

A mezenhimális őssejt-eredetű galektin-1 meghatározó faktor a
felnőtt szöveti őssejtek pro-angiogén funkciójában

Ph.D. értekezés

Kriston-Pál Éva

*Témavezető: Monostori Éva, Ph.D., D.Sc.
tudományos tanácsadó*

SZTE TTIK, Biológia Doktori Iskola
MTA SZBK, Genetikai Intézet

Szeged

2014

Tartalom

I. Rövidítések jegyzéke.....	5
II. Bevezetés.....	8
III. Irodalmi áttekintés	9
Fiziológiás érképződés.....	9
Embrionális érképződés	9
Posztnatális érképződés	9
Angiogenezis mechanizmusa.....	10
Modellrendszerek az érképződés <i>in vitro</i> tanulmányozására	12
Tumor angiogenezis.....	13
Mezenhimális őssejtek szerepe a daganatfejlődésben	14
A mezenhimális őssejtek és a tumor sztróma kapcsolata	14
A tumor sztróma szerepe az immunszuppresszió kialakításában	15
Galektin-1	17
A galektin-1 jellemzése	17
A Gal-1 fiziológiás hatása.....	18
A Gal-1 tumor növekedésre gyakorolt hatása.....	19
IV. Célkitűzések.....	22
V. Anyagok és módszerek	24
Emlős sejt kultúrák fenntartása.....	24
Pre-vaszkuláris struktúra teszt	24

Szolubilis faktorok vizsgálata Transwell® rendszerben.....	24
Extracelluláris mátrix bevonatú lemez készítése	25
Kondicionált médium készítés.....	25
Sejtosztódás gátlás Mitomycin C-vel	25
Sejtek osztódásának analízise áramlási citometriával	25
Sejtfelszíni ill. összes galektin-1 kimutatása áramlási citométerrel	26
Tiodigalaktózid kezelés	27
MSC-k jelölése CellTracker™ CM-DiI fluoreszcens festékkel	27
Venus fluoreszcens fehérjét kifejező H5V sejtek előállítása.....	27
Ko-kultúra vizsgálata konfokális mikroszkóppal	28
Egér tumor modellek	28
Szövettani vizsgálatok	29
Statisztikai analízis	29
VI. Eredmények.....	30
Ko-kultúrában tartott MSC és H5V sejtek módosítják egymás osztódását és életképességét	30
Az MSC-k Gal-1 termelése befolyásolja a H5V-MSC ko-kultúrában kialakuló pre-vaszkuláris sejtcsoportosulások hosszát	32
A pre-vaszkuláris struktúrák kialakulásához közvetlen sejt-sejt kapcsolatra van szükség.....	34
A struktúrák létrehozásában mind a H5V, mind az MSC részt vesz.....	36
Az MSC-eredetű Gal-1 meghatározó faktor a pre-vaszkuláris struktúrák kialakulásában.....	37

Az MSC Gal-1 függő módon serkenti a tumor növekedést mind ko-transzplantációs, mind meglévő tumor intravénás kezelése esetében	38
MSC ^{vt} nem a tumor ellenes immunválasz gátlásával serkenti a tumor növekedést ...	39
Az MSC-eredetű Gal-1 szerepet játszik a daganatszövet vaszkularizációjában.....	40
VII. Következtetések	42
VIII. Irodalomjegyzék	48
IX. Saját közlemények.....	57
X. Összefoglalás	58
XI. Summary.....	61
XII. Köszönetnyilvánítás	63
XIII. Függelék.....	65
A vad típusú és Gal-1 hiányos MSC egyaránt differenciáltható adipocita és oszteocita irányba	65
A vad típusú és Gal-1 hiányos MSC-k egyaránt hordozzák az MSC kritériumnak megfelelő markereket	66
Az MSC ^{vt} és a H5V endotél sejtek felszínéről kimutatható a Gal-1 jelenléte, míg a MSC ^{Gal-1^{-/-}} esetén nem detektálható	67
Pufferek, oldatok.....	68

I. Rövidítések jegyzéke

4T1: egér emlőkarcinóma sejtvonala

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

Ang1,2: Angiopoietin 1,2

B16F10: egér melanóma sejtvonala

CD: Cluster of Differentiation (csoportdetermináns fehérjék)

CFSE: Carboxyfluorescein diacetate Succinimidyl Ester

CM-DiI: Chlorometil-1,1'-dioctadecil-3,3,3'-tetrametil-indocarbocianin perchlorate

CRD: Carbohydrate Recognition Domain (szénhidrát-kötő domén)

CTL: Cytotoxic T Lymphocyte (citotoxikus T limfocita)

DMEM: Dulbecco's modified Eagle's médium

DMSO: dimetil-szulfoxid

EC: Endothelial Cell (endotél sejt)

EPC: Endothelial Progenitor Cell (endotél elődsejt)

ECM: Extracelluláris mátrix

EDTA: etilén-diamin-tetraecetsav

F9: egér teratokarcinóma sejtvonala

FCS: Fetal Calf Serum (magzati borjú szérum)

FSP1: Fibroblast Specific protein 1 (fibroblaszt specifikus fehérje 1)

Gal-1: galektin-1

GM-CSF: Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (Granulocita makrofág kolónia-stimuláló faktor)

H5V: egér szív kapilláris endotél sejtvonala

HMGB: High-Mobility Group Box fehérje

HSC: Hematopoietic Stem Cell (Vérképző Óssejt)

HUVEC: Human Umbilical Vascular Endothelial Cell (emberi köldökzsinór ér endotél sejt)

IFB: Immunfluoreszcencia puffer

IgG: Immunglobulin G

IL-8: Interleukin-8

IFN- γ : Interferon-gamma

LIF: Leukemia Inhibitory Factor (Leukémia gátló faktor)

M-CSF: Macrophage Colony-Stimulating Factor (Makrofág kolónia-stimuláló faktor)

MIP-2: Macrophage Inflammatory Protein 2 (Makrofág gyulladáscsökkentő fehérje 2)

MMC: Mitomycin C

MSC: Mesenchymal Stem Cell (mezenhimális őssejt)

MSC^{Gal-1^{-/-}}: galektin-1 hiányos mezenhimális őssejt

MSC^{vt}: vad típusú mezenhimális őssejt

NO: nitrogén monoxid

PBS: Foszfáttal pufferelt fiziológiás sóoldat

PC: Pericyte Cell (pericita sejt)

PECAM-1: Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule (Vérlemezke endotél sejt adhéziós molekula)

PI: propídiium jodid

RPMI: RPMI 1640 Médium

SCID: Severe Combined Immunodeficiency (súlyos, kombinált immunhiány)

TAF: Tumor-associated Fibroblast (tumorhoz társuló fibroblaszt)

TC1: egér tüdőkarcinóma sejtvonal

TDG: tioglaktózid vagy (D-Galaktopiranozil)-b-D-tiogalaktopiranozid

Th: T helper Cell (segítő T sejt)

TNF- α : Tumor Necrosis Factor alpha (Tumor nekrozis faktor alfa)

T_{reg}: Regulatory T Cell (szabályozó T sejt)

VE-cadherin: vascular endothelial- cadherin (ér endotél kadherin)

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor (ér endotél növekedési faktor)

VSMC: Vascular Smooth Muscle Cell (vaszkuláris simaizom sejt)

II. Bevezetés

A tumorigenezis során az egészséges sejtek növekedést szabályozó génjeiben mutációkat halmoznak fel, melynek következtében kikerülnek a szigorú kontroll alól, és korlátlan osztódásnak indulnak. A tumorsejtek önmagukban azonban nem lennének képesek az egész szervezetet érintő megbetegedés kialakítására, ehhez szükség van arra, hogy a fennmaradásukat támogató kötőszövettel, tumor-asszociált sztrómával rendelkezzen, mely extracelluláris mátrixból, valamint különféle sejtípusokból, például fibroblasztokból, endotél sejtekből, pericitákból/ér simaizom sejtekből, immunsejtekből tevődik össze. A tumorsejtek és a sztróma komponensek egymásra gyakorolt hatásának eredményeként alakulnak ki a sokszor leküzdhetetlennek bizonyuló daganatos megbetegedések.

A daganat kötőszöveti sejtjeinek eredete nem teljesen ismert. Egyik forrása a csontvelői mezenhimális őssejtek (MSC-k) lehetnek. A mezenhimális őssejtek - más néven felnőtt szöveti őssejtek – olyan multipotens sejtek, melyek kis százalékban valamennyi szövetben megtalálhatók, fiziológias feladatuk a szervek kötőszövetének megújítása. Az MSC-k a tumorsejtekből felszabaduló faktorok hatására a tumorba vándorolnak. A daganatszövethez érve heterotípusos kapcsolataik, szekretált molekuláik vagy fibroblasztá és ereket támogató pericitákká/ér simaizom sejtekké történő differenciáció révén támogatják a tumor fejlődését. Az MSC-k nagy mennyiségben termelik a galektin-1 (Gal-1) szénhidrát kötő fehérjét, melynek funkciója a daganatfejlődés szempontjából kevésbé ismert. Munkánk során ezért arra a kérdésre kerestük a választ, hogy az MSC-eredetű Gal-1 milyen szerepet játszik a mezenhimális őssejtek tumornövekedést befolyásoló hatásában.

III. Irodalmi áttekintés

Fiziológiás érképződés

Embrionális érképződés

A keringési rendszer fontos szerepet tölt be a tápanyagok és az oxigén szövetekhez, az anyagcseretermékek szövetektől való elszállításában, a távoli szervek hormonális kommunikációjának biztosításában, valamint a gyors immunválasz kialakításában.¹ Az embrionális fejlődés során a mezodermális eredetű angioblasztok *in situ* differenciációjával alakulnak ki az endotél sejtek (EC, endothelial cell), melyek primitív vaszkuláris labirintussá rendeződnek össze. Ezt a folyamatot nevezzük vaszkulogenezisnek.¹ Már ebben a fejlődési állapotban kimutatható, hogy mely endotél sejtek helyezkednek el artériákban, melyek vénában, vagyis ez a jelleg genetikailag meghatározott.^{2,3} A vaszkulogenezissel ellentétben az angiogenezis alapját nem plasztikus őssejtek, hanem a már kialakult erek jelentik. Az embrió növekedésével a primitív érhálózat növekszik tovább és rendeződik újjá, hogy egy komplex hálózatot alkosson.⁴ Ez a folyamat egészül ki az intusszusceptív angiogenezissel, mely során az endotél sejtek az ér lumene felé növekednek, majd az EC-k közti kapcsolatok átrendeződésével a lumen megkettőződik.⁵

Posztnatális érképződés

Felnőtt szervezetben az új erek képződése szigorúan szabályozott, csak ritkán figyelhető meg. Az endotél sejtek proliferációját igénylő folyamat rendszerint endogén regenerációhoz, valamint sebgyógyuláshoz kapcsolható,⁶ illetve női reproduktív működés során tapasztalható: menstruációs ciklus alatt az endometriumban, a terhesség során a méhlepényben és az emlőben.⁷ A hosszú ideig tartó, megerőltető fizikai igénybevételnek kitett szívben és a vázizomban is megfigyelhető, mely során az izmok tömeggyarapodása az angiogenezis beindulásával valósulhat meg.⁸

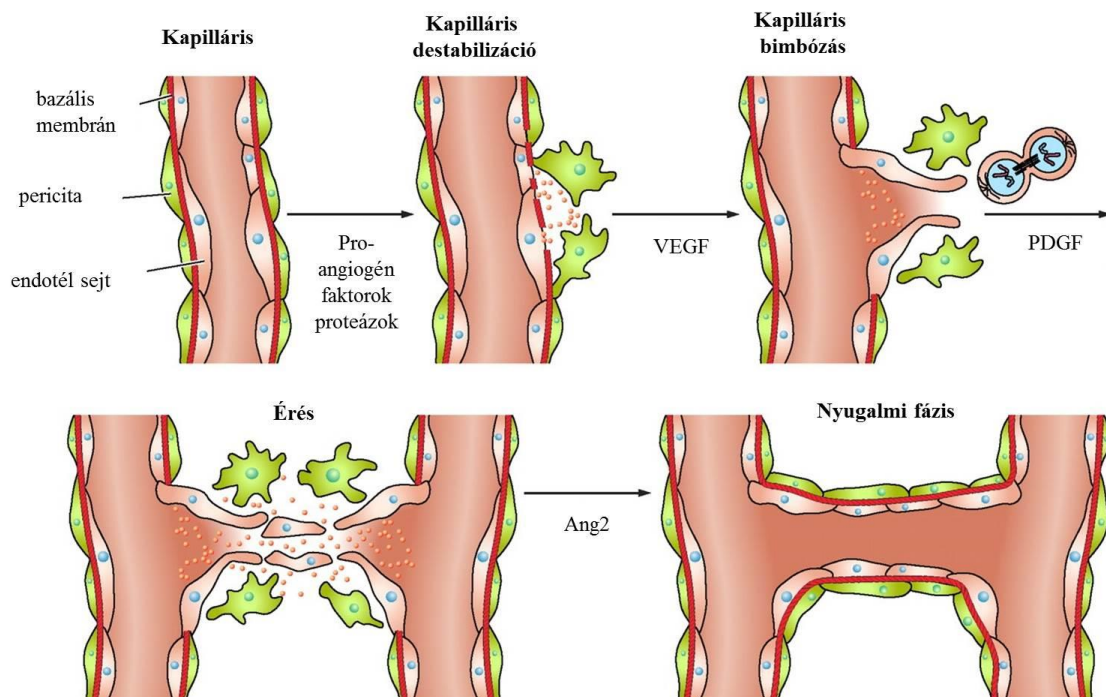
Az embrionális érképződéshez hasonlóan posztnatálisan a vaszkulogenezis - melyet a keringő, csontvelői-eredetű endotél progenitor sejtek (EPC, endothelial progenitor cell) biztosítanak, - valamint az angiogenezis és az intusszusceptív

angiogenezis folyamata is megfigyelhető.⁹ Mivel az angiogenezisről áll rendelkezésre a legtöbb információ, így annak lépéseit részletezzük a következő fejezetben.

Angiogenezis mechanizmusa

Az angiogenezis kezdeti lépései

Az angiogenikus hajtások megjelenését az érképződést serkentő (pro-angiogén) és gátló (anti-angiogén) faktorok egyensúlya határozza meg. A szervezet növekedését kísérő hipoxiás állapot hatására ez a finoman hangolt egyensúlyi állapot megbomlik, és számos pro-angiogén faktor [VEGF (vaszkuláris endoteliális növekedési faktor), Ang2 (Angiopoietin 2), NO (nitrogén-monoxid), IL-8 (Interleukin-8) stb.] kezd termelődni.¹⁰ Ezen faktorok hatására beinduló folyamatokat, amelyek az alábbiakban részletezésre kerülnek, Carmeliet foglalta össze (II. 1. ábra).¹¹ A VEGF szekréciója, valamint a sejteket összekapcsoló PECAM-1 (Vérlemezske és endotél sejt adhéziós molekula) és VE-cadherin (Vaszkuláris endoteliális-cadherin) adhéziós molekulák közötti kölcsönhatások átrendeződése növeli az erek permeabilitását, így a plazmaproteinek extravazációját, segítve az endotél sejtek vándorlását. Az EC-k migrációjához az érett erek stabilitásának meg kell bomlania. Ez a folyamat a homotípusos endotél-endotél sejtek, heterotípusos endotél – periendotheliális sejtek [vaszkuláris simaizom sejtek, (VSMC-k) és periciták (PC-k)], valamint az endotél sejtek bazális membránnal kialakult kapcsolatainak fellazulásával válik lehetővé. Ebben a folyamatban játszik szerepet a Tie2 receptorhoz kapcsolódó gátló ligandum, az Ang2, mely hatására az EC-k adhéziós kölcsönhatásainak felbomlása fokozódik. Az EC-k által termelt proteinázok, mátrix metalloproteinázok és heparanázok szekréciójával lehetővé válik, hogy az aktivált EC-k az extracelluláris mátrixba (ECM) vándoroljanak. Ezen felül további, mátrixban kötött növekedési faktorok szabadulnak fel [pl. VEGF, bFGF (bázikus fibroblaszt növekedési faktor), IGF-1 (Inzulin-szerű növekedési faktor-1)], melyek tovább serkentik az angiogenezist folyamatát. Amikor a fizikai akadály elhárult a sejtek vándorlása előtt, az EC-k osztódni kezdenek és nagy távolságokra is képesek eljutni, melynek irányát a pro-angiogén növekedési faktorok koncentráció grádiense határozza meg. Azután az EC-k először tömör húrrá kapcsolódnak össze, melyben végül kialakul a lumen.



II. 1. ábra. Az angiogenesis folyamata. A kapillarisokat nyugvo endotel sejtek bélelik, melyek pro-angiogen stimulusra aktiválnak. Proteázok termelésével megbontják a bazális membránt, majd a periciták leválását követően vándorolni és osztódni kezdenek. Az EC-k osztódásuk után összerendeződnek, majd a periciták kapcsolódását követően az újonnan kialakult erek nyugalmi fázisba kerülnek. (Clapp és mtsai nyomán)¹²

Érés és nyugalmi fázis

Úgy tűnhet, hogy az érképződés során az endotel sejtek játsszák a fő szerepet, azonban az érett, funkcionális erek kialakulásához periendoteliális sejtek kapcsolódására is szükség van. Bár VSMC-ket és pericitákat molekuláris markerek alapján nem lehet megkülönböztetni egymástól, működésükben azonban eltérők: VSMC-k a nagy erek stabilitását biztosítják és a véráramlás szabályozásában vesznek részt, míg a periciták kapillarisoknál találhatóak és az erek bimbózását irányítják, valamint a terminációt segítik elő.¹³

A csupasz ereket alkotó EC-kból kemoattraktánsok [VEGF, PDGF-BB (vérlemezke-eredetű növekedési faktor), Ang1] szabadulnak fel, melyek a periendoteliális sejtek kapillarisok felé vándorlását indítják be.¹⁴ A támasztósejtekkel nem borított erek rövidebb ideig működnek,¹⁵ azonban a heterotípusos sejtkapcsolatok kialakulását, a támasztósejtek ECM termelését és az általuk szekretált érképződésgátló

faktoraik szekrécióját [pl. TGF- β (Transzformáló növekedési faktor-béta)] az erek nyugalmi fázisa követi, ez esetben a túlélésük években mérhető.¹⁶

Modellrendszerek az érképződés *in vitro* tanulmányozására

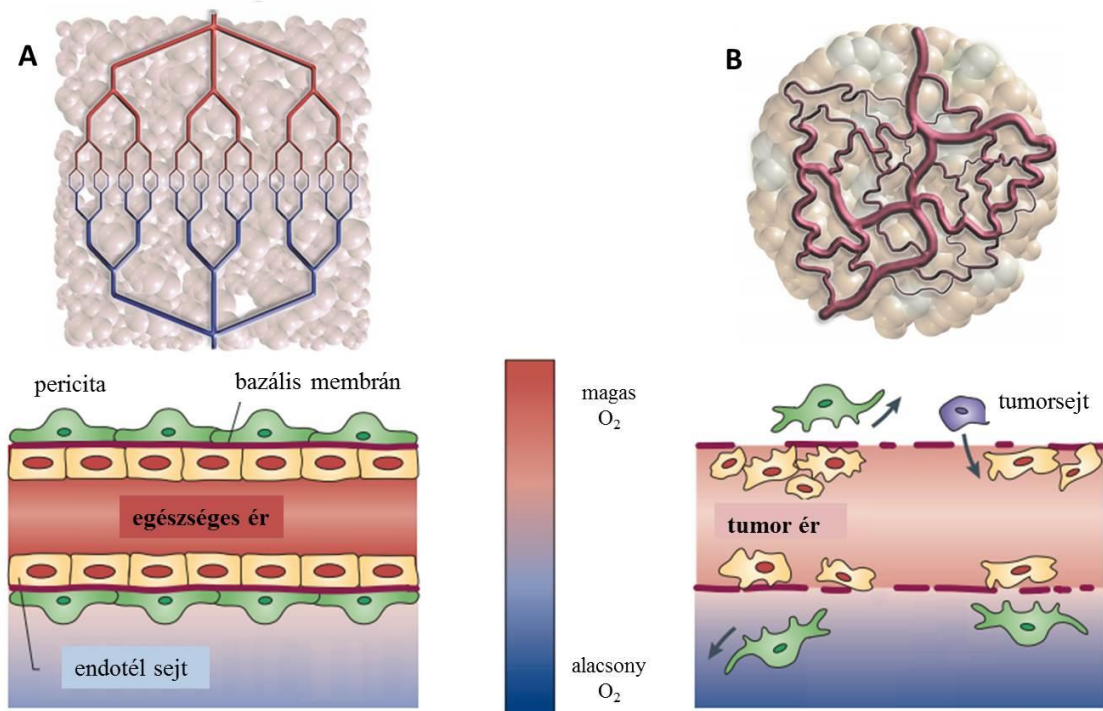
Számos *in vitro* kísérleti rendszer létezik, melyek alkalmasak az angiogenezis folyamatának vizsgálatára. Az angiogén stimulusra beinduló érképződés egy-egy lépésének tanulmányozására szolgálnak többek között a következő rendszerek: a) a metalloproteináz próba - ahol az aktivált EC-k által termelt mátrixbontó enzimek szekréciójáról kaphatunk információt; b) az endotél sejtek osztódásának követése; c) az EC sejt-vándorlás (wound healing próba), valamint d) a kemotaxis teszt, mely a pro-angiogén faktorok és egyéb kemoattraktánsok felé történő migrációról nyújt információt.¹⁷

Azokban a kísérleti rendszerekben, melyekben prevaszkuláris struktúrák kialakulását indukálják, az angiogenezis későbbi fázisa, a differenciáció tanulmányozható.¹⁷ Többféle rendszer is létezik, melyek az EC-k ilyen jellegű morfológiai változását indukálják. A fő különbség köztük az, hogy a struktúrák háromdimenziós (3D) ECM-en/ben, vagy kétdimenziós (2D) tenyészetben jönnek létre. Az első esetben kollagént, fibrint, vagy Engelbreth-Holm-Swarm szarkómasejtek által termelt ECM fehérje keveréket (Matrigel-t) alkalmaznak a leggyakrabban.¹⁸ A 3D-s Matrigel-en azonban nem csak endotél sejtek képesek érszerű struktúrákat létrehozni, hanem fibroblasztok, valamint különböző tumorsejtek is, így ez a modell nem alkalmas az endotél sejtek differenciációjának tanulmányozására.¹⁹ A pre-vaszkuláris struktúrák kialakulásához szükséges ECM azonban úgy is biztosítható, hogy az EC-eket periendoteliális sejtekkel növesztik együtt, így a tubulusok 2D-s tenyésztést követően rendeződnek össze. A pre-vaszkuláris hálózatok létrejöttéhez szükséges extracelluláris mátrixfehérjéket, ebben a kísérleti rendszerben, a simaizom sejtek vagy periciták biztosítják.²⁰ Ezt a folyamatot serkentik, vagy gátolják a sejtekhez adott pro- ill. anti-angiogén faktorok, így ez a modell rendszer alkalmas arra, hogy különböző molekulák érképződésre gyakorolt hatását tanulmányozzuk.²¹ Az így nyert eredmények közvetlenül természetesen nem fordíthatók le az élő szervezetben végbemenő érképződésre, ezek *in vivo* körülmények között megerősítést igényelnek.

