting galectin-1 in carcinoma-associated fibroblasts inhibits oral squamous cell carcinoma metastasis by downregulating MCP-1/CCL2 expression. *Clin Cancer Res* 17: 1306–1316.
127. Zhao X-Y, Chen T-T, Xia L, Guo M, Xu Y, et al. (2010) Hypoxia inducible factor-1 mediates expression of galectin-1: the potential role in migration/invasion of colorectal cancer cells. *Carcinogenesis* 31: 1367–1375.
128. Zhao X-Y, Zhao K-W, Jiang Y, Zhao M, Chen G-Q (2011) Synergistic induction of galectin-1 by C/EBP α and HIF-1 α and its role in differentiation of acute myeloid leukemic cells. *The Journal of Biological Chemistry*. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21880716>. Accessed 29 September 2011.
129. Thijssen VLJL, Postel R, Brandwijk RJMGE, Dings RPM, Nesselova I, et al. (2006) Galectin-1 is essential in tumor angiogenesis and is a target for antiangiogenesis therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 15975–15980.
130. Thijssen VL, Barkan B, Shoji H, Aries IM, Mathieu V, et al. (2010) Tumor cells secrete galectin-1 to enhance endothelial cell activity. *Cancer Res* 70: 6216–6224.
131. Rorive S, Belot N, Decaestecker C, Lefranc F, Gordower L, et al. (2001) Galectin-1 is highly expressed in human gliomas with relevance for modulation of invasion of tumor astrocytes into the brain parenchyma. *Glia* 33: 241–255.
132. Xue X, Lu Z, Tang D, Yao J, An Y, et al. (2011) Galectin-1 secreted by activated stellate cells in pancreatic ductal adenocarcinoma stroma promotes proliferation and invasion of pancreatic cancer cells: an in vitro study on the microenvironment of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pancreas* 40: 832–839.

133. Spano D, Russo R, Di Maso V, Rosso N, Terracciano LM, et al. (2010) Galectin-1 and its involvement in hepatocellular carcinoma aggressiveness. *Mol Med* 16: 102–115.
134. Wu M-H, Hong T-M, Cheng H-W, Pan S-H, Liang Y-R, et al. (2009) Galectin-1-mediated tumor invasion and metastasis, up-regulated matrix metalloproteinase expression, and reorganized actin cytoskeletons. *Mol Cancer Res* 7: 311–318.
135. Silva WA Jr, Covas DT, Panepucci RA, Proto-Siqueira R, Siufi JLC, et al. (2003) The profile of gene expression of human marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 21: 661–669.
136. Panepucci RA, Siufi JLC, Silva WA Jr, Proto-Siquiera R, Neder L, et al. (2004) Comparison of gene expression of umbilical cord vein and bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 22: 1263–1278.
137. Kadri T, Lataillade J-J, Doucet C, Marie A, Ernou I, et al. (2005) Proteomic study of Galectin-1 expression in human mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* 14: 204–212.
138. Burns JS, Kristiansen M, Kristensen LP, Larsen KH, Nielsen MO, et al. (2011) Decellularized matrix from tumorigenic human mesenchymal stem cells promotes neovascularization with galectin-1 dependent endothelial interaction. *PLoS ONE* 6: e21888.
139. Gieseke F, Böhringer J, Bussolari R, Dominici M, Handgretinger R, et al. (2010) Human multipotent mesenchymal stromal cells use galectin-1 to inhibit immune effector cells. *Blood* 116: 3770–3779.
140. Lepelletier Y, Lecourt S, Renand A, Arnulf B, Vanneaux V, et al. (2010) Galectin-1 and semaphorin-3A are two soluble factors conferring T-cell immunosuppression to bone marrow mesenchymal stem cell. *Stem Cells Dev* 19: 1075–1079.
141. Najar M, Raicevic G, Id Boufker H, Stamatopoulos B, De Bruyn C, et al. (2010) Modulated expression of adhesion molecules and galectin-1: role during mesenchymal stromal cell immunoregulatory functions. *Exp Hematol* 38: 922–932.
142. Sioud M, Mobergslien A, Boudabous A, Fløisand Y (2011) Mesenchymal stem cell-mediated T cell suppression occurs through secreted galectins. *Int J Oncol* 38: 385–390.
143. Peister A, Mellad JA, Larson BL, Hall BM, Gibson LF, et al. (2004) Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential. *Blood* 103: 1662–1668.
144. Fidler IJ (1975) Biological behavior of malignant melanoma cells correlated to their survival in vivo. *Cancer Res* 35: 218–224.

- Aslakson, C. J., & Miller, F. R. (1992). Selective events in the metastatic process defined by analysis of the sequential dissemination of subpopulations of a mouse mammary tumor. *Cancer Research*, 52(6), 1399-1405.
146. Garlanda C, Parravicini C, Sironi M, De Rossi M, Wainstok de Calmanovici R, et al. (1994) Progressive growth in immunodeficient mice and host cell recruitment by mouse endothelial cells transformed by polyoma middle-sized T antigen: implications for the pathogenesis of opportunistic vascular tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 7291–7295.
 147. Kovács-Sólyom F, Blaskó A, Fajka-Boja R, Katona RL, Véghe L, et al. (2010) Mechanism of tumor cell-induced T-cell apoptosis mediated by galectin-1. *Immunol Lett* 127: 108–118.
 148. Klopp AH, Spaeth EL, Dembinski JL, Woodward WA, Munshi A, et al. (2007) Tumor irradiation increases the recruitment of circulating mesenchymal stem cells into the tumor microenvironment. *Cancer Res* 67: 11687–11695.
 149. Hall B, Dembinski J, Sasser AK, Studeny M, Andreeff M, et al. (2007) Mesenchymal stem cells in cancer: tumor-associated fibroblasts and cell-based delivery vehicles. *Int J Hematol* 86: 8–16.
 150. Zhu W, Xu W, Jiang R, Qian H, Chen M, et al. (2006) Mesenchymal stem cells derived from bone marrow favor tumor cell growth in vivo. *Exp Mol Pathol* 80: 267–274.
 151. De Boeck A, Narine K, De Neve W, Mareel M, Bracke M, et al. (2010) Resident and bone marrow-derived mesenchymal stem cells in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 46: 336–342.
 152. Placencio VR, Li X, Sherrill TP, Fritz G, Bhowmick NA (2010) Bone marrow derived mesenchymal stem cells incorporate into the prostate during regrowth. *PLoS ONE* 5: e12920.
 153. Goldstein RH, Reagan MR, Anderson K, Kaplan DL, Rosenblatt M (2010) Human bone marrow-derived MSCs can home to orthotopic breast cancer tumors and promote bone metastasis. *Cancer Res* 70: 10044–10050.
 154. Dvorak HF (1986) Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med* 315: 1650–1659.
 155. Direkze NC, Hodiwalla-Dilke K, Jeffery R, Hunt T, Poulosom R, et al. (2004) Bone marrow contribution to tumor-associated myofibroblasts and fibroblasts. *Cancer Res* 64: 8492–8495.
 156. Liu JW, Dunoyer-Geindre S, Serre-Beinier V, Mai G, Lambert J-F, et al. (2007) Characterization of endothelial-like cells derived from human mesenchymal stem cells. *J Thromb Haemost* 5: 826–834.
 157. Peters BA, Diaz LA, Polyak K, Meszler L, Romans K, et al. (2005) Contribution of bone marrow-derived endothelial cells to human tumor vasculature. *Nat Med* 11: 261–262.

158. Bianchi G, Borgonovo G, Pistoia V, Raffaghello L (2011) Immunosuppressive cells and tumour microenvironment: focus on mesenchymal stem cells and myeloid derived suppressor cells. *Histol Histopathol* 26: 941–951.
159. Liu L, Yu Q, Lin J, Lai X, Cao W, et al. (2011) Hypoxia-Inducible Factor-1 α Is Essential for Hypoxia-Induced Mesenchymal Stem Cell Mobilization into the Peripheral Blood. *Stem Cells Dev*.
Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21275821>. Accessed 17 August 2011.
160. Hsieh SH, Ying NW, Wu MH, Chiang WF, Hsu CL, et al. (2008) Galectin-1, a novel ligand of neuropilin-1, activates VEGFR-2 signaling and modulates the migration of vascular endothelial cells. *Oncogene* 27: 3746–3753.