Tumor angiogenezis

Hanahan és Weinberg nyolc biológiai folyamatot nevezett meg, melyek jellemezőek a rosszindulatú daganatképződésre: az apoptózis elkerülése, a növekedést serkentő ill. gátló faktoroktól való függetlenedés, a korlátlan osztódás, a szöveti invázió és metasztázis, az angiogenezis, az immunszuppresszió, az aerob glikolízis és a tumor őssejtek szimmetrikus önmegújító képessége.^{22,23} A tumorsejtek önmagukban nem képesek a szervezetben túlélni és szaporodni, szükségük van arra, hogy egészséges sejteket a daganatszövet fejlődésének támogatására alakítsák át. Így jön létre a tumor kötőszöve, vagyis a tumor-asszociált sztróma, mely főként endotél sejtekből, fibroblasztokból, immunsejtekből, extracelluláris mátrixból tevődik össze. A tumorsejtek és mikrokörnyezetük dinamikus kölcsönhatása parakrin faktorok termelése által valósul meg, mely a tumorszövet folyamatos változását és fejlődését segíti, és végső soron halálos betegséghez vezet.²²

A tumor erek kialakulása többlépcsős, összetett folyamat. Folkman-tól származik az a felismerés, miszerint a szilárd daganatok új erek képzése nélkül csak néhány mm³-es nagyságig tudnak növekedni.²⁴ A szilárd daganatokban hipoxiás területek alakulnak ki növekedésük során, ez serkenti az érképződési kaskád beindításáért felelős faktorok termelődését.²⁵ A tumorok esetén is többféle érképzési stratégia érhető tetten, de közülük is az angiogenezis folyamatáról áll birtokunkban a legtöbb információ. Ennek lépései a korábban részletezett fiziológiás angiogenezishez hasonlóak.²⁶ Ugyanakkor a tumor erek szerkezetileg, és ebből kifolyólag működésben is jelentősen eltérnek az egészségesektől. A jellemző eltérések a következők (II. 2. ábra): (1) gyakran mozaikosak felépítésűek, vagyis az EC-ek mellett tumorsejtek is bélelhetik az erek falát, melyet a tumorsejtek vaszkulogén mimikrijének nevezünk;²⁶ (2) a tumor erek gyakran kitágultak, tekervényesek, melyekben a kaotikus és lassú véráramlás nem biztosítja a zavartalan anyagcseréhez szükséges feltételeket;²⁷ (3) a periciták és az EC-k közötti gyengébb kapcsolat és a tumor erek periendoteliális sejtek általi részleges borítottsága kontrollálatlan permeabilitást eredményez;²⁸ (4) a bazális membrán sem borítja teljesen az endotél sejteket, mely hozzájárul a metasztázis képzés valószínűségének növekedéséhez.¹³



II. 2. ábra. Egészséges és tumor erek morfológiája és szerkezete. A: Az egészséges erek egyenletesen hálózják be a szöveteket, endotél sejtjei szoros kapcsolatban vannak egymással, abluminális felszínüket egységesen fedi a bazális membrán, melyhez periciták asszociálódnak. B: A tumor erek tekervényes lefutásúak, ezen erek sejtés és bazális membrán borítása nem homogén, a tumorsejtek könnyebben bejuthatnak a vérkeringésbe. (Carmeliet és mtsai, valamint Jain és mtsai nyomán)^{13,29}

Mezenhimális őssejtek szerepe a daganatfejlődésben

A mezenhimális őssejtek és a tumor sztróma kapcsolata

A tumor sztróma elengedhetetlen a daganat növekedése szempontjából. Ahogy az előbbi fejezetben olvashattuk, a sztrómát különböző, a tumor sejtek által termelt faktorok hatására, a normálistól eltérően működő sejtfeleség építik fel. Az endotél sejtek az endoteliális progenitor sejtekből, ill. a környező szövetek endotél sejtjeiből származnak,²⁶ míg a tumor-asszociált fibroblasztok (TAF-ok), valamint a periendoteliális sejtek (periciták, vaszkuláris simaizom sejtek) egy közös prekursorból, a mezenhimális őssejtekből eredeztethetők.²²

A mezenhimális őssejtek (MSC-k)- más néven felnőtt szöveti őssejtek – olyan multipotens sejtek, melyek kis százalékban valamennyi szövetben megtalálhatók,

fiziológiás feladatuk a szervek kötőszövetének megújítása.³⁰ Specifikus, csak az MSC-re jellemző molekuláris markerek hiányában a következő kritériumok alapján neveznek egy sejtípust MSC-nek:³¹

- 1) a tenyésztőedényhez tapadó, adherens sejt
- 2) sztróma sejtekre jellemző markereket fejez ki, mint például CD73, CD105, CD44, CD29, CD90, de vérképző sejt (hematopoetikus) markereket CD34, CD45, CD14, valamint endotél sejtre jellemző molekulákat (CD31, von Willebrand faktor) nem termel.
- 3) multipotens sejtek révén, megfelelő tenyésztési körülmények között, mezodermális irányba - tehát csont-, zsír-, porc-, sejtekké - differenciálthatók.³²

Az MSC-k nem csak az egészséges szövetek önmegújító komponensei, de a tumor mikrokörnyezetben is megtalálhatók. Ezek az ún. tumor-asszociált MSC-k a környező szövetekből, például zsírszövetből származhatnak, de jelentős mennyiségük a csontvelőből mobilizálódik.³³ A tumorba kerülő MSC-k kisebb hányada megtartja differenciálódási képességét, míg jelentős részük tumor sztróma sejtekké differenciálódik,³⁴ és különböző módokon befolyásolja a tumor növekedését. Quante és kutatócsoportja kimutatta, hogy a tumorban megtalálható TAF-ok több mint 20%-a csontvelői-eredetű MSC-ből alakul ki.³⁵ A tumor kötőszövet más sejtjei, mint az α -SMA-t, vimentint és FSP1-et (fibroblaszt specifikus fehérje 1) termelő miofibroblasztok is csontvelői MSC-kből származnak.³⁶

Az MSC-k egészséges kísérleti állatba juttatva pár napig mutathatóak csak ki a tüdőből, veséből, majd rövid időn belül eltűnnek a szervekből.³⁷ Abban az esetben, ha a szervezetben daganat található, a tumor területén halmozódnak fel, ahol még hosszú ideig jelen maradnak.³⁷ Több módon támogatják a tumor fejlődését, melyek közül bővebben az immunszuppresszív és az érépződés serkentő hatásukat részletezzük.

A tumor sztróma szerepe az immunszuppresszió kialakításában

A szilárd daganatok soha nem gyógyuló sebként definiálhatóak, éppen ezért a krónikus gyulladásra jellemző folyamatok zajlanak környezetükben.³⁸ Jellemző rájuk, hogy a folyamatos térfogat növekedés hatására a daganat belsejében elhelyezkedő

tumorsejtek oxigén és tápanyaghiány következtében nekrotizálódnak, melynek következtében gyulladáskeltő faktorok, például Interleukin-1 (IL-1) és HMGB (High-Mobility Group Box) fehérje szabadul fel.³⁹ A pro-inflammatorikus faktorok két fő módon járulnak a tumor mikrokörnyezet átalakulásához: egyrészt az angiogenezis beindításával, mely elősegíti a megfelelő tápanyag és oxigénellátást, másrészt az immunsejtek tumorszövethez történő vándorlásának támogatásával.⁴⁰ Ez utóbbi jelenség ellentmondása, hogy bár különféle immunsejtek vándorolnak a tumorszövethez, ezek mégsem akadályozzák meg a betegség előrehaladását, melynek hátterében az immunválaszt gátló sejtek és faktorok túlsúlyba kerülése áll.⁴¹

A tumoros környezetben kialakuló immunszuppresszív folyamatok egyik fő szereplőjének a tumorhoz vándorló MSC-eket tartják, amelyek a gyulladással kapcsolatos citokinek hatására TGF- β -t kezdenek termelni, ezáltal gátolják a daganatsejtek elpusztítására képes immunsejtek funkcióját.⁴² Ezt erősíti egy további eredmény, miszerint melanóma-eredetű gyulladással kapcsolatos citokinek, úgy mint az Interferon-gamma (IFN- γ) és a Tumor nekrozis faktor-alfa (TNF- α) hatására az MSC-kben megnő az indukálható nitrogén oxid szintáz (iNOS) szintje, mely a T sejtek osztódását gátló NO-t biztosítja.⁴³ Leírták továbbá, hogy az MSC immunszuppresszivitásához az említett faktorok mellett IL-10 (Interleukin-10), az indolamin-oxidáz (IDO)⁴⁴, és a prosztaglandin E₂⁴⁵ is hozzájárul.

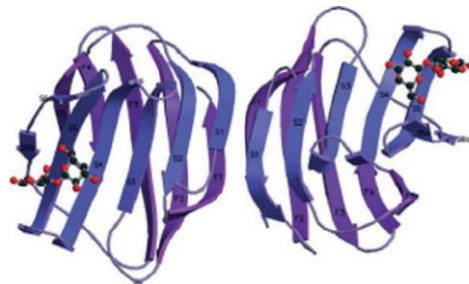
Kawakami és munkatársai kimutatták, hogy egy másik sztróma alkotó sejtfeleség, a részben MSC-ből kialakuló TAF-ok is befolyásolják a tumor ellen irányuló immunológiai folyamatokat. A tumor-asszociált fibroblasztok *in vivo* specifikus elpusztításával bizonyították, hogy a TAF-ok hatására a mikrokörnyezetük citokin profilja Th1 felől Th2 felé tolódik. Megállapították, hogy a TAF-ok által termelt IL-4 és IL-6 fontos szerepet játszik ebben a folyamatban. Az IL-4 receptort több tumor típuson leírták, ligandjának bekötődése a tumorsejtek proliferációját váltja ki.⁴⁶ A monocitákból IL-6 jelenlétében pedig elsősorban makrofág differenciálódik dendritikus sejt helyett,⁴⁷ melyek az MSC-vel való közvetlen kapcsolódás hatására IL-10-et termelnek.⁴⁸ A TAF-ok más típusú immunszuppresszív sejtek, a Treg-ek tumorsztrómába történő vándorlását is elősegítik, melyek közvetlenül gátolják a tumor specifikus T sejtek aktivációját, osztódását és effektor működését.⁴⁹

A tumorsejtek maguk is termelhetnek immunszuppresszív faktorokat, amelyek a sztrómális sejtekkel karöltve gátolják a potenciális tumorellenes immunsejtek működését és támogatják a daganat fejlődését.

Galektin-1

A galektin-1 jellemzése

A mezenhimális őssejtek nagy mennyiségben termelik a galektin-1 (Gal-1) lektint, mely a 15 tagú galektin család elsőként leírt tagja. A galektin-1 egy 135 aminosav hosszúságú konzervált szénhidrát-kötő doménből (CRD) áll, mellyel β -galaktozidok tartalmú glikokonjugátumokhoz kapcsolódik.⁵⁰ A Gal-1-t az *LGALS1* gén négy exonja kódolja, mely a 22-es kromoszóma rövid karján helyezkedik el.⁵¹ Monomerként és nem-kovalens homodimerként is előfordul (II. 3. ábra), mindkét formában képes szénhidrátot kötni, melyet van der Waals kölcsönhatás és hidrogénkötések stabilizálnak.⁵² Oxidált formában is előfordul, de ilyen formában nem köt szénhidrátot.⁵³



II. 3. ábra: A dimer galektin-1 szerkezete. A homodimer Gal-1 globuláris szerkezetét egy 6-szálú és egy 5-szálú anti-parallel lefutású β -lemez hozza létre. N- és C-terminálisa a dimerizációs rész felé tekintenek, a CRD domének cukor-kötőhelyeiben a kapcsolódó laktóz van feltüntetve. (Camby és mtsai nyomán)⁵⁴

A Gal-1 citoplazmatikus fehérjékre jellemző tulajdonságokkal rendelkezik, vagyis nem hordoz szignál szekvenciát, nem glikozilált és N-terminálisa acetilált.⁵⁵ Ennek ellenére a Gal-1 mind sejten belül (sejtmagban és sejtplazmában), mind sejten kívül (sejtfelszínen, extracelluláris mátrixhoz kötődve) kimutatható.⁵⁶ Szignál szekvencia

hiányában a Gal-1 nem az endoplazmatikus retikulum/Golgi konvencionális szekréciónál utvonalon keresztül szekretálódik, hanem a bFGF-hez hasonlóan, eddig még részleteiben nem ismert módon kerül a sejteken kívül.⁵⁷ Kísérleti adatok alapján feltételezhetjük, hogy a szekréciónál szerepet játszanak a Gal-1-kötő glikozilált struktúrák, mivel ezek hiányában a Gal-1 transzport nem történik meg. Ennek a folyamatnak a mechanizmusa még feltárára vár.⁵⁸

Szekréciónál után a Gal-1 a termelő, vagy a szomszédos sejtek Gal-1-kötő glikokonjugátumaihoz, illetve extracelluláris mátrix komponensekhez⁵⁹ (laminin, fibronektin, thrombospondin, vitronektin, oszteopontin) kapcsolódik. Számos sejt felszíni glikoprotein Gal-1-kötő aktivitását azonosították^{60,61} melyek között integrinek ($\alpha_7\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$) és T sejt felszíni receptorok (CD2, CD3, CD4, CD7, CD43, CD45) is találhatóak.

A Gal-1 fiziológiás hatása

A Gal-1-nek számos funkcióját leírták, amely eltérhet a különböző sejt típusok esetén: befolyásolja a sejtek osztódását, differenciációját, adhézióját, effektor funkcióját és apoptózist is. Az elsőként leírt funkció az izomsejtekkel kapcsolatos: a mioblastok differenciációjakor az addig kizárólag sejten belüli Gal-1 szekretálódik és megakadályozza a laminin és az integrin kapcsolódását, azaz a sejtek adhézióját az extracelluláris mátrixhoz, így lehetővé válik az egyes mioblastok miotubulusokká olvadása.⁶² A Gal-1 az idegrendszer fejlődésében is szerepet játszik, serkenti a dorzális ganglionok, valamint a szagló idegek növekedését, elősegíti a Schwann sejtek vándorlását, valamint az érző és a motoros neuronok regenerációját.⁶³

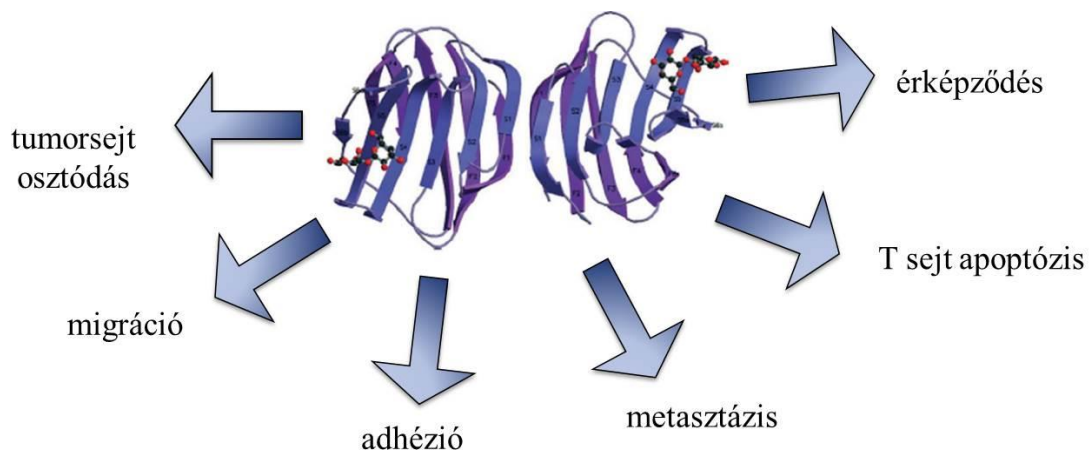
Az immunhomeosztázis fenntartásában kiemelt feladatot tulajdonítanak a Gal-1-nek a gyulladás csökkentő, immunszuppresszív hatása miatt.⁶⁴ Erre a szerepére utal, hogy fiziológiásan elsősorban az immunprivilegizált területeken mutat fokozott expressziót, például a méhlepényben⁶⁵ és az ivarszervekben.⁶⁶ A Gal-1-nek szerepe van az anyai magzat-tolerancia kialakításában is, ugyanis allogén apától származó utódok nagyobb arányban abortálódtak Gal-1 knockout anyákban, mint vad típusúban.⁶⁵

Munkánk során azt is megállapítottuk, hogy a funkcionális immunválasz szabályozása mellett, a Gal-1 a hematopoietikus őssejtek (HSC) differenciációját is

befolyásolja. Hatását bifázikusan fejt ki: kis koncentrációban (10 ng/ml) serkenti a HSC-k osztódását és túlélését, míg nagy mennyiségben (10 µg/ml) gátló hatásának bizonyult.⁶⁷

A Gal-1 tumor növekedésre gyakorolt hatása

A Gal-1 számos szolid tumorban fokozottan fejeződik ki: például tüdőrák⁶⁸, prosztatata karcinóma⁶⁹, asztrocitóma, pajzsmirigy-, vastagbél- és petefészekrák, melanóma és neuroblasztóma.^{70,71} A hipoxia a tumorfejlődés korai szakaszától jellemzi a szilárd tumorokat, mely a Gal-1 expresszió egyik stimulátora.⁷² A fehérje kifejeződése korrelációt mutat a tumor agresszivitásával és metasztázis képzéssel, vagyis a Gal-1 magas szintje a betegség rossz prognózisával párosul.^{73,74} A patológias folyamatot több ponton is támogatja: serkenti a tumorsejtek osztódását, aggregációját⁷⁵, adhézióját⁷⁶, migrációját⁷⁷, citoszkeleton átrendeződését⁷⁸, az angiogenezist⁷⁹, a tumort infiltráló T sejtek apoptózisát⁸⁰, és így hozzájárul immunprivilegizált környezet⁸¹ kialakításához (II. 4. ábra). Ezen folyamatok közül bővebben a Gal-1 immunválasz gátlására és az angiogenezisre gyakorolt hatását részletezzük.



II. 4. ábra. Gal-1 funkciói, melyek által támogatja a tumor növekedését. Részletes magyarázat a szövegben olvasható.

A Gal-1 immunszuppresszív hatása

A daganatok immunrendszer általi elpusztításának hiánya abban rejlik, hogy a daganat mikro környezetében a tumor-specifikus T sejtek működésének zavara áll fenn. Ehhez a folyamathoz járul hozzá a tumorsejtek és/vagy sztrómális elemek által termelt

Gal-1, mely több ponton is befolyásolja a tumor-ellenes immunválasz lefolyását. Egyrészt a tumor szövetben az aktivált endotél sejtek Gal-1-et termelnek,⁸² ezáltal gátolják a fehérvérsejtek transz-endoteliális migrációját⁸³ (részletesebben a következő alcím alatt kifejtve). Másrészt azok a tumor-specifikus citotoxikus (CTL) ill. T helper (Th) sejtek, amelyek mégis átjutottak az endotél sejtek rétegén, Gal-1 hatására apoptózissal elpusztulnak, vagy válaszképtelenné válnak. A lektin által kiváltott sejthalál mechanizmusának részleteit csoportunk is tanulmányozta.^{84,85} A Th1 sejtekkel ellentétben a Th2 sejtek nem érzékenyek a Gal-1 által kiváltott apoptózisra, mert sejtfelszíni molekuláikra szíálsav oldalláncok kapcsolódnak, melyek gátolják a Gal-1 kötődését.⁸⁶ A magas Gal-1 termelés hatására a daganat mikrokörnyezetében a tumorsejtek elpusztítására alkalmas Th1 felől a tumort segítő Th2 felé tolódik a T sejt alpopulációk mintázata.⁸⁷ A Gal-1 tumor-ellenes immunválasz-gátló szerepét erősen alátámasztja az az eredmény, mely szerint Gal-1 knockout egérben tumor-specifikus Th1 immunválasz váltható ki melanóma ellen, mely a daganat csökkent progressziójával társul.⁸¹ További akadály a tumorsejtek elpusztításában a CTL-ek válaszképtelensége, amely hátterében a T_{reg} (CD25⁺, CD4⁺, FoxP3⁺) sejtek dominanciája áll. A T_{reg} sejtek - amellett, hogy a CTL-ekre citotoxikus Gal-1-et is expresszálnak - immunszuppresszív citokineket (például TGF- β , IL-10) termelve gátolják a CTL-ek perforin és granzym-B szekrécióját, megakadályozva a tumorsejtek hatékony elpusztítását.⁸⁸

A Gal-1 hatása az érképződésre

A Gal-1 nyugvó EC-kben nem fejeződik ki, míg *in vitro* tenyésztett aorta endotél sejtben és HUVEC-ben lipopoliszacharid, kis sűrűségű lipoprotein (LDL) vagy tumorsejtek által kondicionált médium hatására, illetve szövetregeneráció során fellépő angiogeneziskor expressziója gyorsan megnő. A Gal-1 tehát az endotél sejtek aktivációjának korai markerének tekinthető.⁸⁹

Tumorsejtekkel asszociált EC-kben magas Gal-1 expressziót mutattak ki többféle daganattípusban, például Ewing szarkómában⁸⁹, fej-nyaki rákban, tüdőrákban.⁹⁰ Különböző páciensek prosztatárákból származó mintáit összehasonlítva a magasabb Gal-1 expresszió pozitív korrelációt mutatott a tumor sűrűbb erezettségével.⁶⁹

A Gal-1 az érképződés folyamatának több lépését is befolyásolja. *In vitro* a Gal-1 csendesítésével csökken az EC-k proliferációja és vándorlása.⁸⁹ Kemoattraktánsként is hat az EC-kre, és növeli a sejtek életképességét.⁹¹ A Gal-1 a heterotípusos sejt-sejt kölcsönhatásokat is befolyásolja. Egyrészt serkenti a tumorsejtek EC-hez történő adhézióját májrákban, metasztatikus nagy sejt limfómában és prosztatákarcinóma esetén, elősegítve a metasztázis kialakulását.⁹⁰ Másrészt az EC-eredetű Gal-1 gátolja a fehérvérsejtek (neutrofil granulociták és T sejtek) és az endotél sejtek közötti adhéziót és a transzendoteliális migrációt.⁸³ Ezt bizonyítja, hogy az EC-k anti-Gal-1 ellenanyaggal történő kezelése helyreállítja a transzendoteliális migrációt.⁸³ Ugyanakkor a fehérvérsejtek érfalon keresztüli migrációjának szabályozója nem kizárólagosan a Gal-1, hiszen Gal-1 hiányos egér tumorszövetében ugyanannyi leukocita mutatható ki, mint vad típusú egérében.⁸⁹

A Gal-1 tumor erezettségét serkentő hatását bizonyítja az az adat is, miszerint Gal-1 knockout egérben a daganat nem növekedik tovább egy bizonyos méret után, ellentétben a vad típusú egérbe oltott tumorról.⁸⁹ Mikroér sűrűségét tekintve négyszer erezettségesebb a vad típusú egérbe oltott daganatszövet. Ha a Gal-1 knockout egereket Gal-1-et expresszáló tumorsejtekkel kezelik, a tumor erezettséggé válik és jobban növekszik, mivel a tumor-eredetű Gal-1 aktiválja az EC sejteket, így biztosítva az angiogenezist.⁷⁹ Ezt úgy igazolták, hogy összehasonlították a tumor növekedését és erezettségét egy Gal-1-et nagy mennyiségben kifejező tumor sejt, a TC-1 és Gal-1-et gyengén expresszáló tumorsejt, az F9 teratokarcinóma Gal-1 knockout egérbe történő transzplantációját követően. Az eredmények alátámasztották, hogy a Gal-1 termelő tumorsejt tumorképző képessége sokkal nagyobb, mint a Gal-1-et kismértékben kifejező tumorsejt.⁷⁹

A Gal-1 tehát számos módon hozzájárul a daganatok fejlődéséhez, kiváló célpontot szolgáltatva daganatellenes terápiáknak. A tumor-eredetű Gal-1 gátlásával stimulálni lehetne a szervezet immunológiai védekezését, valamint csökkenthető a szilárd daganatok érképződése, mely a metasztázis kialakulásának kockázatát is redukálja.

IV. Célkitűzések

A szilárd daganatok növekedése szempontjából kulcsfontosságú, hogy a daganatsejtek sztrómális elemeket toborozzanak magukhoz, és azokat átprogramozva rábíróják, hogy szolubilis faktoraikkal, heterotípusos kapcsolataikkal, valamint angiogenezis stimulálásával és tumor ellenes immunválasz gátlásával támogassák a tumor fejlődését. A multipotens, minden szövetben fellelhető mesechymalis őssejtek (MSC-k) a sztrómális elemek forrásául szolgálhatnak. Tumoros környezetben az MSC-kből tumor-asszociált fibroblasztok mellett vaszkuláris simaizom sejtek és periciták is differenciálódhatnak, melyek a tumorszövet érdenzitását fokozzák, és hozzájárulnak a daganat kontrollálatlan növekedéséhez. Az MSC-k nagy mennyiségben termelik a Gal-1 fehérjét. Számos tanulmányban bizonyították, hogy a Gal-1 immunsejtekre gátló, endotél sejtekre viszont serkentő hatással bír, az azonban, hogy az MSC-eredetű Gal-1-nek mely hatása érvényesül a daganat fejlődése szempontjából, nem ismert. Ennek feltárásához a következő kérdéseket fogalmaztuk meg:

- 1.) Hogyan változnak a mezenhimális őssejtek és endotél sejtek különböző tulajdonságai együtt tenyésztés hatására:
 - a. Hogyan hatnak az endotél sejtek az MSC-k osztódására, és fordítva? Az MSC-k endotél sejtekre gyakorolt hatása Gal-1 függő módon érvényesül-e?
 - b. Szükséges-e közvetlen sejtkapcsolat kialakulása, vagy elegendő a szolubilis faktorok jelenléte a pre-vaszkuláris hálózat differenciálódásához?
 - c. A pre-vaszkuláris struktúrák kialakításában szerepet játszik-e az MSC-eredetű Gal-1?

- 2.) Szerepet játszik-e a mezenhimális őssejtek által termelt Gal-1 az MSC-k *in vivo* tumorfejlődést támogató funkciójában?
- a. Az MSC-eredetű Gal-1 befolyással van-e a kísérleti állat szervezetében meglevő tumor növekedésére?
 - b. Az MSC-eredetű Gal-1 immunszuppresszív vagy pro-angiogén hatása érvényesül-e a tumor növekedés *in vivo* támogatásában?

V. Anyagok és módszerek

Emlős sejtkultúrák fenntartása

A vad típusú csontvelői mezenhimális őssejt (MSC^{vt}), valamint a galektin-1 knockout mezenhimális őssejt ($MSC^{Gal-1^{-/-}}$) alakultúrát Dr. Uher Ferencről (Országos Vérellátó Szolgálat, Őssejtbiológiai Laboratórium) kaptuk. Izolálásuk vad (C57BL/6) ill. Gal-1 knockout egerek ($B6.Cg-Lgals1^{tm1Rob/J Gal-1^{-/-}}$) femurjainak és tibiáinak velőüregéből történt Peister és mtsai. által leírt módon.⁹² MSC mivoltuk bizonyításához zsírsejt ill. csontsejt irányba differenciáltattuk őket (Függelék, XII. 1. ábra), valamint megvizsgáltuk, hogy hordozzák-e a CD44, CD73, CD90 és Sca-1 (Függelék, XII. 2. ábra). Az egér H5V szív kapilláris endotél sejteket (melyet Dr. Vizler Csaba ajándékozott nekünk, MTA SZBK, Biokémiai Intézet), ill. az MSC-eket penicillin/streptomycinnel (100 IU/ml és 100 µg/ml, PAA), L-glutaminnal (2 mM, Sigma-Aldrich) és 10% hőinaktivált magzati borjú szérummal (FCS, Gibco) kiegészített DMEM (Gibco) szövettenyésztő médiumban növesztettük. A 4T1 egér emlőkarcinóma és a B16F10 egér melanóma sejteket RPMI (Gibco) 10% FCS-t tartalmazó tápoldatban tenyésztettük. Valamennyi sejtet 5% CO₂ koncentrációjú, 37°C-os, párasított inkubátorban növesztettük.

Pre-vaszkuláris struktúra teszt

H5V endotél sejteket MSC^{vt} vagy $MSC^{Gal-1^{-/-}}$ sejtekkel tartottunk közös tenyészetben (ko-kultúrában) 24-lyukú tenyésztőlemezen. Kontrollként monokultúrában növesztett sejteket használtunk. Két nap inkubációt követően öt, véletlenszerűen kiválasztott, nem átfedő látómezőt Olympus IX81 mikroszkóppal figyeltünk meg 40x-es nagyítás mellett és F-View II (Olympus) kamerával fényképeztük le, majd a CellR Imaging szoftver segítségével mértük a pre-vaszkuláris struktúrák hosszát.

Szolubilis faktorok vizsgálata Transwell® rendszerben

H5V endotél sejteket 24-lyukú szövettenyésztő lemezre szélesztettük, majd ráhelyeztük a 0,4 µm pórus méretű Transwell® inszert (Corning) elemet, melybe előzőleg MSC^{vt} -t, $MSC^{Gal-1^{-/-}}$ -t, vagy H5V és MSC^{vt} ko-kultúrát, illetve H5V és

MSC^{Gal-1^{-/-}} ko-kultúrát növesztettünk. Így a sejtek fizikailag elválasztva, de mégis azonos tenyésztőmédiumban növekedhettek. Kontrollként az inszert elembe H5V-t helyeztünk, valamint inszert alkalmazása nélküli, közvetlenül érintkező ko-kultúrákat (H5V és MSC^{vt} ill. H5V és MSC^{Gal-1^{-/-}}) használtunk. Két nap után a tenyésztőlemezen levő H5V sejtek pre-vaszkuláris struktúráképző aktivitását elemeztük a kialakuló struktúrák hosszának mérésével (Izd. Pre-vaszkuláris struktúra teszt fejezet).

Extracelluláris mátrix bevonatú lemez készítése

A MSC^{vt}-t és a MSC^{Gal-1^{-/-}}-t 24-lyukú tenyésztőlemezen konfluenciáig növesztettünk, majd PBS-sel történő mosást követően 10 mM EDTA-val távolítottuk el a sejteket a szövettenyésztő edény aljától.

Kondicionált médium készítés

A MSC^{vt} -t ill. a MSC^{Gal-1^{-/-}}-t 3 cm átmérőjű műanyag Petri csészében 2% FCS tartalmú DMEM tápoldatban tenyésztettük. Három nap inkubációt követően a felülúszót 20 percig centrifugáltuk (3000 x g) szobahőmérsékleten.

Sejtosztódás gátlás Mitomycin C-vel

Az osztódásukban blokkolni kívánt sejteket tenyésztőedénybe tettük, majd kitapadás után 4 µg/ml koncentrációban hozzáadtuk a Mitomycin C-t (MMC) (Sigma-Aldrich) és 16 órán keresztül inkubáltuk 37°C-on. A kezelési idő elteltével, a gátolt sejtekről (jelölésük a továbbiakban: sejtvonala_{MMC}) eltávolítottuk a médiumot, majd PBS-sel mostuk.

Sejtek osztódásának analízise áramlási citometriával

A H5V sejtek osztódásának méréséhez CellTrace™ CFSE (Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester, Invitrogen) fluoreszcens festéket használtunk: a sejteket PBS-sel mostuk, majd az 5% FCS-t tartalmazó PBS-ben hígított 10⁶ sejt/ml koncentrációjú sejtszuszpenziót 2,5 µM CFSE festékkel inkubáltuk szobahőmérsékleten 5 percig. A jelölés után a sejteket PBS-sel mostuk, majd különböző arányban vad típusú illetve Gal-1 knockout MSC-vel 24-lyukú szövettenyésztő lemezre tettük ki úgy, hogy a teljes sejtszám minden esetben 5x10⁴ volt. Kontrollként háromféle mintát használtunk:

1) jelöletlen sejteket (H5V-t illetve MSC-eket); 2) CFSE jelölt, megfelelő sejtszámban inkubált H5V-t; ill. 3) CFSE jelölt H5V_{MMC}-t. Két nap tenyésztés után a felülúszót begyűjtöttük, a ko-kultúrát tripszin tartalmú médiummal (0,05% tripszin-EDTA, Gibco) elválasztottuk a tenyésztőedény aljától, majd a sejteket immunfluoreszcencia pufferben (IFB) szuszpendáltuk. A sejtek (10.000 sejt/minta) fluoreszcencia intenzitását FACSCalibur (Becton Dickinson) áramlási citométerrel mértük, 1024 csatornás felbontással. Az élő sejtek elkülönítéséhez a mintákhoz közvetlenül a mérés előtt 10 µg/ml propidium-jodidot (PI) adtunk. A statisztikai számításokat a CellQuest™ (Becton Dickinson) szoftver segítségével végeztük, a jel/zaj arányt pedig a következő képlettel számítottuk ki:

$$\text{relatív fluoreszcencia intenzitás} = 10^{\{(Ch\# \text{ minta} - Ch\# \text{ kontroll})/256\}},$$

ahol a „Ch# minta” a kérdéses minta, „Ch# kontroll” pedig a jelöletlen minta fluoreszcencia intenzitás átlaga csatornaszámban kifejezve. Végül a H5V_{MMC} minta és a ko-kultúrában mért értékek hányadosát ábrázoltuk.

A mezenhimális őssejtek osztódásának követése a fent leírtak alapján történt azzal a különbséggel, hogy a CFSE jelölt MSC-eket festetlen H5V endotél sejtekkel inkubáltuk együtt, valamint kontrollként egyedül inkubált CFSE jelölt MSC-eket és jelölt MSC_{MMC}-ket használtunk.

Sejtfelszíni ill. összes galektin-1 kimutatása áramlási citométerrel

A sejtfelszíni ill. az összes (sejtfelszíni és citoplazmatikus) Gal-1 kimutatáshoz a kísérleteink során felhasznált sejttípusokat 4 percig szobahőmérsékleten kezeltünk fixáló pufferrel (ld. Pufferek, oldatok). Az összes Gal-1 kimutatásához a minták egy részét 100 µl permeabilizáló pufferrel szobahőmérsékleten permeabilizáltuk 10 percig. Ezt követően valamennyi mintát egységesen kezeltük: elsődleges ellenanyagként kecske anti-egér galektin-1 immunglobulint (R&D Systems) (1 óra inkubáció jégen),

másodlagos ellenanyagként számár anti-kecske IgG NL493-t (R&D Systems) (30 perc jégen) használtunk. A fluoreszcencia intenzitást áramlási citofluoriméterrel detektáltuk.

Tiodigalaktózid kezelés

A sejtfelszíni Gal-1 eltávolításához a MCS^{vt}-t 100 mM (D-Galaktopiranozil)- β -D-tiogalaktopiranoziddal (TDG) (Carbosynth) inkubáltuk 4°C-on 30 percig, majd TDG eltávolítását követően H5V endotél sejtekkel növesztettük együtt. Kontrollként szacharózzal kezelt MCS^{vt}-t, ill. egyedül tenyésztett H5V-t, valamint H5V és MSC^{Gal-1/-} ko-kultúrát használtunk.

Egy másik kísérleti rendszerben a H5V és MSC^{vt} ko-kultúrát 30 mM TDG jelenlétében tartottuk, majd naponta cseréltük a TDG-t tartalmazó médiumot a három napos inkubáció során. Mindkét kísérlet típusnál az inkubációt követően öt, véletlenszerűen kiválasztott, nem átfedő látómezőt Olympus IX81 mikroszkóppal figyeltünk meg és F-View II (Olympus) kamerával fényképeztük le, majd a CellR Imaging szoftver segítségével mértük meg a pre-vaszkuláris struktúrák hosszát.

MSC-k jelölése CellTracker™ CM-DiI fluoreszcens festékkel

Az MSC-eket a következő módon festettük meg: a sejt pelletet PBS-ben felfuszpendáltuk, majd DMSO-ban oldott CellTracker™ CM-DiI (Invitrogen) lipofil piros fluoreszcens festéket (20 pM) adtunk hozzá. A jelölést 37°C-on 5 percig végeztük, a sejteket végül PBS-sel mostuk.

Venus fluoreszcens fehérjét kifejező H5V sejtek előállítása

H5V sejteket ($1,5 \times 10^4$ sejt/minta) 24-lyukú szövettenyésztő lemezen növesztettünk 24 óráig, majd 0,5 μ g pT2/Venus fluoreszcens fehérjét, ill. 0,5 μ g pCMV(CAT)T7SB100 Sleeping Beauty transzpozázta kifejező plazmidokkal (melyeket dr. Mátés Lajostól kaptunk, MTA SZBK, Genetikai Intézet) transzfektáltuk a sejteket 2 μ l Turbofect (Fermentas) reagens jelenlétében. 24 óra elteltével áramlási citométerrel ellenőriztük a tranziensen transzfektált sejtek arányát, majd 0,3 sejt/lyuk koncentrációban 96-lyukú szövettenyésztő lemezre szélesztettük ki. A fluoreszcens fehérje kifejeződését Olympus IX81 Cell-R mikroszkóppal végeztük: egy sejtől

kiinduló Venus pozitív klónokat izoláltuk, majd felszaporítottuk. Az egyedi klónokat **Pre-vaszkuláris struktúra tesztben** jellemeztük abból a szempontból, hogy a vad típusú H5V sejtekhez hasonlóan mely klón vesz részt a pre-vaszkuláris struktúra képzésében. A választott klónt H5V^{Venus}-ként jelölöm a továbbiakban.

Ko-kultúra vizsgálata konfokális mikroszkóppal

Az emlős sejtek kitapadásának, és üvegfelületen történő növekedésének elősegítésére a fedőlemezeket 2 órán át 37°C-on 100 µl 5µg/ml koncentrációjú fibronektin (PromoCell) oldattal kezeltük. Az előkezelt fedőlemezen Venus zöld fluoreszcens festéket expresszáló H5V (H5V^{Venus}) sejteket CM-DiI lipofil festékkel jelölt MCS^{vt}-vel, ill. MSC^{Gal-1-/-}-vel tenyésztettük együtt. A pre-vaszkuláris struktúrák kialakulását követően a ko-kultúrákat szobahőmérsékleten fixáltuk 4 percig, majd PBS-sel történő mosás után a sejtmagokat 100 ng/ml Hoechst33342 (Sigma-Aldrich) kék fluoreszcens festékkel 37°C-on 30 percig festettük. A mintákról - Fluoromount G (Southern Biotech) oldattal történő lefedését követően - konfokális mikroszkóppal (Olympus FV 1000) készítettünk felvételeket.