VIII. Saját közlemények

Folyóirat cikkek

1. **Gábor J. Szebeni**, Éva Kriston-Pál, Péter Blazsó, Róbert L. Katona, Julianna Novák, Enikő Szabó, Ágnes Czibula, Beáta Hegyi, Ferenc Uher, László Krenács, Roberta Fajka-Boja, Gabriella Joó, Éva Monostori, *Identification of galectin-1 as a critical factor in function of mesenchymal stem cell-mediated tumor promotion* PLoS ONE 2012 **IF(2010): 4.411** Közlésre elfogadva.
2. Kovács-Sólyom F, Blaskó A, Fajka-Boja R, Katona RL, Végh L, Novák J, **Szebeni GJ**, Krenács L, Uher F, Tubak V, Kiss R, Monostori E. Mechanism of tumor cell-induced T-cell apoptosis mediated by galectin-1. *Immunology Letters*. 2010 **IF(2010):2.511**
3. Fajka-Boja Roberta, Blaskó Andrea, Kovács-Sólyom Ferenc, **Szebeni Gábor**, Tóth Gábor, Monostori Éva, Co-localization of galectin-1 with GM1 ganglioside in the course of its clathrin- and raft-dependent endocytosis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2008, 65: 2586-2593 **IF(2008): 5.511**
4. Ion G, Fajka-Boja R, Kovacs F, **Szebeni G**, Gombos I, Czibula A, Matko J, Monostori E. Acid sphingomyelinase mediated release of ceramide is essential to trigger the mitochondrial pathway of apoptosis by galectin-1. *Cellular Signalling*, 2006, 18: 1887-96 **IF(2006): 4.887**

Idézhető absztraktok

1. **Gábor János Szebeni**
The role of bone marrow derived mesenchymal stem cells and their galectin-1 expression in the progression of mouse tumors in models of 4T1 breast carcinoma and B16F10 melanoma. *Acta Biologica Szegediensis* Volume 54 (1) :70-71, 2010
2. R. Fajka-Boja, F. Kovács-Sólyom, R.L. Katona, **G.J. Szebeni**, L. Krenács, L. Végh, A. Blaskó, F. Uher, J. Novák, V. Tubak, R. Kiss, É. Monostori. Mechanism of T-cell death induced by tumor cell-derived galectin-1, that acts via direct cell-cell contact. *Eur.J.Immunol*, VOLUME 39 Issue S1, Page S195 (September 2009) **IF: 5.179**

Szabadalom

Uher Ferenc, Monostori Éva, Krenács László, **Szebeni Gábor**, Blazsó Péter, Katona Róbert, Martinek Tamás, Blaskó Andrea, Gercsó András Tiborné, Kovács Sólyom Ferenc, Joó Gabriella, Fajka-Boja Roberta, Tubak Vilmos
Ügyszám: P0900502, "Készítmény, hatóanyagok bejuttatására szolid tumorokba", SZTNH Bejelentés: 2009. 08. 11. Közzététel: 2011.03.28.