Egér tumor modellek

Kétféle egér-tumor modell rendszerben vizsgáltuk a MSC^{vt} ill. a MSC^{Gal-1-/-} daganatnövekedésre gyakorolt hatását. Az első, ko-transzplantációs kísérleti rendszerben 10³ 4T1 egér emlőkarcinóma sejtet 10⁵ vad ill. a Gal-1 hiányos MSC-vel kevertünk össze, majd a sejtkeverékeket az egerek emlőszövetébe juttattuk (n=5/csoport). A másik esetben valamennyi állatot ortotopikusan injektáltuk 10⁵ 4T1 sejttel, majd a tapintható tumor kialakulásakor kezdtük meg az egerek MSC-vel történő kezelését (n=3/csoport). A daganatos egerekbe először egy alkalommal 10⁶ MSC-t oltottunk, azonban ez a sejtmennyiség, az MSC-k viszonylag nagy sejtmérete miatt, a kezelt állatokban embóliát váltott ki. Ezért a következő a kísérletben megváltoztattuk a transzplantációs stratégiát és alacsonyabb sejtszámot, 3x10⁵ MSC-t injektáltunk intravénásan és az oltást két nap múlva megismételtük.

A tumornövekedés immunológiai vonatkozásának vizsgálatához nyolc-tíz hetes X-SCID (törzs: B6;129S7-II7r tm1Imx/J, Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA) (az egereket Dr. Katona Róbert bocsájtotta rendelkezésünkre, MTA SZBK, Genetikai

Intézet) egerek horpaszába 5×10^2 B16F10 melanóma sejtet oltottunk, melyhez semmit vagy 10^5 MSC^{vt}-t illetve MSC^{Gal-1^{-/-}}-t kevertünk. Kontrollként az egereket PBS-sel vagy MSC^{vt}-vel illetve MSC^{Gal-1^{-/-}}-vel kezeltünk (n=4/csoport). 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 egy tolmérő segítségével legalább hetente kétszer mértük, térfogatukat (cm³) a következő képlet szerint számoltuk ki: $d^2 \times D \times 0.5$, ahol d és D a tumor kisebb, ill. a nagyobb átmérője.⁸¹

Szövetani vizsgálatok

Az állatokból kipreparált tumorszövetet paraffinba ágyaztuk, metsztük és hematoxilin-eozinnal festettük (Sigma-Aldrich). A mintákat Carl Zeiss Axio Imager.Z1 mikroszkóppal vizsgáltuk és Carl Zeiss AxioCam MRc5 kamerával fényképeztük le.

A tumorszövet mikroér denzitását morfológiai alapon határoztuk meg, három független minta 10 véletlenszerűen kiválasztott, nem átfedő látómezőjében AxioVision (AxioVs40 V 4.6.3.0 Carl Zeiss Imaging Solutions) szoftver segítségével. Ennek megállapításához lemértük az érzett területek nagyságát, melyet elosztottunk a látómező alapterületével. A relatív mikroér denzitást a következőképp számoltuk: a 4T1 és MSC ko-transzplantált állatokból származó daganat érdenzitás értékét elosztottuk a 4T1-gyel egyedül oltott egyedekből származó tumor érdenzitás értékével. Három független minta relatív mikroér denzitásának átlagát grafikusán ábrázoltuk.

Statisztikai analízis

A statisztikai számításokat Microsoft Office Excel (2010) programmal végeztük el, kétszélű, kétmintás, egyenlő varianciájú Student-féle t-teszt formájában. A szignifikancia szintet az alábbiak alapján állapítottuk meg: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

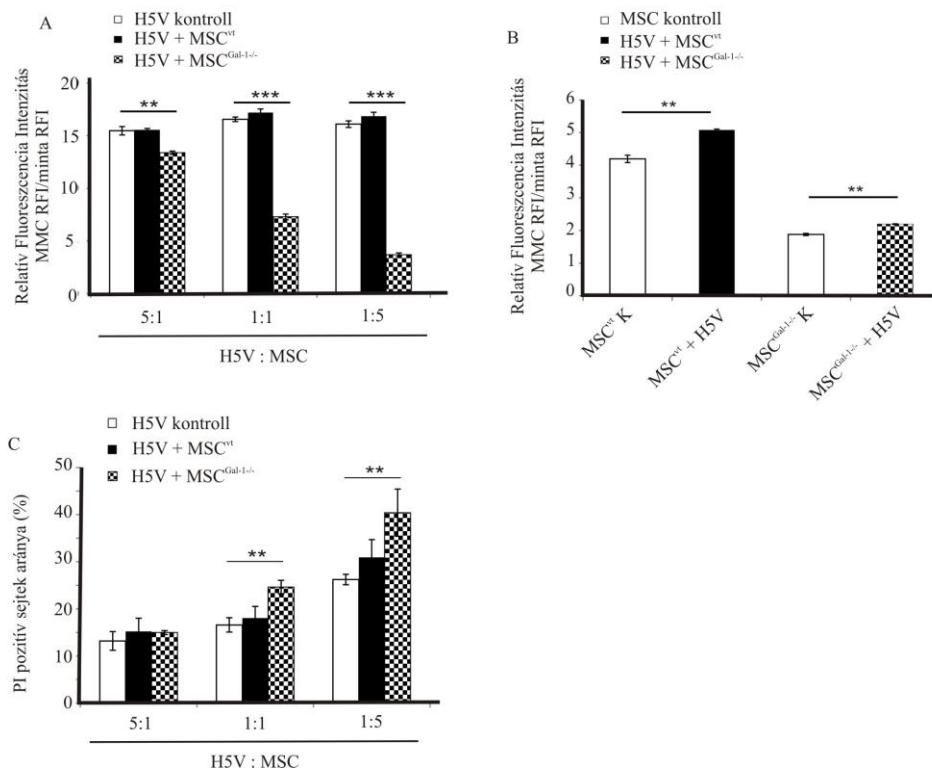
VI. Eredmények

Ko-kultúrában tartott MSC és H5V sejtek módosítják egymás osztódását és életképességét

Ko-kultúras rendszerben a különböző sejtípusok kölcsönhatásban állnak egymással. Az általuk termelt faktorok, illetve a létrejövő közvetlen sejtkapcsolatok befolyásolhatják az osztódási és életképességüket, valamint funkcionális következményekkel is járhatnak.

Annak vizsgálatára, hogy vajon a ko-kultúrában tenyésztett sejtek befolyásolják-e a másik sejtfeleség proliferációs aktivitását, az alább részletezett kísérletet végeztük el. A H5V szív kapilláris endotél sejteket (V. 1. A ábra), vagy az MSC^{vt}-t ill. az MSC^{Gal-1^{-/-}}-t (V. 1. B ábra) festettük CFSE festékekkel és a jelölt sejteket jelöletlen MSC, illetve H5V sejtekkel tenyésztettük együtt két napig. A citoplazmatikus fehérjékhez kovalensen kapcsolódó CFSE mennyisége osztódáskor lefeleződik, s ez alkalmassá teszi a festéket a proliferáció nyomon követésére. Kísérletünkben áramlási citométerrel detektáltuk a jelölt sejtek fluoreszcencia intenzitás változását, és megállapítottuk, hogy a kontrollként használt H5V a kiindulási sejtszámtól függetlenül egyforma mértékben osztódott. Míg a H5V proliferációját nem befolyásolta a MSC^{vt}-vel való együtt tenyésztés, addig MSC^{Gal-1^{-/-}} jelenléte dóziszfüggően gátolta az endotél sejtek szaporodását (V. 1. A ábra). Ezzel ellentétben a H5V kis mértékben, de szignifikánsan serkentette MSC^{vt} ill. MSC^{Gal-1^{-/-}} növekedését (V. 1. B ábra). Az is megfigyelhető, hogy a MSC^{vt} hozzávetőlegesen kétszer gyorsabban osztódott, mint a MSC^{Gal-1^{-/-}} (V. 1. B ábra).

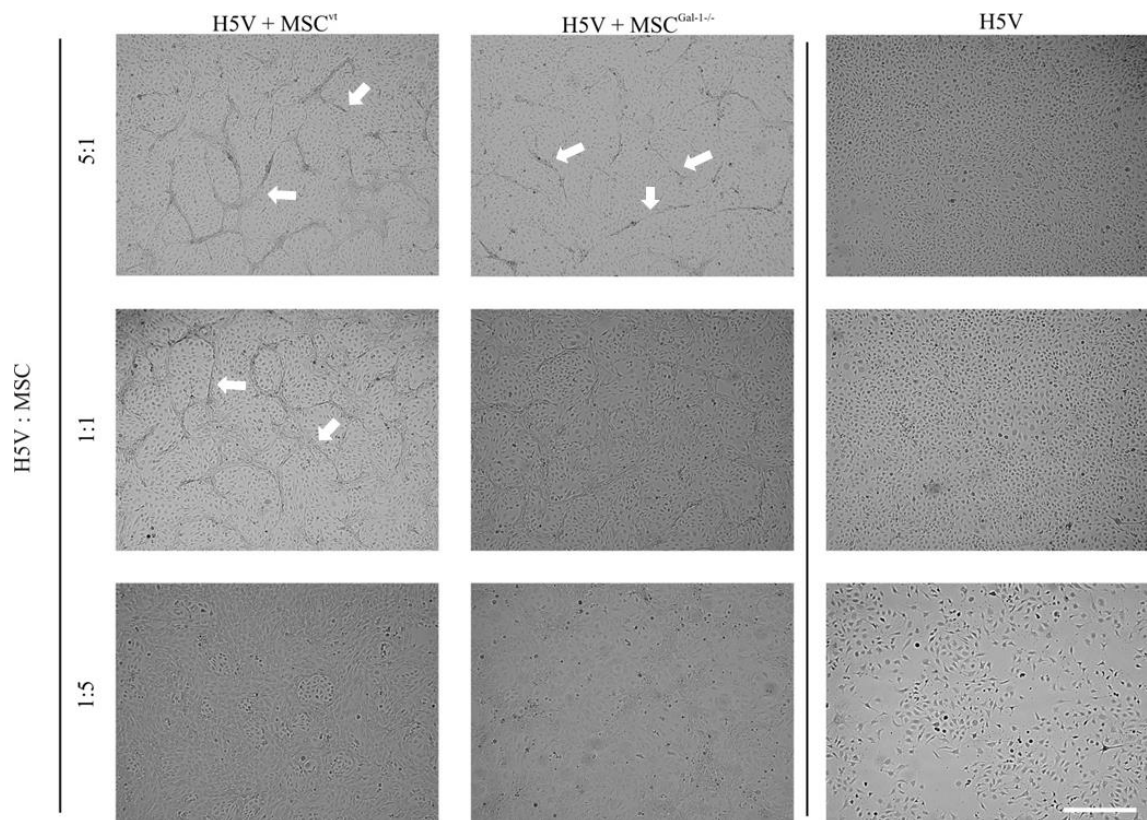
A késői apoptotikus ill. nekrotikus sejteket megfestő propidium jodid (PI) használatával a ko-kultúrában tenyésztett sejtek életképességéről kaphattunk információt. Azt tapasztaltuk, hogy az egyedül növesztett H5V, valamint H5V és MSC^{vt} ko-kultúrában a PI pozitív sejtek aránya hasonló, míg Gal-1 hiányos MSC jelenlétében szignifikánsan megnő az PI pozitív elpusztult sejtek mennyisége (V. 1. C ábra).



V. 1. ábra: MSC és H5V sejtek egymásra gyakorolt hatása osztódás és életképesség szempontjából. A.) H5V sejtek osztódása MSC jelenlétében. H5V sejteket CFSE fluoreszcens molekulával festettük meg, majd az ábrán jelölt arányokban jelöletlen MSC^{wt} -vel ill. MSC^{Gal-1-/-} -vel tenyésztettük együtt. Kontrollként a jelölt H5V-t egyedül tartottuk a sejt kultúrában. **B.) MSC-k osztódása H5V jelenlétében.** MSC-eket CFSE festékekkel jelöltük meg és 1:1 arányban növesztettük együtt festetlen H5V sejtekkel. Kontrollként egyedül inkubált MSC-k szolgáltak. A. és B.) A két napos inkubáció elteltével a sejtek fluoreszcencia intenzitását áramlási citométerrel mértük, majd CellQuest szoftver segítségével kiszámoltuk a minták relatív fluoreszcencia intenzitását (RFI), majd az ugyancsak kontrollként használt Mitomycin C-vel (MMC) proliferációjában gátolt sejtek RFI értékét elosztottuk a minták RFI értékével. A p-értéket (** p<0,01; *** p<0,001) a Student-féle t-próba segítségével számoltuk ki. **C.) MSC^{Gal-1-/-} jelenlétében megnő a propidium jodid pozitív sejtek aránya.** Az ábrán jelölt arányokban összekevertünk H5V sejteket MSC^{wt} -vel ill. MSC^{Gal-1-/-} -vel. Kontrollként egyedül tenyésztettük a H5V-t. A két napos inkubáció elteltével begyűjtöttük a felülúszót, majd a sejteket tripszin tartalmú médiummal elválasztottuk a tenyésztőlemez aljától. Mérés előtt közvetlenül 10 µg/ml propidium-jodidot adtunk a sejtekhez és áramlási citométerrel mértük a fluoreszcens sejtek arányát. A p-értéket (** p<0,01) a Student-féle t-próba segítségével számoltuk ki.

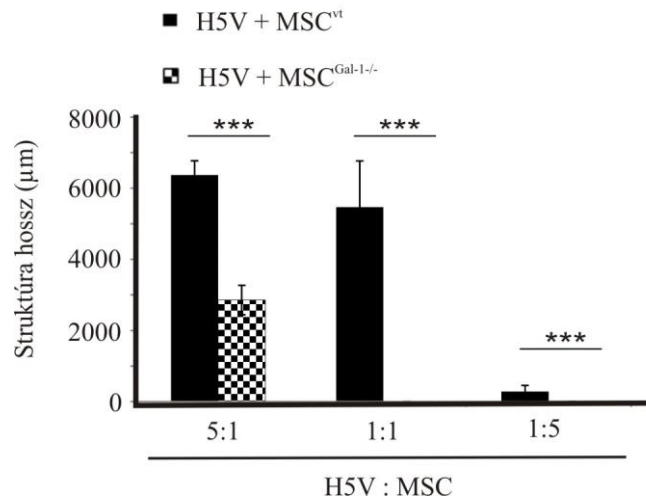
Az MSC-k Gal-1 termelése befolyásolja a H5V-MSC ko-kultúrában kialakuló pre-vaszkuláris sejtcsoportosulások hosszát

Az endoteliális és periendoteliális sejtek kölcsönhatásának funkcionális vizsgálatához ún. pre-vaszkuláris struktúra tesztet állítottunk be, amelynek lényege, hogy a két napon keresztül tenyésztett ko-kultúrában sajátos sejtrendeződések figyelhetők meg. A kísérletben H5V egér szív kapilláris endotél sejteket és Gal-1-et termelő vad típusú MSC-eket ill. Gal-1 hiányos MSC-eket használtunk, melyek a periendoteliális sejtek egyik előalakjának tekinthetők.²² A legtöbb struktúrát a H5V és MSC^{wt} ko-kultúrában, annak is 1:1 arányú tenyésztésében láttunk, míg a H5V és MSC^{Gal-1^{-/-}} együtt növesztésekor kevesebb struktúra alakult ki (V. 2. ábra).



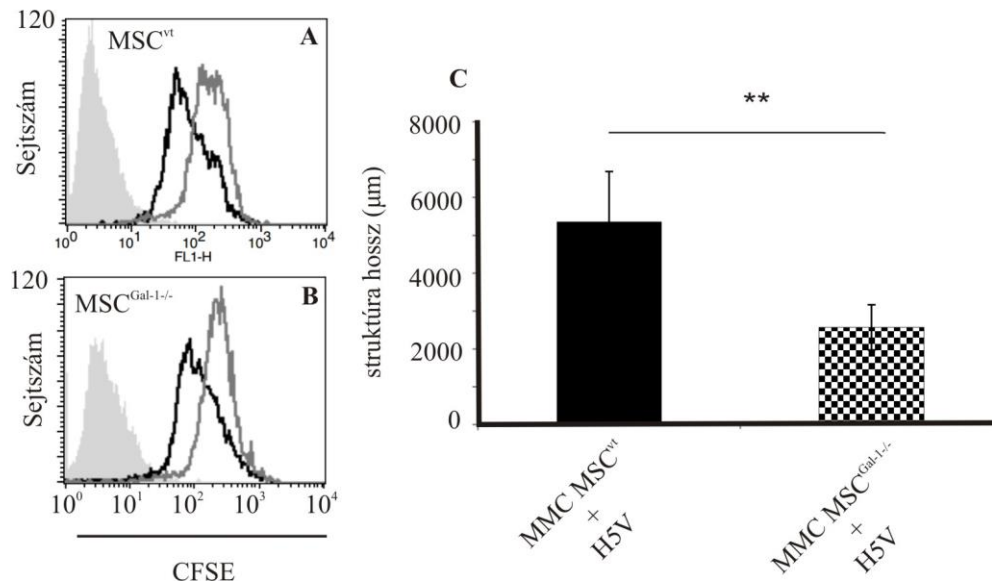
V. 2. ábra: Kapilláris-szerű struktúrák H5V és MSC ko-kultúrában. H5V sejteket együtt tenyésztettünk MSC^{wt} -vel ill. MSC^{Gal-1^{-/-}} -vel a képen feltüntetett arányokban. Kontrollként egyedül tartottuk a H5V sejteket. A két napos inkubáció elteltével a kultúrákat Olympus IX81 mikroszkóppal fényképeztük. Az ábrán reprezentatív képeket mutatunk be. Mércse: 500 μ m.

A pre-vaszkuláris csoportok hosszát CellR szoftver segítségével mértük, majd ábráztuk (V. 3. ábra). Kontrollként monokultúrában tenyésztettük a H5V-t (V. 2. ábra, jobb panel), valamint az MSC^{wt}-t és az MSC^{Gal-1^{-/-}}-t (nem bemutatott adat), de egyik esetben sem találtunk ilyen specifikus sejtrendeződést.



V. 3. ábra: A pre-vaszkuláris hálózatot alkotó struktúrák hossza a H5V/MSC ko-kultúrában. Különböző arányban növesztettük a H5V és MSC ko-kultúrákat úgy, hogy a teljes sejtszám 5×10^4 volt. A két napos inkubációt követően CellR szoftverrel analizáltuk a kialakuló hálózat sejtsoportosulásainak hosszát. A *p*-értéket (***) $p < 0,001$) a Student-féle *t*-próba segítségével számoltuk ki.

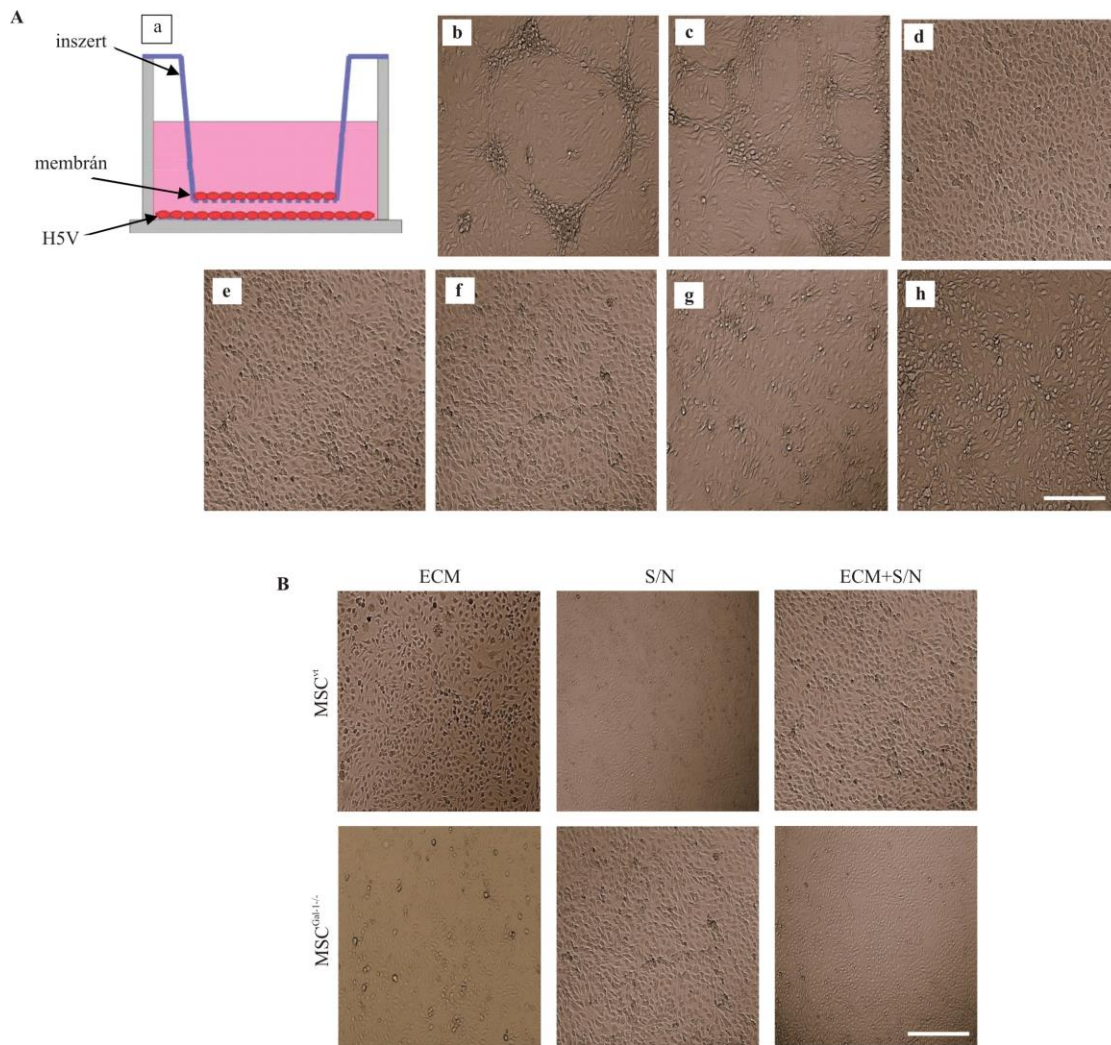
Az V. 1. B ábra mutatja, hogy az MSC^{wt} és a MSC^{Gal-1^{-/-}} osztódási üteme eltérő. Fontos annak bizonyítása, hogy a Gal-1 deficiens és vad típusú MSC-k pro-angiogén aktivitásbeli különbségét valóban a Gal-1 expresszió és nem a sejtek osztódási sebessége határozza meg az *in vitro* testben. Ennek bizonyítására a sejtosztódást gátló Mitomycin C (MMC)-vel kezeltük az összejteket, a gátlás meglétét pedig áramlási citometriával ellenőriztük (V. 4. A-B ábra). A proliferációjukban blokkolt MSC-eket ezután együtt növesztettük H5V sejtekkel, és vizsgáltuk, hogy azonos sejtszámú MSC-k hogyan befolyásolják a struktúrák hosszát. Megfigyeltük, hogy a MMC kezelt vad típusú MSC jelenlétében nagyobb mértékű a sejtek összerendeződése, mint MMC kezelt Gal-1 knockout MSC esetében (V. 4. C ábra), mely egybeesik azokkal az eredményekkel, ahol az MSC-eket nem gátoltuk (V. 2. ábra).



V. 4. ábra: H5V és MMC kezelt MSC-k ko-kultúrájában kialakuló struktúrák. MSC^{wt} -t (A.) és $MSC^{Gal-1^{-/-}}$ -t (B.) CFSE festékkel jelöltünk, majd 16 órán keresztül 8 $\mu\text{g/ml}$ Mitomycin C-vel inkubáltuk (szürke vonal). PBS-sel történő mosást követően két napig inkubáltuk a sejtek, majd áramlási citometriával mértük a sejtek fluoreszcencia intenzitás-változását. Kontrollként jelöletlen MSC (szürke területű hisztogram) és CFSE jelölt, de osztódásában nem gátolt MSC (fekete vonal) szolgált. C.) MMC-vel kezelt MSC^{wt} -t ill. $MSC^{Gal-1^{-/-}}$ tenyésztettünk együtt H5V-vel, majd két nap inkubáció elteltével mértük a struktúrák hosszát. A p -értéket (** $p < 0,01$) a Student-féle t -próba segítségével számoltuk ki.

A pre-vaszkuláris struktúrák kialakulásához közvetlen sejt-sejt kapcsolatra van szükség

Az endotél sejtek *in vitro* pre-vaszkuláris hálózattá történő összekapcsolódásának hátterében szolubilis faktorok és/vagy heterotípusos sejt-kapcsolatok által kiváltott morfogenezis állhat. Kétféle megközelítést alkalmaztunk annak vizsgálatára, hogy a ko-kultúrákban megfigyelhető morfológiai változásokhoz szükség van-e közvetlen sejt-kapcsolatra: 1) Transwell rendszerben növesztettük a H5V és az MSC sejteket (V. 5. A ábra), vagy 2) MSC-eredetű extracelluláris mátrixra szélesztettük az endotél sejteket (V. 4. B ábra). Ez utóbbi vizsgálat során MSC-k által kondicionált médiumot is adtunk a tenyészethez. Közvetlen sejt-kapcsolat kialakulását biztosító ko-kultúrák szolgáltak kontrollként.



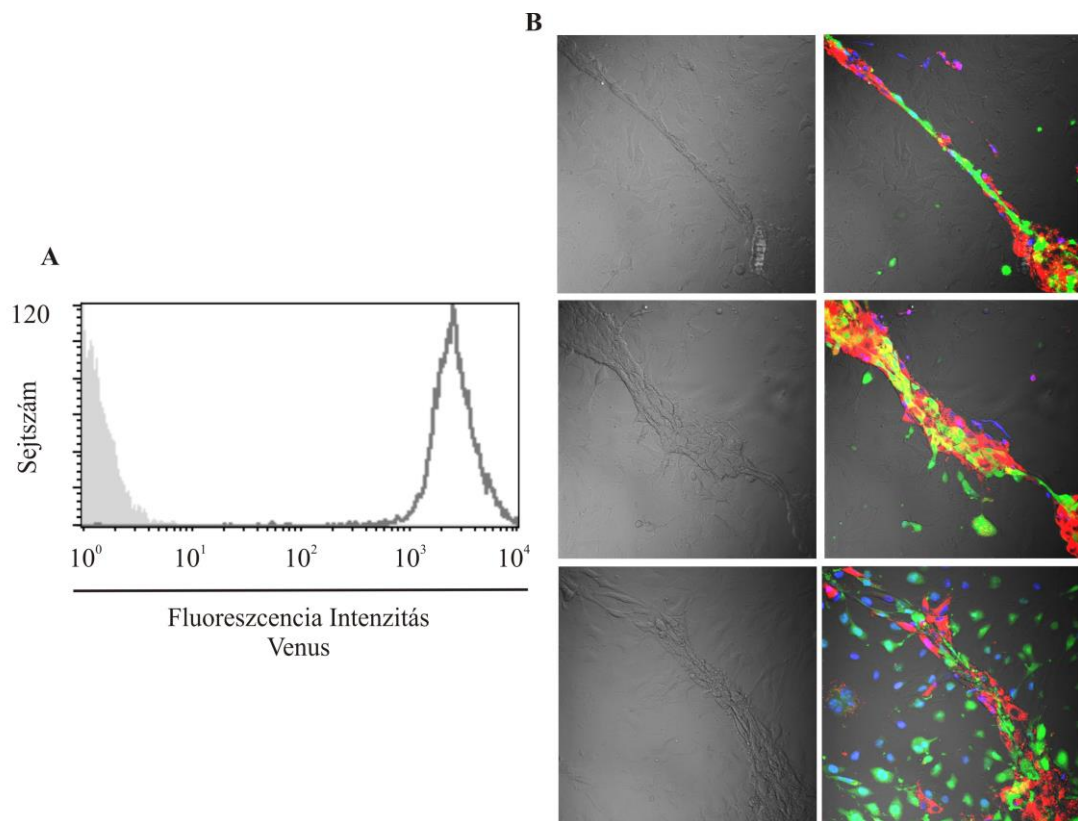
V. 5. ábra: *A sejtek közvetlen heterotípusos kapcsolatának hiányában nem alakulnak ki pre-vaszkuláris struktúrák. A) H5V sejteket 24-lyukú tenyésztőlemezt szelészttettük (b-h) MSC^{wt} (b) vagy MSC^{Gal-1/-} (c)-vel együtt, vagy önmagában (d-h). A 0,4 μm pórusú Transwell inszert elembe MSC^{wt} (e), MSC^{Gal-1/-} (f), H5V/MSC^{wt} (g), H5V/MSC^{Gal-1/-}-t (h) helyeztünk. B) Az MSC^{wt}-t és az MSC^{Gal-1/-}-t 2% FCS tartalmú médiumban növesztettük 3 napig és a felülúszót használtuk kondicionált médiumként (S/N). Az extracelluláris mátrix bevonathoz a MSC^{wt}-t és a MSC^{Gal-1/-}-t konfluenciáig szaporítottuk, majd EDTA-val eltávolítottuk a tenyésztőedény aljától. A H5V sejteket erre a rétegre szélesztettük, majd miután kitapadtak, normál médiumban vagy kondicionált médiumban növesztettük tovább. Három nap tenyésztés után Olympus IX81 mikroszkóppal készítettünk képeket. Mércse: 500 μm.*

Sem a Transwell rendszerben egymástól fizikailag elválasztott (V. 5. A ábra), sem a kondicionált médiummal kiegészített extracelluláris mátrixon növesztett H5V endotél sejtek (V. 5. B ábra) nem alakítottak ki pre-vaszkuláris struktúrákat. Ezek a

kísérletek alátámasztják, hogy a pre-vaszkuláris struktúrák formálódásához nem elegendők a szolubilis faktorok és/vagy extracelluláris mátrix fehérjék, hanem az MSC-vel kialakított sejt-sejt kapcsolatokra is szükség van.

A struktúrák létrehozásában mind a H5V, mind az MSC részt vesz

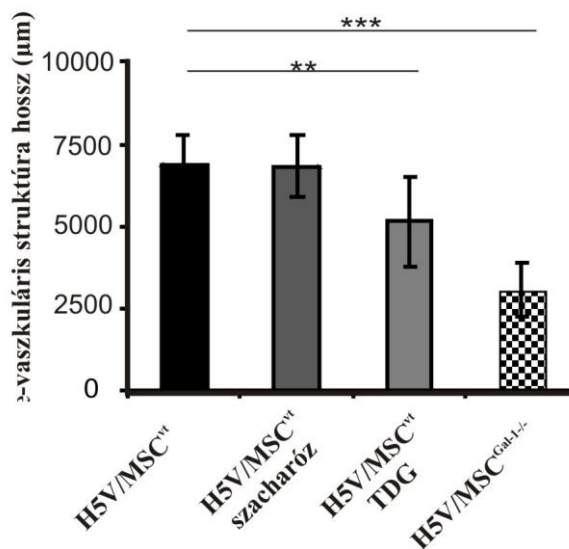
A struktúrák felépítésében részt vevő sejtípusok azonosítására a H5V endotél sejteket Venus zöld fluoreszcens fehérjét kódoló plazmida transzfektáltuk ($H5V^{Venus}$) és a sejtek fluoreszcenciáját citofluoriméter segítségével vizsgáltuk (V. 6. A ábra). A $H5V^{Venus}$ sejteket CM-DiI piros fluoreszcens festékkel jelölt MSC^{vt}-vel tenyésztettük együtt, és konfokális mikroszkóp segítségével megállapítottuk, hogy a sejt-összerendezésben mind a H5V, mind a MSC^{vt} részt vett (V. 6. B ábra).



V. 6. ábra: Az endotél sejtek és az MSC-k egyaránt részt vesznek a pre-vaszkuláris struktúrák létrehozásában. A) A kiválasztott $H5V^{Venus}$ klón fluoreszcencia intenzitását áramlási citométerrel detektáltuk. B) $H5V^{Venus}$ (zöld) sejteket és CM-DiI (piros) fluorokrómmal jelölt MSC-eket növesztettünk együtt fibronectin oldattal bevont fedőlemezen. Két napos inkubáció elteltével a ko-kultúrákat paraformaldehiddel fixáltuk, majd Fluoromount G oldattal fedtük, és konfokális mikroszkóppal készítettünk felvételeket.

Az MSC-eredetű Gal-1 meghatározó faktor a pre-vaszkuláris struktúrák kialakulásában

Az eddigi kísérleteink rámutatnak, hogy a Gal-1 deficiens MSC sejtek szignifikánsan kisebb mértékben támogatják H5V/MSC ko-kultúrában kialakuló pre-vaszkuláris struktúrák képződését (V. 2-4. ábrák). Annak további alátámasztására, hogy a Gal-1 pre-vaszkuláris képződmények kialakításában fontos szerepet tölt be, tiodigalaktoziddal (TDG), a Gal-1 minimális ligandjának optimalizált analógjával gátoltuk a Gal-1 és fiziológiás ligandjai (β -galaktozid tartalmú glikokonjugátumok) közötti kölcsönhatást a vad típusú MSC-t és a H5V sejteket a tartalmazó ko-kultúrában. Az V. 7. ábra mutatja, hogy a gátlószer jelenlétében, illetve MSC-eredetű Gal-1 hiányában szignifikánsan kevesebb pre-vaszkuláris struktúra alakul ki, mint a gátló szert nem tartalmazó, vagy azonos koncentrációjú indifferens cukrot, szacharózt tartalmazó kultúrában.

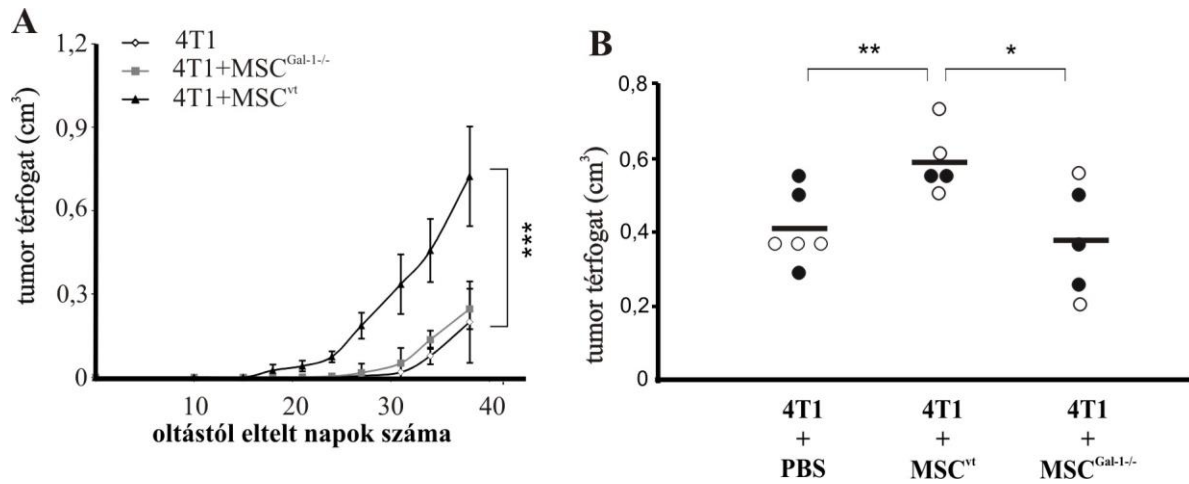


V. 7. ábra: Gátló diszacharid, TDG jelenléte a H5V/MSC^{wt} ko-kultúrában szignifikánsan gátolja a pre-vaszkuláris struktúrák létrejöttét. H5V/MSC^{wt} ko-kultúrát tenyésztettünk szacharóz ill. TDG jelenlétében, vagy távollétében. Negatív kontrollként vad típusú MSC helyett Gal-1 hiányos MSC-t (H5V/MSC^{Gal-1}-) alkalmaztunk. Három nap tenyésztést követően reprezentatív felvételeket készítettünk és CellR szoftver segítségével mértük a struktúrák hosszát. A p-értéket (** p<0,01; *** p<0,001) a Student-féle t-próba segítségével számoltuk ki.

Az MSC Gal-1 függő módon serkenti a tumor növekedést mind ko-transzplantációs, mind meglévő tumor intravénás kezelése esetében

A további kísérleteinkben arra kerestük a választ, hogy szerepet játszik-e a mezenhimális őssejtek által termelt Gal-1 az MSC-k *in vivo* tumorfejlődést támogató funkciójában. Kétféle egér-tumor modell rendszerben vizsgáltuk a MSC^{vt} ill. a MSC^{Gal-1^{-/-}} daganatnövekedésre gyakorolt hatását. Az első kísérleti rendszerben 4T1 egér emlőkarcinóma sejteket előzetesen összekevertünk vad típusú ill. a Gal-1 hiányos MSC-vel, majd a sejtkeveréket az egerek emlőszövetéhez juttattuk (V. 8. A ábra). A másik esetben valamennyi állatot ortotopikusan injektáltuk 4T1 sejtekkel, majd tapintható tumor kialakulását követően az állatokat intravénásan kezeltük a különböző típusú MSC-vel (V. 8. B ábra). A daganatos egerekbe első esetben egy alkalommal oltottunk 10⁶ MSC-t, azonban az MSC-k nagy sejt méretük miatt több kezelt állatban embóliát váltottak ki. Ezért a kísérlet megismétléséhez lecsökkentettük a véráramba jutatott őssejtek mennyiségét, és kétszer injektáltunk 3x10⁵ MSC-t a daganatos állatokba (V. 8. B ábra). Kontrollként egyedül oltottunk a sejteket, 4T1-et, illetve MSC^{vt}-t, MSC^{Gal-1^{-/-}}-t. A két utóbbi sejt típus nem okozott tumort, vagy más észlelhető elváltozást az állatokban (adatok nincsenek ábrázolva).

A Gal-1-et kifejező MSC-k mind a két kísérleti rendszerben szignifikánsan serkentették az emlőkarcinóma növekedését (V. 8. ábra). A 4T1 sejteket egyedül, ill. a MSC^{Gal-1^{-/-}}-vel egyszerre injektálva a tumorok a 25. nap körül váltak megfigyelhetővé. Azonban, amikor a 4T1-et vad típusú MSC-vel együtt oltottuk, a tumorok már a 13. napon tapinthatóak voltak, jelentősen felgyorsult a tumornövekedés (V. 8. A). A másik kísérleti rendszerben hasonló hatást figyelhettünk meg, vagyis a vad típusú MSC szignifikáns tumornövekedést indukált (V. 8. B ábra). Ebben az esetben az első MSC kezeléstől számított 20. napon a vad típusú MSC jelentősen serkentette a 4T1 növekedését, míg a kontroll csoport és az MSC^{Gal-1^{-/-}} kezelt egerek daganata hasonló méretet mutatott.

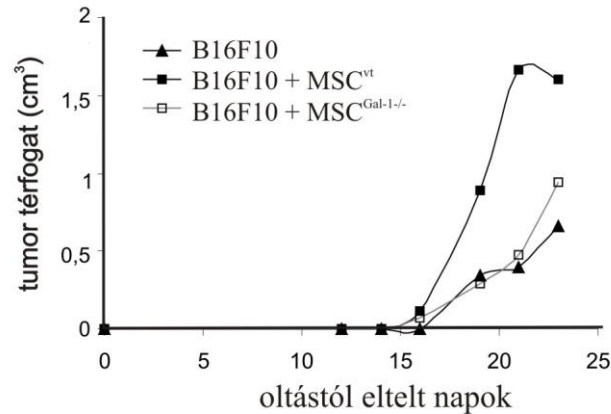


V. 8. ábra: Az MSC-k Gal-1 függő módon serkentik a daganat növekedését. **A.)** Nőstény Balb/C egereket oltottunk 10^3 4T1 sejttel egyedül, vagy MSC^{wt} , illetve $MSC^{Gal-1/-}$ kísérletében. **B.)** Az egereket ortotopikusan oltottuk 10^5 4T1 emlőkarcinóma sejttel, majd tapintható tumor kialakulását követően egy alkalommal 10^6 (üres kör) ill. két egymást követő alkalommal 3×10^5 (fekete kör) MSC^{wt} -vel vagy $MSC^{Gal-1/-}$ -vel intravénásan kezeltük az egereket; kontrollként PBS-t injektáltunk a véráramba. A tumor méretét tolómérő segítségével minden 3. napon megmértük, majd a következő képlettel számoltuk ki a térfogatát: $D \times d \times 0,5$, ahol D a tumor nagyobb, d a kisebb átmérője. A **B.)** ábrán az első MSC kezeléstől eltelt 20. napon mért adatokat ábrázoltuk. A diagramokon az átlag értékeket tüntettük fel \pm szórással, a p -értékeket a Student-féle t -próba segítségével számoltuk ki. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). A kísérleti egerek száma: **A:** $n=10$, **B:** $n=3$.