Konferencia előadások

1. **Szebeni Gábor János**, Kriston-Pál Éva , Blaszó Péter, Katona Róbert, Novák Julianna, Szabó Enikő, Joó Gabriella, Hegyi Beáta, Uher Ferenc, Krenács László, Fajka-Boja Roberta, Czibula Ágnes, Monostori Éva
“Identification of galectin-1 as a critical factor in function of mesenchymal stem cell-mediated tumour promotion”, Instituto Clinico Humanitas, Milanó, 2011. December 02.
2. **Szebeni Gábor János**, Kriston-Pál Éva , Blaszó Péter, Katona Róbert, Novák Julianna, Szabó Enikő, Joó Gabriella, Hegyi Beáta, Uher Ferenc, Krenács László, Fajka-Boja Roberta, Czibula Ágnes, Monostori Éva
„A Galektin-1, mint a mesenchymalis őssejtek tumorfejlődésre gyakorolt hatásában azonosított új faktor”, Magyar Immunológiai Társaság XXXX. Vándorgyűlése, Kecskemét, 2011. október 12-14.
3. **Gábor J. Szebeni**, Roberta Fajka-Boja, Andrea Blaskó, Éva Kriston-Pál, Ágnes Czibula, Ferenc Uher, Péter Blaszó, Róbert Katona, Gabriella Joó, László Krenács, Éva Monostori
„Is mesenchymal stem cell - derived galectin-1 a master or staff in immunomodulation and tumor progression ?”, Straub- napok, Szeged, 2010. december 1-2.
4. **Szebeni Gábor János**, Prof. Dr. Monostori Éva, Dr. Uher Ferenc, Prof. Dr. Krenács László, Dr. Joó Gabriella, Gercsó Andrásné, Dr. Fajka-Boja Roberta, Blaskó Andrea, Dr. Kovács-Sólyom Ferenc, Dr. Martinek Tamás, Dr. Tubak Vilmos
„Anti-tumor anyagok szállítása szolid tumorokba”, A Magyar Tudomány Ünnepe, Szeged, 2010. november 20.
5. **Szebeni Gábor János**, Kriston-Pál Éva, Blaszó Péter, Katona Róbert, Joó Gabriella, Uher Ferenc, Krenács László, Blaskó Andrea, Fajka-Boja Roberta, Vizler Csaba, Monostori Éva
„A mesenchymális őssejtekben termelődő galectin-1 alapvetően szabályozza a mesenchymális őssejtek tumor fejlődést serkentő hatását”, Magyar Immunológiai Társaság XXXIX. Vándorgyűlése, Szeged, 2010. november 3-5.
6. Fajka-Boja Roberta, Blaskó Andrea, Czibula Ágnes, **Szebeni Gábor János**, Blaszó Péter, Katona Róbert, Hegyi Beáta, Uher Ferenc, Monostori Éva
„A galectin-1 termelés befolyásolja a mesenchymális őssejtek limfocita proliferáció-szabályozó hatását”, Magyar Immunológiai Társaság XXXIX. Vándorgyűlése, Szeged, 2010. november 3-5.
7. **Szebeni Gábor János**, Blaskó Andrea, Blaszó Péter, Katona Róbert, Joó Gabriella, Uher Ferenc, Krenács László, Fajka-Boja Roberta, Kriston-Pál Éva , Vizler Csaba, Monostori Éva
„A csontvelői eredetű mesenchymális őssejtek és az általuk termelt galectin-1 szerepe 4T1 emlő karcinóma és B16 melanóma fejlődésében”, 40. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2010. május 18-21.

8. **Szebeni Gábor János**, Blaskó Andrea, Blaszó Péter, Katona Róbert, Joó Gabriella, Uher Ferenc, Krenács László, Fajka-Boja Roberta, Kriston-Pál Éva, Vizler Csaba, Monostori Éva
 „*A csontvelői eredetű mesenchymális őssejtek és az általuk termelt galektin-1 szerepe a tumor fejlődésben*”, Szegedi Biológus Doktorandusz Konferencia, Szeged, 2010. május 17-18.
9. **Szebeni Gábor János**
 „*A csontvelői eredetű mesenchymális őssejtek és az általuk termelt galektin-1 szerepe a tumorfejlődésben*”, Sófi József Ösztöndíj konferencia, Szeged, 2010. március 24.
10. **Szebeni Gábor János**
 „*A csontvelői eredetű mesenchymális őssejtek hatása a tumorfejlődésre 4T1 emlő karcinóma és B16F10 melanóma egér modellekben*”, Sófi József Ösztöndíj konferencia, Szeged, 2009. március 25.
11. **Gábor János Szebeni**, Andrea Blaskó, Gabriella Joó, László Krenács, Csaba Vizler, Ferenc Uher Éva Monostori
 „*Bone marrow derived mesenchymal stem cells influence the progression of mouse tumors in models of 4T1 breast carcinoma and B16F10 melanoma*”, Straub-napok, Szeged, 2008. december 3.
12. Kovács-Sólyom Ferenc, Blaskó Andrea, Katona Róbert, **Szebeni Gábor János**, Krenács László, Végh Lea, Fajka-Boja Roberta, Tubak Vilmos, Monostori Éva
 „*A galektin-1, mint legfőbb effektormolekula az U87-globlasztóma által indukált T sejt apoptózisba*”, Magyar Immunológiai Társaság XXXVII. Vándorgyűlése, Budapest, 2008. október 29-31.
13. Fajka-Boja Roberta, Blaskó Andrea, Kovács-Sólyom Ferenc, **Szebeni Gábor János**, Tóth K. Gábor, Monostori Éva
 „*A galektin-1 és GMI gangliozid kolokalizációja a klatrin- és raftfüggő endocitózis során*”, Magyar Immunológiai Társaság XXXVII. Vándorgyűlése, Budapest, 2008. október 29-31.
14. Ferenc Kovács-Sólyom, Andrea Blaskó, **Gábor János Szebeni**, Vilmos Tubak, László Krenács, Roberta Fajka-Boja, Lea Vég, Éva Monostori
 „*The role of galectin-1 in the war of tumor cells against T cells*”, Straub-napok, Szeged, 2007. november 28-30.
15. **Szebeni Gábor János**
 „*A humán galektin-1 által kiváltott T-sejt apoptózis molekuláris mechanizmusa*”, Sófi József Ösztöndíj konferencia, Szeged, 2007. április 19.
16. **Szebeni Gábor János**
 „*A humán galektin-1 által kiváltott T-sejt apoptózis molekuláris mechanizmusa*”, OTDK, Debrecen, 2007. április 4-6.