MSC^{wt} nem a tumor ellenes immunválasz gátlásával serkenti a tumor növekedést

Az MSC és a Gal-1 fehérje erős immunuszpresszív aktivitással rendelkezik, ezért felvetődött a kérdés, hogy az MSC, illetve az MSC-eredetű Gal-1 a tumor-specifikus immunválasz módosításával fejti-e ki hatását. Ennek tanulmányozásához B16F10 egér melanóma sejteket oltottunk MSC^{wt} -vel ill. $MSC^{Gal-1/-}$ -vel IL-7 receptor hiányos B16 egerekbe. A károsodott IL-7 jelátvitel következtében jelentősen lecsökken az egerek T és B sejt száma, mely hasonló fenotípust eredményez, mint a humán X-SCID (X-linked severe combined immunodeficiency, X kromoszómához kötött súlyos immunhiányos megbetegedés, mely az IL-2 receptor gamma láncát érinti) megbetegedés.⁹³ Kontrollként önmagában oltott daganatsejtek szolgáltak. A tumor növekedése hasonló kinetikát mutatott X-SCID egerekben, mint egészséges immunrendszerrel rendelkezőkben, vagyis a vad típusú MSC serkentette, míg a Gal-1

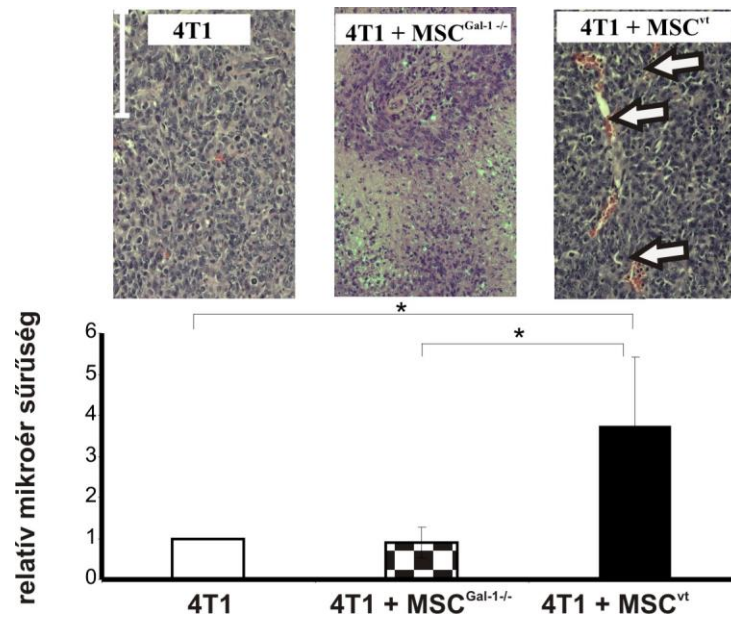
knockout MSC nem befolyásolta a tumor növekedést (V. 9. ábra). Így megállapíthattuk, hogy az MSC-eredetű Gal-1 nem a tumor-ellenes immunfolyamatok gátlásával gyakorol hatást a daganatprogresszióra.



V. 9. ábra: Vad típusú MSC, illetve az MSC-eredetű Gal-1 nem a tumor-specifikus immunválasz módosításával serkenti a tumornövekedést. Hím egerek horpaszába, bőr alá B16F10 melanóma sejtet (500 sejt/állat) oltottunk egyedül, vagy 10^5 MSC^{vt} illetve MSC^{Gal-1-/-}-vel együtt (n=4). A tumor méretét tolmérővel mértük kétnaponként, a tumor térfogatát pedig az alábbi képlettel számoltuk ki: $D \times d \times 0,5$, ahol D a tumor nagyobb, d a tumor kisebb átmérője.

Az MSC-eredetű Gal-1 szerepet játszik a daganatszövet vaszkularizációjában

Mivel az X-SCID egereken végzett kísérletek alapján kimondhatjuk, hogy az MSC-eredetű Gal-1 nem a tumor-ellenes immunválasz gátlásával támogatja a daganatnövekedést, ezért megvizsgáltuk, hogy az MSC-eredetű Gal-1 hatással van-e a tumor-asszociált erek sűrűségére. Ehhez a korábban említett ko-transzplantált egerek daganatszövetét hisztokémiailag elemeztük. A csak 4T1-gyel egyedül, illetve MSC^{Gal-1-/-}-vel ko-transzplantált állatokban fejlődő tumorok kapilláris erezettsége hasonló mértéket mutatott. Ezzel szemben a vad típusú MSC^{vt} és 4T1 kombinációja esetén szignifikánsan erezettebb tumorszövet alakult ki (V. 10. ábra).



V. 10. ábra: MSC galektin-1 függő módon támogatja a gazdagabb érhálózattal rendelkező tumorszövet kialakulását. Nőstény Balb/C egereket oltottunk 10^3 4T1 emlőkarcinóma sejttel egyedül, vagy 10^5 MSC^{vt}, illetve MSC^{Gal-1^{-/-}}-vel együtt. A fixált, paraffinba ágyazott tumorokból metszeteket készítettünk, majd hematoxilin-eozinnal festettük. Az erezettség mértékének megállapításához a dokumentált látómező területét elosztottuk a vaszkularizált területtel. A *p*-értéket (* $p < 0,05$) a Student-féle *t*-próba segítségével számoltuk ki. Mércse: 100 μ m.

VII. Következtetések

A szilárd daganatok nem értelmezhetőek pusztán osztódó daganatsejtek tömegeként, ugyanis az egész szervezetre kiterjedő betegség kialakításához a tumor fejlődését támogató kötőszövet jelenlétére is van szükség. Az utóbbi években egyre több kutatócsoport figyelme fordult a tumor-asszociált kötőszövet, más néven tumor sztróma daganatfejlődésben betöltött szerepének tisztázása felé. A tumor kötőszöveti sejtjeinek eredete nem teljesen tisztázott, egyik forrása a csontvelői mezenhimális őssejtek lehetnek, melyek gyulladási folyamatok hatására mobilizálódnak.^{30,33} Az MSC-k elsősorban a gyulladások, sérülések helyére toborzódnak, és mivel a daganatok soha nem gyógyuló sebnek tekinthetők, az MSC-k a tumorsejtekhez vándorolnak és a sztrómába épülve befolyásolják a daganat növekedését. A daganatsejtek által toborzott egészséges sejtek működése módosul a tumor sejtekből felszabaduló faktorok hatására, és a daganatsejtekkel együtt olyan sajátos mikrokozmoszt alakítanak ki, amely hozzájárul a tumor korlátlan növekedéséhez. Az egyik ilyen faktor a Gal-1, melynek kifejeződését számos szilárd daganatban leírták, egy évtizede pedig azt is ismert, hogy az MSC-k is nagy mennyiségben termelik.^{70,71} Több kutatócsoport bizonyította, hogy mind az MSC-nek, mind a Gal-1-nek érképződést serkentő ill. immunrendszert gátló hatása is van. Mivel a Gal-1 és az MSC külön-külön pro-angiogén és immunszuppresszív funkcióval is rendelkezik, így kísérleteink során azt szerettük volna tisztázni, hogy az MSC által termelt Gal-1 hozzájárul-e az MSC-k angiogén és/vagy immunszuppresszív hatásához a daganatfejlődés során. Ennek tisztázására először az endotél sejtek ill. Gal-1-et termelő, valamint Gal-1 hiányos MSC-k egymásra gyakorolt hatását vizsgáltuk *in vitro* ko-kultúrában, majd *in vivo* tumor állatmodellben analizáltuk, hogy az MSC eredetű Gal-1 szerepet játszik-e a tumor-éreképződésben, ill. a tumor ellen irányuló immunfolyamatok szabályozásában.

Az endoteliális és periendotheliális sejtek kölcsönhatásának vizsgálatához H5V eger szív kapilláris endotél sejteket Gal-1-et termelő vad típusú MSC-eket használtunk, melyek a periendotheliális sejtek egyik előalakjának tekinthetők.²² A kétféle sejtípus pre-vaszkuláris hálózatokat képezett, melyek kiterjedése függött a sejtek egymáshoz viszonyított arányától. Egyenlő mennyiségű MSC és H5V esetén, illetve a H5V-t ötszörös mennyiségben alkalmazva a sejtek pre-vaszkuláris struktúrákká rendeződtek

össze, míg az MSC-t ötszörös feleslegben alkalmazva csak rövid struktúrák alakultak ki. A struktúrák formálódásának alapfeltétele, hogy az endotél sejtek és az MSC-k között közvetlen sejt kapcsolat létesüljön, ugyanis sem Transwell rendszerben - amikor a sejtek fizikailag elválasztva, de közös tenyésztőoldatban növekedhettek-, sem az MSC-k által termelt ECM és MSC-ről ill. ko-kultúráról származó kondicionált médium jelenlétében nem figyeltünk meg struktúráképződést. A struktúrák kialakításában mindkét sejttípus részt vett, amit a fluoreszcens festékekkel jelöl MSC és Venus zöld fluoreszcens fehérjével transzfektált H5V ko-kultúrájával igazoltunk. Az irodalmi adatok alapján úgy értelmezhetjük a fenti eredményt, hogy az MSC-k és EC-k együtt tenyésztésük során vaszkuláris endoteliális kadherin ill. az integrin $\alpha 6$ alegység közreműködésével heterotípusos kapcsolatokat alakítanak ki egymással. E kapcsolatoknak a kialakítása nem csak a sejtek közötti adhézió létrehozása miatt lehet fontos. Hirschi és mtsi igazolták, hogy az EC/MSK interakció az endotél sejtekben TGF- β termelést eredményező jelátviteli lépésekhez vezet.⁹⁴ Az endotél sejt-eredetű TGF- β , a szív és a simaizom sejtek specifikus koaktivátora, a miokardium expresszióját váltja ki az MSC-kben, mely az MSC-k vaszkuláris simaizom sejté történő differenciálódását jelzi.^{95,96} Kombinálva az irodalmi adatokat és saját eredményeinket, azt feltételezzük, hogy az MSC az MSC/H5V ko-kultúrában vaszkuláris simaizom sejté differenciálódik. Ezt a nézetet támogatja az az eredmény is, hogy a H5V:MSC 1:5 arányú ko-kultúrájában csak kismértékű struktúráképzést tapasztalunk, melynek oka lehet, hogy az alacsony számban jelen lévő H5V sejtek az MSC differenciálódásához szükséges TGF- β mennyiséget nem tudják biztosítani. Au és mtsai kimutatták, hogy az MSC-k csupasz endotél tubulusokhoz asszociálódnak *in vivo*, és periendoteliális sejt-ként meggátolják a kapillárisok korai regresszióját.⁹⁷ Burns és mtsai leírták, hogy kísérleteikben az MSC sejt-kultúra által kiválasztott extracelluláris mátrix, bár tartalmaz pro-angiogén faktorokat is, de nem elegendő az EC-k struktúrává fejlődéséhez, vagyis a pre-vaszkuláris struktúra képződéséhez közvetlen kapcsolat kialakulására van szükség az endotél sejtek és MSC-k között.⁹⁸

A fent ismertetett saját és mások kísérletei igazolják, hogy a pre-vaszkuláris struktúra teszt alkalmas vizsgálati módszer arra, hogy *in vitro* tanulmányozzuk az angiogenezis terminális lépését. Annak a kérdésnek a megválaszolására, hogy ebben a stádiumban az MSC-eredetű Gal-1 milyen szerepet tölt be, Gal-1 knockout egér csontvelőjéből izolált

Gal-1 deficiens MSC-eket alkalmaztunk. A Gal-1 hiányos MSC-k H5V endotél sejtekkel együtt tenyésztve a vad típusú MSC-khez képest kevésbé támogatták a pre-vaszkuláris hálózat kialakulását. A különböző arányú ko-kultúrák közül csak abban az esetben figyelhettük meg a struktúrák megjelenését, ahol a H5V nagyobb mennyiségben volt jelen az MSC-hez képest, de kiterjedésük még így is jelentősen elmaradt a Gal-1 termelő MSC-nél megfigyelnél. Az MSC eredetű Gal-1 vaszkularizációban, valamint az MSC simaizom sejté vagy pericitává történő differenciálódásban betöltött szerepe kevésbé ismert. A VSMC-t és a pericitát markerek alapján nem lehet megkülönböztetni, működésükben azonban eltérő: a VSMC-k a nagy ereket támogatják és a véráramlás szabályozásban vesznek részt, míg a periciták a kapillárisoknál találhatók meg és az erek bimbózását irányítják valamint a terminációt segítik elő.¹³ Izomsejt differenciáció vonatkozásában kimutatták, hogy a vad típusú MSC-khez képest a Gal-1 knockout egérből izolált mioblasztok kevésbé voltak képesek differenciálódni mind *in vitro*, mind *in vivo* kísérleti rendszerben.⁹⁹ Oka abban rejlik, hogy a Gal-1 befolyásolja a mioblaszt adhéziós receptora, az $\alpha 7\beta 1$ integrin és ligandja, a laminin, közti kölcsönhatást, mely által gátolja a migrációt, ugyanakkor elősegíti a mioblasztok miotubulussá történő fúzióját.¹⁰⁰ A VSMC eredetű Gal-1 funkciójára utal az az eredmény, miszerint pulmonalis hipertensio esetén Gal-1 knockout egérben csökken a vaszkuláris ellenállás, ami azzal magyarázható, hogy az VSMC-k differenciálódási képessége csökken Gal-1 hiányában, minek következtében kevésbé képesek kontrakcióra.¹⁰¹ Aktivált endotél sejt modellként a H5V is termeli a Gal-1 fehérjét, melynek jelenléte a sejtfelszínről is kimutatható (Függelék, XII. 3. ábra).¹⁰² Az MSC és H5V sejtek által szekretált Gal-1 az angiogenezis *in vitro* modelljében betöltött szerepét tovább erősíti, hogy a vad típusú MSC és H5V ko-kultúrában a Gal-1 TDG-vel való gátlásakor szignifikánsan lecsökkent a pre-vaszkuláris struktúrák hossza.

Az MSC és endotél sejtek együtt tenyésztése nem csak a sejtek pre-vaszkuláris összerendeződését, hanem azok osztódási ütemét is befolyásolja. Az MSC-k osztódási sebessége Gal-1 expressziójuktól függetlenül megnő H5V hatására. Ezzel ellentétben az MSC-k Gal-1 termelésüktől függően befolyásolják az endotél sejtek osztódását; a vad típusú MSC nem gyakorol hatást a H5V proliferációjára, ellentétben a Gal-1 knockout MSC-vel, mely dóziszfüggően gátolja az endotél sejtek osztódását. VSMC-k két fenotípusa ismert: a szintetikus és egyben osztódó, valamint a differenciált, kontrakcióra

képes forma. Korábbi feltételezések szerint a két fenotípus egymást kizáró állapotokat mutat, azonban később bebizonyították, hogy a VSMC-k differenciált formában is képesek osztódni.¹⁰³ Feltételezhető, hogy hasonló mechanizmus alapján, az endotél sejtek serkentik az MSC-k proliferációját, mindeközben a differenciálódást mutató pre-vaszkuláris struktúrák formálódása is végbemegy. Mills és mtsai beszámoltak arról, hogy a periciták gátolják az EC-k osztódását,¹⁰⁴ melyet mi is megfigyeltünk Gal-1 hiányos MSC esetén. A MSC^{vt} azonban nem gyakorolt gátló hatást az endotél sejtek osztódására. A jelenség hátterében feltételezhetően az MSC-k által termelt Gal-1 pro-angiogén hatása állhat, mely az EC-k osztódását nem befolyásolja, de jelentősen hozzájárul az *in vitro* pre-vaszkuláris struktúrák kialakulásához.

Megfigyeltük, hogy míg a vad típusú MSC-k jelenlétében a ko-kultúra sejtjeinek életképessége nem változott, addig a Gal-1 knockout MSC-vel együtt tenyésztett H5V kultúrában szignifikánsan megnőtt az elpusztult sejtek aránya. Hipotézisünk szerint az MSC eredetű Gal-1 egyik szerepe lehet, hogy védelmet nyújt az endotél sejteknek a környezeti stressz által indukált sejthalállal szemben. Ezt látszik alátámasztani Ito és mtsai közleménye, melyben kimutatták, hogy a Gal-1 csendesítése oxidatív stresszre érzékenyíti az EC-k, mely végül apoptózishoz vezet.¹⁰⁵

Az MSC-eredetű Gal-1 hatása *in vivo* tumoros állatmodellben is vizsgálható. Ebben a vonatkozásban azonban figyelembe kell venni mind az MSC, mind az MSC-eredetű Gal-1 tumorfejlődésre gyakorolt hatásának két eltérő lehetséges funkcióját, a pro-angiogén és a tumor immunprivilegiumot biztosító immunszuppresszív szerepet, továbbá azt a tényt, hogy maguk a tumorsejtek is expresszálhatnak Gal-1-et. A tumorszövet nem csak az endogén MSC-eket képes magához toborozni, hanem az exogén úton bejuttatott sejtek is a daganatszövetben halmozódnak fel, hatásukat tekintve azonban az irodalmi adatok ellentmondásosak. Lu és munkatársai az MSC tumor gátló hatását tapasztalták hepatómában és limfómában.¹⁰⁶ Mások hepatocelluláris karcinóma, valamint emlőkarcinóma esetén tumor növekedés serkentő hatást jegyeztek fel.^{107,108} Lehetséges magyarázatul az szolgálhat, hogy a különböző kísérletekben az MSC-k eltérő szöveti eredetűek és különböző korú donorokból származtak, valamint eltérő sejtszámban és módon végezték velük a kezeléseket.¹⁰⁹ Munkánk során kétféle rendszerben vizsgáltuk az MSC-eredetű Gal-1 tumorfejlődésre gyakorolt hatását:

egyrészt 4T1 emlőkarcinómát már hordozó egereket kezeltünk kétféle MSC-vel intravénásan, másrészt 4T1 tumorsejtet injektáltuk együtt vad ill. Gal-1 knockout MSC-vel egyidőben. Mindkét általunk használt kísérleti rendszerben azt tapasztaltuk, hogy a vad típusú, Gal-1-et kifejező MSC támogatta az emlőkarcinóma fejlődését, míg a Gal-1 hiányos MSC-k nem befolyásolták a daganat növekedését. A tumorszövet érdenzítésének összehasonlítása a Gal-1 expresszázó és Gal-1 deficiens MSC ko-transzplantációjakor azt mutatta, hogy az MSC^{vt} kezelt egerek daganata szignifikánsan vaszkularizáltabb volt, mint a Gal-1 hiányos MSC-vel kezeltéké. Ez az eredmény összhangban van Zhang és mtsai azon közlésével, hogy az MSC-k jelentősen serkentetik az emlőkarcinóma érképződését és ezáltal a tumornövekedést.¹⁰⁸ Eredményeinket az is alátámasztja, hogy az EC-k kisebb mértékben vándorolnak Gal-1 csendesített, telomeráz transzformált és ezáltal tumorigénné váló MSC által kialakított tumorba.⁹⁸ A sztrómális Gal-1 kiemelkedő szerepére utal az is, hogy a vad típusú egerekhez képest a Gal-1 knockout egerekben a kismértékű tumor-erezettség miatt szignifikánsan gátolt a Gal-1 nem termelő daganatsejtek növekedése.⁸⁹ A tumorsejtek által termelt Gal-1, bár csökkenti a vad típusú és Gal-1 knockout egér tumormérete közti különbséget, de a sztrómális Gal-1 hiányt nem képes helyreállítani.¹⁰² Saját kísérleteink is jelezték a sztrómális Gal-1 fontosságát, mivel a Gal-1 termelő melanóma sejtek növekedése Gal-1 knockout egérben elmaradt a vad típusú egérben kialakuló tumorhoz képest.¹¹⁰

A daganat növekedéséhez az érképződés mellett az immunszuppresszív tumor mikro környezet kialakítása is hozzájárul. A tumorsejt-eredetű Gal-1 szerepe elsősorban az immunválasz gátlásában nyilvánul meg, melyet Rubinstein és mtsai igazoltak. Kísérleteinkben a Gal-1 csendesített melanóma sejtek ellen kialakuló hatékony immunválasz a daganat kilökődését eredményezte.⁸¹ Azt a kérdést, hogy vajon az MSC-eredetű Gal-1 hozzájárul-e a tumor-specifikus immunválasz kivédéséhez *in vivo*, X-SCID-modell egerek alkalmazásával válaszoltuk meg. Az X-SCID egerek nem rendelkeznek érett T sejtekkel,¹¹¹ így nem tud bennük kialakulni tumor-ellenes specifikus immunválasz, mely ideális modellt teszük őket arra, hogy az immunrendszer tumorfejlődésben betöltött szerepét követni lehessen. A melanómaszövet hasonló növekedési kinetikát mutatott X-SCID egerekben, mint egészséges immunrendszerrel rendelkező egerekben, valamint a Gal-1 termelő MSC^{vt} ez esetben is serkentette a

tumornövekedést, míg a Gal-1 hiányos MSC nem. Ez az eredményarra utal, hogy az MSC-eredetű Gal-1 elsősorban nem az immunszuppresszió által támogatja a daganatfejlődést. Az MSC-k által termelt Gal-1 immunológiai szerepét saját, nem publikált, és más laboratóriumok *in vitro* eredményei is alátámasztják,^{112,113} ugyanakkor saját *in vitro* kísérleteink alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy az MSC-k által termelt Gal-1 csak közvetlen sejt-sejt kölcsönhatás esetén gátolja a T-sejt proliferációt és indukál apoptózist (Blaskó és mtsi, nem publikált eredmény). Ezzel összhangban áll az a megfigyelés, hogy az MSC-k immunszuppresszív funkciójuk következtében ugyan terápiás hatást gyakorolnak autoimmun diabetes egérmodellben,¹¹⁴ de ez a hatásuk nem függ a Gal-1 termelésüktől (Uher Ferenc és mtsi, nem publikált adat). Feltételezhető, hogy az *in vivo* kísérleteinkben az MSC-k immunszuppresszív funkciója egyéb, szolubilis faktorok útján valósul meg, amennyiben az MSC-k nem kerülnek közvetlen kapcsolatba az immunsejtekkel, ami a Gal-1 hatásmechanizmusának feltétele.