17. **Szebeni Gábor János**
 „*A humán galektin-1 által kiváltott T-sejt apoptózis molekuláris mechanizmusa*”, TDK, Szeged, 2006. december 1.
18. Fajka-Boja Roberta, **Szebeni Gábor János**, Monostori Éva
 „*A galektin-1 nem-konvencionális endocitózisa*”, Magyar Immunológiai Társaság Ifjúsági Napja, Pécs, 2006. november 17.

Konferencia Poszterek

1. Fajka-Boja Roberta, **Szebeni Gábor János**, Czibula Ágnes, Hegi Beáta, Uher Ferenc, Monostori Éva
 „*Galektin-1 szerepe a mesenchymalis őssejtek in vitro és in vivo immunszuppresszív hatásában*” Magyar Immunológiai Társaság XXXX. Vándorgyűlése, Kecskemét, 2011. október 12-14.
2. Kriston-Pál Éva, Fajka-Boja Roberta, Czibula Ágnes, **Szebeni Gábor János**, Uher Ferenc, Monostori Éva
 „*Mesenchymalis őssejt eredetű galektin-1 hatása az in vitro ér-differenciációra*” Magyar Immunológiai Társaság XXXX. Vándorgyűlése, Kecskemét, 2011. október 12-14.
3. Éva Kriston-Pál, Roberta Fajka-Boja, Julianna Novák, **Gábor János Szebeni**, Ferenc Uher, Éva Monostori
 „*Galectin-1 is required to the capillary-like structure formation in mesenchymal stem cell and endothelial cell coculture*” **IMMune-related Pathologies: Understanding Leukocyte Signaling and Emerging therapies**, IMPULSE, Visegrád, 2011. szeptember 3-6.
4. Fajka-Boja Roberta, Blaskó Andrea, Czibula Ágnes, **Szebeni Gábor János**, Blazsó Péter, Katona Róbert, Hegyi Beáta, Uher Ferenc, Monostori Éva
 „*A galektin-1 funkciója a mesenchymális őssejtek és a limfociták kölcsönhatásában*”
 IX. Magyar Genetikai Kongresszus és XVI. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Siófok, 2011. március 25-27.
5. Kriston-Pál Éva, Fajka-Boja Roberta, Novák Julianna, **Szebeni Gábor János**, Uher Ferenc, Monostori Éva
 „*BM-MSc eredetű galektin-1 in vitro hatása endotél sejtek proliferációjára és angiogenezisre*”, Magyar Immunológiai Társaság XXXIX. Vándorgyűlése, Szeged, 2010. november 3-5.
6. **Szebeni Gábor János**, Blaskó Andrea, Blazsó Péter, Katona Róbert, Joó Gabriella, Uher Ferenc, Krenács László, Fajka-Boja Roberta, Kriston-Pál Éva, Vizler Csaba, Monostori Éva
 „*A csontvelői eredetű mesenchymális őssejtek és az általuk termelt galektin-1 szerepe 4T1 emlő karcinóma és B16 melanóma fejlődésében*”, 40. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2010. május 18-21.

7. Fajka-Boja Roberta, Kovács-Sólyom Ferenc, Katona Róbert, **Szebeni Gábor János**, Krenács László, Végh Lea, Blaskó Andrea, Uher Ferenc, Novák Julianna, Tubak Vilmos, Robert Kiss, Monostori Éva. *Mechanism of T-cell death induced by tumor cell-derived galectin-1, that acts via direct cell-cell contact.* (Eur.J.Immunol, VOLUME 39 Issue S1, Page S195) 2nd European Congress of Immunology, ECI Berlin 2009. szeptember 13-16.

8. **Szebeni Gábor János** , Blaskó Andrea, Joó Gabriella , Krenács László, Fajka-Boja Roberta, Katona Róbert, Blazsó Péter, Vizler Csaba, Uher Ferenc, Monostori Éva
 „A csontvelői eredetű mezenchymális őssejtek és az általuk termelt galectin-1 szerepe a tumorfejlődésben”, Magyar Immunológiai Társaság Ifjúsági Kongresszusa, Harkány, 2009. október 29-30.

9. Végh Lea, Novák Júlianna, Kovács-Sólyom Ferenc, Tubak Vilmos, Blaskó Andrea, Váczi Balázs, **Szebeni Gábor János**, Angyal Adrienn, Fajka-Boja Roberta, Kiss-Tóth Endre, Monostori Éva
 „Galectin-1 fehérje dimerizációjának szerepe a T-sejt apoptózis kiváltásában”, Magyar Immunológiai Társaság Ifjúsági Kongresszusa, Harkány, 2009. október 29-30.

10. Blaskó A., F. Kovács-Sólyom, R. Fajka-Boja, R.L.Katona, **G.J.Szebeni**, L. Krenács, L.Végh, J. Novák, V. Tubak, É. Monostori
 „Mechanism of T-cell death induced by tumor cell-derived galectin-1, that acts via direct cell-cell contact” , Signals and signal processing in the immune system, Balatonöszöd, 2009. szeptember 2-6.

11. **Szebeni Gábor János**, Joó Gabriella, Krenács László, Vizler Csaba, Uher Ferenc és Monostori Éva
 „A csontvelői eredetű mezenchymális őssejtek hatása a tumorfejlődésre 4T1 emlő karcinóma és B16F10 melanóma modellekben”, Magyar Immunológiai Társaság XXXVII. Vándorgyűlése, Budapest, 2008. október 29-31.

12. Fajka-Boja Roberta, BlaskóAndrea, Kovács-Sólyom Ferenc, **Szebeni Gábor János**, Tóth K. Gábor, Monostori Éva
 „A Galectin-1 klatrin- és raftfüggő endocitózisa”, 38. Membrántranszport Konferencia, Sümeg, 2008. május 20-23.

13. Kovács-Sólyom Ferenc, Blaskó Andrea, Katona Róbert, **Szebeni Gábor János**, Krenács László, Végh Lea, Fajka-Boja Roberta, Tubak Vilmos, Robert Kiss, Monostori Éva
 „A galectin-1, mint legfőbb effektormolekula az U87-globlasztóma által indukált T sejt apoptózisban”, 38. Membrántranszport Konferencia, Sümeg, 2008. május 20-23.

14. Fajka-Boja Roberta, **Szebeni Gábor János**, Monostori Éva
 „A galectin-1 nem-konvencionális endocitózisa”, VII. Magyar Genetikai Kongresszus és XIV. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Balatonfüred, 2007. április 15-17.

IX. Összefoglalás

A legújabb kutatási eredmények szerint a csontvelő eredetű mesenchymalis őssejtek (MSC) szerepet játszanak a tumor fejlődésben. A tumoros szövetbe vándorolnak, és ott feltételezhetően részt vesznek a tumor körüli kötőszövet kialakításában, elősegítik az angiogenezist és hozzájárulnak a tumor mikrokörnyezetének immunprivilegiumához. Ismert, hogy a tumor, ill. tumor-asszociált sztróma eredetű galektin-1 (Gal-1) fehérje fokozza a tumor sejtek metasztatikus képességét és a tumorok erezettségét, ill. az aktivált T-sejtek apoptózisát okozza. Munkánkban azt vizsgáltuk, hogy mi a szerepe az MSC által termelt és szekretált Gal-1-nek a tumor növekedésben és fejlődésben.