Összességében megállapíthatjuk, hogy az *in vitro* pre-vaszkuláris hálózatképzés megfelelő indikációt adott az MSC-eredetű Gal-1 angiogenezisben betöltött szerepére, melyet *in vivo* is igazoltunk. Munkánk során alátámasztottuk, hogy az MSC által termelt immunszuppresszív és pro-angiogén hatású Gal-1 elsősorban nem a tumorsejtek ellen irányuló immunválasz gátlásával, hanem a tumor angiogenezisének serkentésével támogatja a daganatszövet gyorsabb növekedését.

Az akut Graft versus host betegség, miocardialis infarctus, multiplex sclerosis és még számos betegség esetén az MSC-k elérték az I-es, egyes esetekben a II-es klinikai fázisú vizsgálatot.¹¹⁵ Munkánk során más kutatócsoporttal összhangban bebizonyítottuk, hogy az MSC-k jelentősen hozzájárulnak a daganatfejlődés felgyorsításához. Eredményeink azonban felhívják a figyelmet arra, hogy egyetlen molekula, a Gal-1 kiiktatásával egy olyan sejterápiás eszközhöz juthatunk, mely biztonságosan alkalmazható lappangó tumoros megbetegedést hordozó páciensek esetén is.

VIII. Irodalomjegyzék

1. Karamysheva, a F. Mechanisms of angiogenesis. *Biochem. Biokhimiia* **73**, 751–62 (2008).
2. Zhong, T. P., Childs, S., Leu, J. P. & Fishman, M. C. Gridlock signalling pathway fashions the first embryonic artery. *Nature* **414**, 216–20 (2001).
3. Herzog, Y., Guttmann-Raviv, N. & Neufeld, G. Segregation of arterial and venous markers in subpopulations of blood islands before vessel formation. *Dev. Dyn.* **232**, 1047–55 (2005).
4. Yoo, S. Y. & Kwon, S. M. Angiogenesis and its therapeutic opportunities. *Mediators Inflamm.* **2013**, 127170 (2013).
5. De Spiegelaere, W. *et al.* Intussusceptive angiogenesis: a biologically relevant form of angiogenesis. *J. Vasc. Res.* **49**, 390–404 (2012).
6. Wietecha, M. S. & Dipietro, L. a. Therapeutic Approaches to the Regulation of Wound Angiogenesis. *Adv. wound care* **2**, 81–86 (2013).
7. Reynolds, L. P. & Redmer, D. A. Angiogenesis in the Placenta. *Biol. Reprod.* **64**, 1033–1040 (2001).
8. De Falco, S. The discovery of placenta growth factor and its biological activity. *Exp. Mol. Med.* **44**, 1–9 (2012).
9. Balaji, S., King, A., Crombleholme, T. M. & Keswani, S. G. The Role of Endothelial Progenitor Cells in Postnatal Vasculogenesis: Implications for Therapeutic Neovascularization and Wound Healing. *Adv. wound care* **2**, 283–295 (2013).
10. Maxwell, P. H. *et al.* Hypoxia-inducible factor-1 modulates gene expression in solid tumors and influences both angiogenesis and tumor growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 8104–9 (1997).
11. Carmeliet, P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat. Med.* **6**, 389–95 (2000).
12. Clapp, C., Thebault, P. & Jeziorski, M. C. Peptide Hormone Regulation of Angiogenesis. *Physiol Rev* **89**, 1177–1215 (2009).
13. Carmeliet, P. & Jain, R. K. Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* **10**, 417–27 (2011).

14. Dhar, K. *et al.* Tumor cell-derived PDGF-B potentiates mouse mesenchymal stem cells-pericytes transition and recruitment through an interaction with NRP-1. *Mol. Cancer* **9**, 209 (2010).
15. Benjamin, L. E., Hemo, I. & Keshet, E. A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF. *Development* **125**, 1591–8 (1998).
16. Dickson, M. C. *et al.* Defective haematopoiesis and vasculogenesis in transforming growth factor-beta 1 knock out mice. *Development* **121**, 1845–54 (1995).
17. Staton, C. a, Reed, M. W. R. & Brown, N. J. A critical analysis of current in vitro and in vivo angiogenesis assays. *Int. J. Exp. Pathol.* **90**, 195–221 (2009).
18. Kleinman, H. K. & Martin, G. R. Matrigel: basement membrane matrix with biological activity. *Semin. Cancer Biol.* **15**, 378–86 (2005).
19. Donovan, D., Brown, N. J., Bishop, E. T. & Lewis, C. E. Comparison of three in vitro human “angiogenesis” assays with capillaries formed in vivo. *Angiogenesis* **4**, 113–21 (2001).
20. Bishop, E. T. *et al.* An in vitro model of angiogenesis: basic features. *Angiogenesis* **3**, 335–44 (1999).
21. Chen, Z. *et al.* In vitro angiogenesis by human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) induced by three-dimensional co-culture with glioblastoma cells. *J. Neurooncol.* **92**, 121–8 (2009).
22. Hanahan, D. & Weinberg, R. a. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646–74 (2011).
23. Sherley, J. L. New cancer diagnostics and therapeutics from a ninth “hallmark of cancer”: symmetric self-renewal by mutated distributed stem cells. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **13**, 797–810 (2013).
24. Folkman, J. Tumor Angiogenesis: A Possible Control Point in Tumor Growth. *Ann Intern Med* **82**, 96–100 (1975).
25. Zhao, X.-Y. *et al.* Hypoxia inducible factor-1 mediates expression of galectin-1: the potential role in migration/invasion of colorectal cancer cells. *Carcinogenesis* **31**, 1367–75 (2010).
26. Hillen, F. & Griffioen, A. W. Tumour vascularization: sprouting angiogenesis and beyond. *Cancer Metastasis Rev.* **26**, 489–502 (2007).

27. Gabriel Helmlinger, Fan Yuan, M. D. & R. K. J. Interstitial pH and pO₂ gradients in solid tumors in vivo: High-resolution measurements reveal a lack of correlation. *Nat. Med.* (1997).
28. Cheng, L. *et al.* Glioblastoma stem cells generate vascular pericytes to support vessel function and tumor growth. *Cell* **153**, 139–52 (2013).
29. Jain, R. K. Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: a new paradigm for combination therapy. *Nat. Med.* **7**, 987–9 (2001).
30. Malgieri, A., Kantzari, E., Patrizi, M. P. & Gambardella, S. Bone marrow and umbilical cord blood human mesenchymal stem cells: state of the art. *Int. J. Clin. Exp. Med.* **3**, 248–69 (2010).
31. Dominici, M. *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **8**, 315–7 (2006).
32. Tropel, P. *et al.* Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow. *Exp. Cell Res.* **295**, 395–406 (2004).
33. Mosna, F. & Sensebe, L. Human Bone Marrow and Adipose Tissue Mesenchymal Stem Cells : A User ' s Guide. *Stem Cells Dev.* **19**, 1449–1470 (2010).
34. Lin, C.-S. & Lue, T. F. Defining vascular stem cells. *Stem Cells Dev.* **22**, 1018–26 (2013).
35. Quante, M. *et al.* Bone marrow-derived myofibroblasts contribute to the mesenchymal stem cell niche and promote tumor growth. *Cancer Cell* **19**, 257–272 (2011).
36. Mishra, P. J. *et al.* Carcinoma-associated fibroblast-like differentiation of human mesenchymal stem cells. *Cancer Res.* **68**, 4331–9 (2008).
37. Beckermann, B. M. *et al.* VEGF expression by mesenchymal stem cells contributes to angiogenesis in pancreatic carcinoma. *Br. J. Cancer* **99**, 622–31 (2008).
38. Aller MA, Arias JL, Nava MP, A. J. Posttraumatic Inflammation Is a Complex Response Based on the Pathological Expression of the Nervous, Immune, and Endocrine Functional Systems. *Exp Biol Med* **229**, 170–181 (2004).
39. Vakkila, J. & Lotze, M. T. Inflammation and necrosis promote tumour growth. *Nat. Immunol.* **4**, 641–648 (2004).
40. Karin, M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature* **441**, 431–6 (2006).

41. Smyth, M. J., Dunn, G. P. & Robert, S. Cancer Immun-surveillance and Immunoediting: The Roles of Immunity in Suppressing Tumor Development and Shaping Tumor Immunogenicity. *Adv. Immunol.* **90**, (2006).
42. Cheng, J. *et al.* Interleukin-1 α induces immunosuppression by mesenchymal stem cells promoting the growth of prostate cancer cells. *Mol. Med. Rep.* **6**, 955–60 (2012).
43. Ren, G. *et al.* Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell* **2**, 141–50 (2008).
44. Meisel, R. *et al.* Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood* **103**, 4619–21 (2004).
45. Aggarwal, S. & Pittenger, M. F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* **105**, 1815–22 (2005).
46. Kawakami K, Kawakami M, P. R. Overexpressed Cell Surface Interleukin-4 Receptor Molecules Can Be Successfully Targeted for Antitumor Cytotoxin Therapy. *Crit. Rev. Immunol.* **21**, 299–310 (2001).
47. Chomarat, P., Banchereau, J., Davoust, J. & Palucka, a K. IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. *Nat. Immunol.* **1**, 510–4 (2000).
48. Németh, K. *et al.* Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat. Med.* **15**, 42–9 (2009).
49. Kosmaczewska A, Ciszak L, Potoczek S, F. I. The significance of Treg cells in defective tumor immunity. *Arch Immunol Ther Exp* **56**, 181–191 (2008).
50. Samuel, B. Galectins. A family of animal b-galactoside-binding lectins. *J. Pediatr. Surg.* **49**, 664 (2014).
51. Iida, A., Ozaki, K., Tanaka, T. & Nakamura, Y. Fine-scale SNP map of an 11-kb genomic region at 22q13.1 containing the galectin-1 gene. *J. Hum. Genet.* **50**, 42–5 (2005).
52. Salomonsson, E. *et al.* Monovalent interactions of galectin-1. *Biochemistry* **49**, 9518–32 (2010).
53. Cho, M. C. D. R. Galectin-1, a b-galactoside-binding lectin in chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* **270**, 5198 (1995).

54. Camby, I., Le Mercier, M., Lefranc, F. & Kiss, R. Galectin-1: a small protein with major functions. *Glycobiology* **16**, 137R–157R (2006).
55. Clerch LB, Whitney P, Hass M, Brew K, Miller T, Werner R, M. D. Sequence of a full-length cDNA for rat lung beta-galactoside-binding protein: primary and secondary structure of the lectin. *Biochemistry* **27**, 692–699 (1988).
56. Cho M, C. R. Galectin-1, a beta-galactoside-binding lectin in Chinese hamster ovary cells. II. Localization and biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **270**, 5207–12 (1995).
57. Nickel, W. Unconventional secretory routes: direct protein export across the plasma membrane of mammalian cells. *Traffic* **6**, 607–14 (2005).
58. Seelenmeyer, C. *et al.* Cell surface counter receptors are essential components of the unconventional export machinery of galectin-1. *J. Cell Biol.* **171**, 373–81 (2005).
59. Moiseeva, E. P., Javed, Q., Spring, E. L. & de Bono, D. P. Galectin 1 is involved in vascular smooth muscle cell proliferation. *Cardiovasc. Res.* **45**, 493–502 (2000).
60. Stillman, B. N. *et al.* Galectin-3 and galectin-1 bind distinct cell surface Glycoprotein Receptors to Induce T Cell Death. *J. Immunol.* **176**, 778–789 (2006).
61. Fajka-Boja, R. *et al.* Receptor tyrosine phosphatase, CD45 binds galectin-1 but does not mediate its apoptotic signal in T cell lines. *Immunol. Lett.* **82**, 149–54 (2002).
62. Francisco, S. Evidence for export of a muscle lectin from cytosol to extracellular matrix and for a novel secretory mechanism. *JCB* **I**, 1681–1691 (1990).
63. Horie, H. *et al.* Oxidized galectin-1 stimulates macrophages to promote axonal regeneration in peripheral nerves after axotomy. *J. Neurosci.* **24**, 1873–80 (2004).
64. Sotomayor, C. E. & Rabinovich, G. a. Galectin-1 induces central and peripheral cell death: implications in T-cell physiopathology. *Dev. Immunol.* **7**, 117–29 (2000).
65. Blois, S. M. *et al.* A pivotal role for galectin-1 in fetomaternal tolerance. *Nat. Med.* **13**, 1450–7 (2007).
66. Dettin, L. Regulated Expression and Ultrastructural Localization of Galectin-1, a Proapoptotic -Galactoside-Binding Lectin, During Spermatogenesis in Rat Testis. *Biol. Reprod.* **68**, 51–59 (2002).

67. Vas, V. *et al.* Biphasic effect of recombinant galectin-1 on the growth and death of early hematopoietic cells. *Stem Cells* **23**, 279–87 (2005).
68. Suzuki, K., Sun, R., Origuchi, M. & Kanehira, M. MSC tumor neovascularization. (2011).
69. Compagno, D., Laderach, D. J., Gentilini, L., Jaworski, F. M. & Rabinovich, G. a. Delineating the “galectin signature” of the tumor microenvironment. *Oncoimmunology* **2**, e23565 (2013).
70. Danguy, A., Camby, I. & Kiss, R. Galectins and cancer. *Biochim. Biophys. Acta* **1572**, 285–93 (2002).
71. Rabinovich, G. a. Galectin-1 as a potential cancer target. *Br. J. Cancer* **92**, 1188–92 (2005).
72. Le Mercier, M. *et al.* Evidence of galectin-1 involvement in glioma chemoresistance. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **229**, 172–83 (2008).
73. Sanjuán, X. *et al.* Differential expression of galectin 3 and galectin 1 in colorectal cancer progression. *Gastroenterology* **113**, 1906–15 (1997).
74. Van den Brûle, F. a, Waltregny, D. & Castronovo, V. Increased expression of galectin-1 in carcinoma-associated stroma predicts poor outcome in prostate carcinoma patients. *J. Pathol.* **193**, 80–7 (2001).
75. Tinari, N. *et al.* Glycoprotein 90K/MAC-2BP interacts with galectin-1 and mediates galectin-1-induced cell aggregation. *Int. J. Cancer* **91**, 167–72 (2001).
76. Van den Brule, F. C. V. Galectin-1 Modulates Human Melanoma Cell Adhesion to Laminin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **209**, 760–767 (1995).
77. Chung, L.-Y. *et al.* Galectin-1 promotes lung cancer progression and chemoresistance by upregulating p38 MAPK, ERK, and cyclooxygenase-2. *Clin. Cancer Res.* **18**, 4037–47 (2012).
78. Wu, M.-H. *et al.* Galectin-1-mediated tumor invasion and metastasis, up-regulated matrix metalloproteinase expression, and reorganized actin cytoskeletons. *Mol. Cancer Res.* **7**, 311–8 (2009).
79. Thijssen, V. L. *et al.* Tumor cells secrete galectin-1 to enhance endothelial cell activity. *Cancer Res.* **70**, 6216–24 (2010).
80. Cedeno-Laurent, F. *et al.* Metabolic inhibition of galectin-1-binding carbohydrates accentuates antitumor immunity. *J. Invest. Dermatol.* **132**, 410–20 (2012).

81. Rubinstein, N. *et al.* 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**, 241–51 (2004).
82. Thijssen, V. L., Hulsmans, S. & Griffioen, A. W. The galectin profile of the endothelium: altered expression and localization in activated and tumor endothelial cells. *Am. J. Pathol.* **172**, 545–53 (2008).
83. Dirksen, A. E. M. *et al.* Tumor Angiogenesis Modulates Leukocyte-Vessel Wall Interactions in Vivo by Reducing Endothelial Adhesion Molecule Expression. *Cancer Res.* **63**, 2322–2329 (2003).
84. Blaskó, A., Fajka-Boja, R., Ion, G. & Monostori, E. How does it act when soluble? Critical evaluation of mechanism of galectin-1 induced T-cell apoptosis. *Acta Biol. Hung.* **62**, 106–11 (2011).
85. Kovács-Sólyom, F. *et al.* Mechanism of tumor cell-induced T-cell apoptosis mediated by galectin-1. *Immunol. Lett.* **127**, 108–18 (2010).
86. Cooper, D. & Rabinovich, G. A. Multiple functional targets of the immunoregulatory activity of Galectin-1: Control of immune cell trafficking, dendritic cell physiology, and T-cell fate. *Methods Enzymol.* **480**, (2010).
87. Toscano, M. a *et al.* Differential glycosylation of TH1, TH2 and TH-17 effector cells selectively regulates susceptibility to cell death. *Nat. Immunol.* **8**, 825–34 (2007).
88. Cedeno-Laurent, F. & Dimitroff, C. J. Galectin-1 research in T cell immunity: past, present and future. *Clin. Immunol.* **142**, 107–16 (2012).
89. Thijssen, V. L. J. L. *et al.* Galectin-1 is essential in tumor angiogenesis and is a target for antiangiogenesis therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 15975–80 (2006).
90. Lotan, R. *et al.* Expression of galectins on microvessel endothelial cells and their involvement in tumour cell adhesion. *Glycoconj. J.* **11**, 462–8 (1994).
91. Neri, D. & Bicknell, R. Tumour vascular targeting. *Nat. Rev. Cancer* **5**, 436–46 (2005).
92. Peister, A. *et al.* Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes , rates of proliferation , and differentiation potential. **103**, 1662–1668 (2004).
93. Matthews, B. D. J. *et al.* Function of the interleukin-2 (IL-2) receptor gamma-chain in biologic responses of X-linked severe combined immunodeficient B cells to IL-2, IL-4, IL-13, and IL-15. *Am. Soc. Hematol.* **85**, 38–42 (1995).

94. Hirschi, K. K., Rohovsky, S. A. & Amore, P. A. D. PDGF, TGF- β , and Heterotypic Cell–Cell Interactions Mediate Endothelial Cell–induced Recruitment of 10T1/2 Cells and Their Differentiation to a Smooth Muscle Fate. *J. Cell Biol.* **141**, 805–814 (1998).
95. Li, H. *et al.* The role of vascular actors in two dimensional dialogue of human bone marrow stromal cell and endothelial cell for inducing self-assembled network. *PLoS One* **6**, e16767 (2011).
96. Loibl, M. *et al.* Direct cell-cell contact between mesenchymal stem cells and endothelial progenitor cells induces a pericyte-like phenotype in vitro. *Biomed Res. Int.* **2014**, 395781 (2014).
97. Au, P., Tam, J., Fukumura, D. & Jain, R. K. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells facilitate engineering of long-lasting functional vasculature. *Blood* **111**, 4551–8 (2008).
98. Burns, J. S. *et al.* Decellularized matrix from tumorigenic human mesenchymal stem cells promotes neovascularization with galectin-1 dependent endothelial interaction. *PLoS One* **6**, e21888 (2011).
99. Georgiadis, V. *et al.* Lack of galectin-1 results in defects in myoblast fusion and muscle regeneration. *Dev. Dyn.* **236**, 1014–24 (2007).
100. Gu, M., Wang, W., Song, W. K., Cooper, D. N. & Kaufman, S. J. 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**), 175–81 (1994).
101. Case, D. *et al.* Mice deficient in galectin-1 exhibit attenuated physiological responses to chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **292**, 154–164 (2007).
102. Thijssen, V. L. *et al.* Tumor cells secrete galectin-1 to enhance endothelial cell activity. *Cancer Res.* **70**, 6216–24 (2010).
103. Lee, S. H., Hungerford, J. E., Little, C. D. & Iruela-Arispe, M. L. Proliferation and differentiation of smooth muscle cell precursors occurs simultaneously during the development of the vessel wall. *Dev. Dyn.* **209**, 342–52 (1997).
104. Mills, S. J., Cowin, A. J. & Kaur, P. Pericytes, mesenchymal stem cells and the wound healing process. *Cells* **2**, 621–34 (2013).
105. Ito, K. *et al.* Thiodigalactoside inhibits murine cancers by concurrently blocking effects of galectin-1 on immune dysregulation, angiogenesis and protection against oxidative stress. *Angiogenesis* **14**, 293–307 (2011).