Vad típusú (vtMSC) és Gal-1 knockout csontvelői MSC ($MSC^{Gal-1^{-/-}}$) sejtvonalakat alapítottunk. Western blot segítségével megvizsgáltuk az MSC Gal-1 termelését, illetve szekrécióját. Ezeket a sejteket együtt oltottuk 4T1 emlő karcinóma sejtekkel. Mértük a primer tumor növekedését és a metasztázisok gyakoriságát illetve a tüdő méretét, tömegét, valamint a tüdőben levő metasztázisos gócok számát. A tumor és tüdőszövetek hisztopathológiai, és a tumorok erezettségének morфомetrikus analízisét is elvégeztük. A Gal-1 kulcsszerepét az MSC-k tumor fejlődésre gyakorolt hatásában Gal-1 knockout egérben B16F10 melanóma modellben is megvizsgáltuk.

A vad típusú csontvelő eredetű mesenchymalis őssejtek jelenléte felgyorsította az emlő karcinóma primer tumorok gyakoriságát, növekedését, növelte a daganatok erezettségét, és a metasztázisok gyakoriságát, valamint a tumoros állatok élettartama szignifikánsan csökkent a 4T1-gyel egyedül, vagy az $MSC^{Gal-1^{-/-}}$ -vel együtt oltott egerekhez képest. *In vitro* migrációs tesztben az MSC eredetű Gal-1 jelenléte vagy hiánya nem befolyásolta a tumor sejtek felé vándorló MSC-k számát, azonban a migrációs távolságuk Gal-1 hiányában csökkent. H5V endotél sejtek vtMSC-vel közös sejtkultúrában kapilláris-szerű struktúrákat képeztek, míg ezen struktúrák $MSC^{Gal-1^{-/-}}$ hatására kevésbé alakultak ki. A Gal-1 hiányos egerekbe oltott B16F10 melanóma sejtek önmagukban vagy $MSC^{Gal-1^{-/-}}$ sejtekkel együtt injektálva lassabb tumor növekedést és alacsonyabb incidenciát okoztak, míg a vtMSC-k jelentős mértékben támogatták a melanóma tumorok progresszióját.

Vad típusú egérben a Gal-1 knockout MSC-k, szemben a vad típusú MSC-vel, nem fokozzák a tumor progressziót, tumor erezettséget, áttétképződést és nem

csökkentik a tumoros egerek túlélését. Gal-1 deficiens állatban a melanóma tumorok lassabb ütemben fejlődnek ki, mely vtMSC hatására fokozódik, igazolva, hogy az endogén sztróma, ill. mesenchymalis őssejtek által termelt Gal-1 szerepet játszik az MSC-k tumor fejlődésre gyakorolt pozitív hatásában.

X. Summary

Evidence has recently been accumulated that bone marrow derived mesenchymal stem cells (MSCs) are one source of the tumor associated stroma (TAS) including fibroblasts and blood vessels and for now it is widely accepted that TAS plays essential role in regulating tumor growth and metastasis. In spite of the intensive research, the individual factors in MSCs essentially controlling tumor progression have not been adequately defined. In the present study we have examined the role of MSC-derived galectin-1 (Gal-1), an immunosuppressive and pro-angiogenic protein abundantly expressed in MSCs, in the course of tumor progression. Co-transplantation of wild type MSCs with orthotopic 4T1 mouse breast carcinoma or B16F10 melanoma enhances tumor incidence, growth, vascularization and metastasis and reduces survival compared to animals treated with tumor cells alone or in combination with Gal-1 knock-down or Gal-1 knock-out MSCs. *In vitro* studies show that the presence or absence of Gal-1 in MSCs does not affect the proliferation of cultured tumor or endothelial cells and the number of migrating MSCs toward the tumor cells. Conversely, migration efficiency is significantly reduced in the absence of Gal-1. Also, differentiation of endothelial cells into blood vessel-like structures strongly depends on the expression of Gal-1 in MSCs indicating that MSC-derived Gal-1 primarily regulates vascularization of the tumors. Vital role of Gal-1 in MSCs has been further verified in Gal-1 knock-out mice. Administrating B16F10 melanoma into Gal-1 deficient animals, tumor growth is highly reduced compared to wild type animals. Nevertheless, co-injection of wild type but not Gal-1 deficient MSCs results in dramatic tumor growth and development supporting our theory about the determining role of Gal-1 expression in MSCs.

XI. Köszönetnyilvánítás

Először is szeretném hálámat kifejezni témavezetőmnek, **Prof. Dr. Monostori Évának**, hogy megtanított a szisztematikus, tudományos munka végzésére és elindított tudományos pályámon. Köszönettel tartozom a szakmai útmutatásaiért, gondos témavezetésért, és nem utolsósorban megértéséért, türelméért is.

Nagyon köszönöm minden volt és jelenlegi munkatársamnak a kellemes munkahelyi légkört és a számos segítséget a felmerülő problémák megoldásában: **Dr. Joó Gabriellának** a kezdeti in vivo vizsgálatokban való közreműködését, **Kriston-Pál Évának** a továbbiakban az egeres munkákban való részvételét ill. az in vitro kapilláris teszt kísérletét, **Novák Juliannának** az in vitro vándorlási kísérletét és **Dr. Fajka-Boja Robertának** az elsőszerzős közleményemben és dolgozatomban tett javításokat, valamint a laborban, a hat éves itt tartózkodásom alatt nyújtott tanítását, a különböző fehérjékkel kapcsolatos technikák elsajátításában és megértésében nyújtott segítségét, **Dr. Czibula Ágnesnek** és **Szabó Enikőnek** az MSC-k differenciáltatását, **Dr. Kovács-Sólyom Ferencnek**, hogy megtanította a Western blotting technikát, **Dr. Blaskó Andreának** a sok jókedvet.

Köszönettel tartozom **Dr. Uher Ferencnek** az MSC sejtek izolálásáért és a velük kapcsolatos hasznos tanácsaiért, **Hegyi Beának** az MSC sejtek jellemzéséhez nélkülözhetetlen áramlási citofluorimetriás vizsgálatokért. Köszönet illeti **Dr. Katona Róbertet** és **Dr. Blaszó Pétert** a galektin-1 csendesített MSC-k előállításáért. Hálás vagyok **Prof. Dr. Krenács Lászlónak** és **Dr. Bagdi Enikőnek**, valamint munkatársaiknak a dolgozatomban szereplő szövettani metszetek elkészítésében és értékelésében nyújtott segítségéért.

Szeretném hálámat kifejezni **Dr. Vizler Csabának**, a 4T1 és H5V sejtvonalakért ill., hogy megtanított az egér tumor modellekkal kapcsolatos munka végzésére. Köszönöm **Kusz Erzsébetnek**, hogy kölcsön reagensek, gyakorlati tanácsok terén mindig számíthattam rá, **Prof. Dr. Deák Ferencnek** és **Prof. Dr. Kiss Ibolyának**, hogy lehetővé tették a kriosztát használatát, **Prof. Dr. Fekete Évának** és **Bódi Nikolettnek** a paraffinba ágyazott minták előkészítésében, metszésében nyújtott segítségét. Hálás vagyok még **Prof. Dr. Robert Kissnek** (Free University of Brussels) a kísérleteimben használt B16F10 egér melanóma sejtvonalaért.

Lekötelezettje vagyok **Gercsó Andrásné**nak, laborunk kiváló asszisztensének munkájáért és **Veres Erikának**, valamint az SZBK Állatház munkatársainak a mindennapi remek együttműködő légkörért és **Dr. Ferhan Ayaydinnak** a konfokális mikroszkópiában nyújtott szakmai támogatásáért.

Szeretném köszönetemet kifejezni **Börcsök Szilveszternének** az izolált tüdőkről készült fényképekért és **Tóth Sándornének** az ábrák elkészítésében nyújtott segítségéért.

Végezetül, de nem utolsó sorban hálás vagyok **Szüleimnek**, hogy mindenben támogattak és még gyermekkoromban megszeretették velem a biológiát, **Kiss György** csillagásznak, hogy a szakkörében eltöltött közel egy évtized alatt megtanított a természettudományok alapjaira. Rendkívül hálás vagyok **Révész Péter** gimnáziumi biológia tanáromnak az áldozatos és önzetlen nevelő munkájáért, valamint szeretném megköszönni a feleségemnek, **Nellinek**, hogy doktori tanulmányaim során mindenben mellettem volt.

A munkához nyújtott pályázati támogatások: OTKA 69047, OTKA PD 75938, NKTH-OTKA CK 78188 és NKTH-OTKA CK 78007.