106. Lu, Y. *et al.* The growth inhibitory effect of mesenchymal stem cells on tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Biol. Ther.* **7**, 245–51 (2008).
107. Han, Z. *et al.* Mesenchymal stem cells contribute to the chemoresistance of hepatocellular carcinoma cells in inflammatory environment by inducing autophagy. *Cell Biosci.* **4**, 22 (2014).
108. Zhang, T. *et al.* Bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote growth and angiogenesis of breast and prostate tumors. *Stem Cell Res. Ther.* **4**, 70 (2013).
109. Klopp, A. H., Gupta, A., Spaeth, E., Andreeff, M. & Marini, F. Concise review: Dissecting a discrepancy in the literature: do mesenchymal stem cells support or suppress tumor growth? *Stem Cells* **29**, 11–9 (2011).
110. Gabor Janos Szebeni Joo, G. Identification of Galectin-1 as a Critical Factor in Function of Mouse Mesenchymal Stromal Cell-Mediated Tumor Promotion. **7**, 1–13 (2012).
111. Romano, R. *et al.* From murine to human nude/SCID: the thymus, T-cell development and the missing link. *Clin. Dev. Immunol.* **2012**, 467101 (2012).
112. Gieseke, F. *et al.* Human multipotent mesenchymal stromal cells use galectin-1 to inhibit immune effector cells. *Hematop. Stem Cells* **116**, 3770–3779 (2010).
113. Mourcin, F. *et al.* Galectin-1-expressing stromal cells constitute a specific niche for pre-BII cell development in mouse bone marrow. *Blood* **117**, 6552–61 (2011).
114. Urbán, V. S. *et al.* Mesenchymal stem cells cooperate with bone marrow cells in therapy of diabetes. *Stem Cells* **26**, 244–53 (2008).
115. Kim, N. & Cho, S.-G. Clinical applications of mesenchymal stem cells. *Korean J. Intern. Med.* **28**, 387–402 (2013).

IX. Saját közlemények

1. Hegedüs Z, Wéber E, Végh L, Váczi B, Tubak V, **Kriston-Pál É**, Kele Z, Martinek TA. Two-stage interaction of the tumor nursing galectin-1 with the antiangiogenic peptide anginex. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 2014; DOI 10.1007/s10973-014-4031-9 IF(2012): 1.9
2. Novák J, **Kriston-Pál É**, Czibula Á, Deák M, Kovács L, Monostori É, Fajka-Boja R. GM1 controlled lateral segregation of tyrosine kinase Lck predispose T-cells to cell-derived galectin-1-induced apoptosis. *Molecular Immunology* 2014; 57(2):302-9. IF(2012): 2.64
3. Hegedüs Z, Wéber E, **Kriston-Pál É**, Makra I, Czibula Á, Monostori É, Martinek TA. Foldameric α/β -peptide analogs of the β -sheet-forming antiangiogenic anginex: structure and bioactivity. *Journal of American Chemical Society* 2013; 135(44):16578-84. IF(2012): 10.67
4. Szebeni GJ*, **Kriston-Pál É***, Blazsó P, Katona RL, Novák J, Szabó E, Czibula Á, Fajka-Boja R, Hegyi B, Uher F, Krenács L, Joó G, Monostori É. Identification of galectin-1 as a critical factor in function of mouse mesenchymal stromal cell-mediated tumor promotion. *PLoS One*. 2012; 7(7):e41372. IF(2012): 3.73

*megosztott első szerzők

összes IF: 18.9

X. Összefoglalás

A tumorigenezis során az egészséges sejtek növekedést szabályozó génjeiben mutációkat halmoznak fel, melynek következtében kikerülnek a szigorú kontroll alól, és korlátlan osztódásnak indulnak. A tumorsejtek önmagukban azonban nem lennének képesek az egész szervezetet érintő megbetegedés kialakítására, ehhez szükség van arra, hogy a fennmaradásukat támogató kötőszövettel, tumor-asszociált sztrómával rendelkezzen, mely extracelluláris mátrixból, valamint különféle sejtípusokból, például fibroblasztokból, endotél sejtekből, pericitákból/ér simaizom sejtekből, immunsejtekből tevődik össze. A tumorsejtek és a sztróma komponensek egymásra gyakorolt hatásának eredményeként alakulnak ki a sokszor leküzdhetetlennek bizonyuló daganatos megbetegedések.

A daganat kötőszöveti sejtjeinek eredete nem teljesen ismert. Egyik forrása a csontvelői mezenhimális őssejtek (MSC-k) lehetnek, melyek a tumorsejtekből felszabaduló faktorok hatására a tumorba vándorolnak. A daganatszövethez érve heterotípusos kapcsolataik, szekretált molekuláik vagy fibroblasztá és ereket támogató pericitákká/ér simaizom sejtekké történő differenciáció révén támogatják a tumor fejlődését. A szilárd daganat sejtjei és/vagy sztrómális elemei által termelt szénhidrát-kötő fehérje, a Gal-1, az egyik olyan faktor, mely a daganat immunprivilegiumának kialakításával segíti annak progresszióját. Az MSC-k is nagy mennyiségben termelik ezt a fehérjét, arról azonban kevés információ áll birtokunkban, hogy az általuk termelt Gal-1-nek milyen szerepe lehet a daganatfejlődésben, így kísérleteink ennek a kérdésnek a megválaszolására irányultak.

Munkánk során vad típusú ill. Gal-1 knockout egér csontvelőjéből nyert MSC-eket használtunk (MSC^{vt} ill. MSC^{Gal-1^{-/-}}). A H5V egér endotél sejtek és az MSC-k egymásra gyakorolt hatását először *in vitro* modell rendszerben vizsgáltuk. Az együtt inkubált sejtek pre-vaszkuláris hálózatokat alakítottak ki, melyek kiterjedése jelentősen függött az MSC-k által termelt Gal-1 jelenlététől, ugyanis MSC^{vt} esetében összetettebb hálózatok alakultak ki, mint MSC^{Gal-1^{-/-}} jelenlétében. Létrehozásukhoz közvetlen sejtkapcsolat kialakulására volt szükség, valamint bebizonyítottuk, hogy mindkét sejtípus részt vett a pre-vaszkuláris struktúrák formálásában. Kimutattuk, hogy a

kétféle MSC osztódásbeli különbsége nem befolyásolja a pre-vaszkuláris sejt-kapcsolatok kialakulását. A sejtek által termelt és szekretált Gal-1 szerepét erősíti az a tény, hogy TDG-vel történő eltávolításával csökkent mértékű heterotípusos sejt-összerendeződést figyeltünk meg. A kétféle sejt-típus osztódás szempontjából is hatást gyakorolt egymásra. A H5V sejtek Gal-1 termeléstől függetlenül serkentették mindkét féle MSC növekedését. Ezzel szemben az endotél sejtek proliferációját az MSC^{vt} nem befolyásolta, míg az MSC^{Gal-1-/-} jelentősen gátolta. A MSC^{vt} azonban nem gyakorolt gátló hatást az endotél sejtek osztódására. A jelenség hátterében feltételezhetően az MSC-k által termelt Gal-1 pro-angiogén hatása állhat, mely az EC-k osztódását nem befolyásolja, de jelentősen hozzájárul az *in vitro* pre-vaszkuláris struktúrák kialakulásának támogatásához.

Az *in vitro* eredmények azt sugallják, hogy az MSC-eredetű Gal-1 részt vesz az angiogenezis támogatásában. Ennek igazolására kétféle *in vivo* tumor modell rendszert használtunk. Egyrészt az MSC-eket a 4T1 emlőkarcinóma sejtekkel együtt juttattuk be az egerek emlőszövetbe, másrészt emlőkarcinómát hordozó egereket kezeltünk MSC-vel intravénásan. Mindkét esetben azt tapasztaltuk, hogy a MSC^{vt} serkenti a tumor fejlődését, míg Gal-1 hiányos MSC kezelésnél elmaradt ez a tumor támogató hatás. Annak kiderítésére, hogy az MSC-eredetű Gal-1 az immunsejtek gátlásával támogatja-e a daganat fejlődését, immunhiányos SCID egereket oltottunk B16F10 melanóma sejtekkel és MSC-vel. Mivel nem tapasztaltunk különbséget az egészséges és immunhiányos egerek daganatnövekedési kinetikájában, így megállapítottuk, hogy az MSC által termelt Gal-1 nem az immunrendszer befolyásolásával támogatja a tumorfejlődést. Az MSC-eredetű Gal-1 immunválasz gátló hatását kizárva szövettanilag analizáltuk az emlődaganatokat, és megfigyeltük, hogy vad típusú MSC jelenlétében a tumorerek sűrűsége szignifikánsan megemelkedett. Az *in vitro* modellben és az *in vivo* állat kísérletek során kapott eredményeink alátámasztják, hogy az MSC-eredetű Gal-1 nem az immunválasz gátlásával, hanem az angiogenezis támogatásával szabályozza a daganatnövekedést.

Az MSC-eredetű Gal-1 szerepének tisztázására az MSC klinikai használata ad okot, és eredményeink rámutatnak arra, hogy a Gal-1 kiiktatásával olyan kisebb

kockázattal alkalmazható sejttérapiás eszközhöz juthatunk, melynél már nem áll fenn az esetleges lappangó tumorok növekedésének serkentése.

XI. Summary

The tumor cells can not survive in the host therefore they recruit healthy stromal cells into the tumor mass which eventually form a special tumor-supporting tumor associated stroma. Stroma consists of different components such as fibroblasts, endothelial cells, pericytes, vascular smooth muscle cells, immun cells and extracellular matrix. Impact of stromal cells and tumor cells on each other results in frequently incurable cancer disease.

Origin of tumor stroma has not well known yet. One source can be the bone marrow mesenchymal stem cells which can migrate and accumulate into the tumor mass. Once reaching the tumor, MSCs can support the growth of tumor different ways, (1) they can secrete immunosuppressive and/or pro-angiogenic factors, (2) they can differentiate into periendothelial cells and (3) they are able to form heterotypic cell-cell contacts with endothelial cells. Gal-1 is expressed by solid tumor cells and/or stromal cells. Gal-1 secreted by the cancer cells is thought to have mainly immunosuppressive effect in tumor progression but the function of MSC derived Gal-1 has not yet been characterized. Therefore our research has focused on the analysis whether Gal-1 secreted by MSCs participates in establishment of the tumor immunoprivilege and/ or tumor vascularization.

We used an *in vitro* pre-vascular co-culture system to study the role of MSC-derived Gal-1 in angiogenesis. This system is presumed to model a late step of angiogenesis when periendothelial cells, which can originate from MSCs and endothelial cells get in an intimate contact and generate pre-vascular network. Wild type MSC^{wt} and Gal-1 deficient MSC^{Gal-1^{-/-}} isolated from bone marrow of wild type and Gal-1 knockout mice, respectively. Were co-cultured with H5V mouse heart capillary endothelial cells and the evolved pre-vascular network was evaluated. The extent of the pre-vascular structures greatly depended on the expression of Gal-1 by MSCs since Gal-1 deficient MSCs supported significantly less the formation of the pre-vascular structures than their wild type counterparts. Confocal microscopy analysis showed that the structures consisted of both cell types, and direct contact between endothelial and mesenchymal stem cells was essential to the development of network. The role of

secreted Gal-1 was also verified by cultivation of MSC^{vt}/H5V co-culture in the presence of TDG (the analogue of lactose, the minimal ligand of Gal-1). The length of structures were notably decreased during TDG treatment compared to that of an indifferent disaccharide, saccharose. The two cell types affected each other's proliferation. H5V cells could enhance MSCs' growth independently on Gal-1 expression. Contrarily, MSC^{vt} did not have any effect on H5V's proliferation, but MSC^{Gal-1^{-/-}} significantly and dose dependently blocked it. The different effect of MSC^{vt} and MSC^{Gal-1^{-/-}} to endothelial cell proliferation may derive from the function of Gal-1: Gal-1 can support the formation of pre-vascular structures via its pro-angiogenic function without affecting endothelial cell proliferation but supporting survival of endothelial cells. To prove these findings in *in vivo* conditions, MSCs were injected with mammary tumor cells subcutaneously or into tumor bearing mice intravenously. MSC^{vt} supported tumor growth in both tumor models, while MSC^{Gal-1^{-/-}} failed to enhance the enlargement of mammary carcinoma. Histologic examination of the tumor tissues revealed that the microvessel density of control and the MSC^{Gal-1^{-/-}} treated tumors were similar but it increased significantly in the presence of MSC^{vt}. Since immunosuppression can be another mechanism via tumor progression can be supported therefore impact of MSC derived Gal-1 was also analysed in immunodeficient X-SCID mice. We found that immunocompetent and immunodeficient mice served similar results when wild type and Gal-1 knockout MSCs were co-injected with tumor cells. These data indicated that Gal-1 expressed by MSCs did not control tumor growth via immunoregulation rather it participated in the tumor vascularization.

Our results draw attention that knocking down Gal-1 expression in MSCs can enhance the safety of a potential MSC-based cellular tumor therapy.

XII. Köszönetnyilvánítás

Szeretném kifejezni hálámat témavezetőmnek, Prof. Dr. Monostori Évának, hogy elmélyítette a szakma iránti érdeklődésemet, valamint a gondos témavezetéséért és hasznos tanácsaiért, melyekkel segítette e munka elkészítését. Köszönöm végtelen türelmét és a sok bátorítását.

Köszönöm a Limfocita Szi gnál Transzdukció Laboratórium valamennyi tagjának a munkám során nyújtott segítséget: Dr. Fajka-Boja Robertának a mindennapi segítőkész hozzáállását, gyakorlatias tanácsait és a dolgozatom alapos átolvasását, Dr. Szebeni Gábor Jánosnak az *in vivo* végzett munkák betanítását, Dr. Czibula Ágnesnek és Szabó Enikőnek az MSC-k differenciáltatását, Makra Ildikónak a rugalmasságát, Hornung Ákosnak a statisztikai számításokhoz adott tanácsait, és Gercsó Andrásnének a kiváló munkavégzését. Hálás vagyok az LSTL volt tagjainak: Végh Leának, Dr Blaskó Andreának és Novák Juliannának a remek munkahelyi légkörért.

Hálás köszönettel tartozom Dr. Uher Ferencnek, aki biztosította számomra a munkám során felhasznált MSC-eket sok gyakorlati tanáccsal egyetemben. Köszönet illeti Prof. Dr. Robert Kiss-t (Free University of Brussels) a kísérleteimben használt B16F10 egér melanóma és Dr. Vizler Csabát a 4T1 és H5V sejtvonalakért.

Köszönöm Dr. Mátés Lajosnak, hogy rendelkezésemre bocsátotta a Sleeping Beauty rendszert és Dr. Katona Róbertnek, hogy lehetőséget adott az X-SCID egereken elvégzett a kísérletekhez, valamint Marton Annamáriának, aki megtanított egereket intravénásan oltani. Köszönöm Kotogány Editnek az áramlási citofluorimetriában, Dr. Ferhan Ayaydinnak és Kószó Zsuzsannának a konfokális és fluoreszcens mikroszkópiában nyújtott segítségét, Veres Erikának, valamint az SZBK Állatház munkatársainak a mindennapi remek együttműködő légkörért.

Hálásan köszönöm a lehetőséget Prof. Dr. Fekete Évának és Dr. Bódi Nikolettnek, hogy az SZTE Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszékén végezhattük a paraffinba ágyazott minták előkészítését, és metszését.

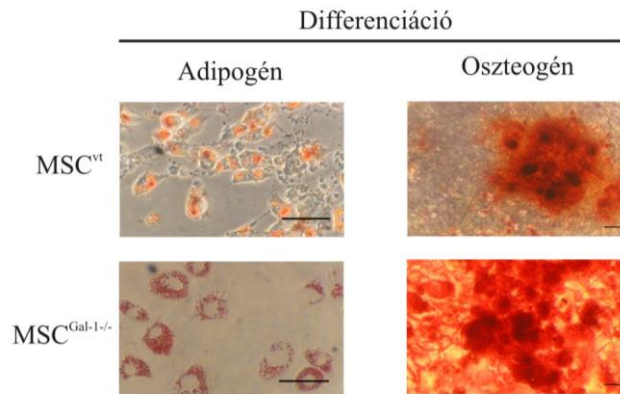
Végezetül hálás vagyok az Úr Jézus Krisztusnak, hogy képességet és lehetőséget adott arra, hogy elvégezzem az egyetemet, és azért, hogy a kutatásban maradhattam.

Nagyon köszönöm Anyukámnak, hogy lehetővé tette, hogy Szegedre jöhessek biológiát tanulni, köszönöm belém vetett töretlen hitét és a türelmet, amit az elmúlt időszakban tanúsított; hálás vagyok Tesómért, akivel a dolgozatírással kapcsolatban hasonló kihívásokkal nézhettem szembe, és felváltva bátoríthattuk egymást. Sokat köszönhetek elsősorban Sipos Márknak, Kiss Brigittának, dr. Kada Szilviának és Janovics Zsuzsannának, hogy remek barátokként végig mellettem voltak és mindenben támogattak a doktori tanulmányaim során.

A munkához nyújtott pályázati támogatások: NKTH-OTKA CK 78188, OTKA PD 75938, TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0035

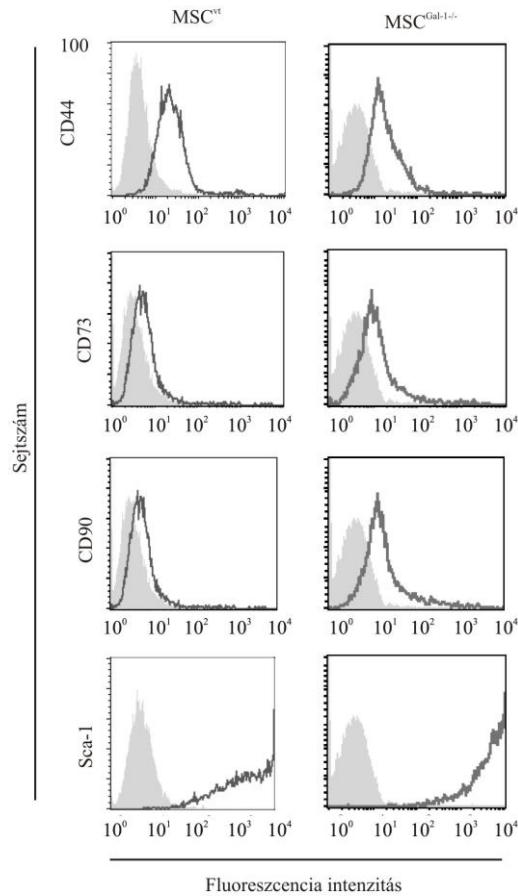
XIII. Függelék

A vad típusú és Gal-1 hiányos MSC egyaránt differenciálható adipocita és oszteocita irányba



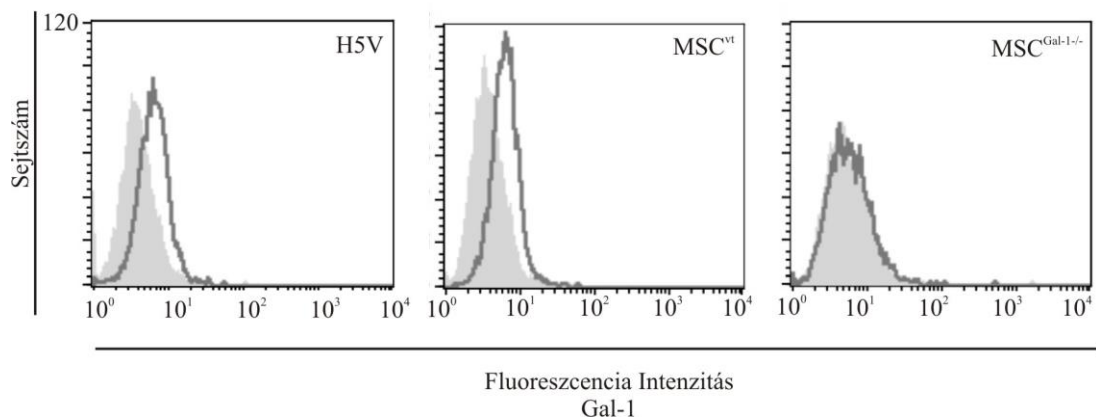
XII. 1. ábra. MSC-k zsírsejt és csontsejt irányú differenciáltatása. Vad típusú és Gal-1 knockout MSC-t adipogén (bal oldali panel) és oszteogén (jobb oldali panel) médiumban növesztettük. Az adipogén differenciálást dexametazonnal és 3-izobutil-1-metilxantinnal (IBMX) (Sigma-Aldrich) kiegészített médiumban végeztük két hétig (tápoldat összetétele: DMEM/F12, 10% FCS, 10⁻⁷ M dexametazon, 0,5 mM IBMX, 100 IU penicillin és 50 µg/ml streptomycin). A sejtekben képződő zsírcseppeket Oil Red O (Sigma-Aldrich) festéssel mutattuk ki a háttérfestést Giemsa (Fluka Chemicals) festéssel végeztük. Az oszteogén differenciáláshoz hidrokortizonnal, β-glicerofoszfáttal és aszkorbinsavval (valamennyi a Sigma-Aldrichtól) kiegészített tápoldatban növesztettük a sejteket két hétig (a tápoldat összetétele: DMEM, 10% FCS, 10mM β-glicerofoszfát, 50 µg/ml aszkorbinsav, 10⁻⁸ M hidrokortizon, 2mM L-glutamin, 100 IU penicillin és 50µg/ml sztreptomycin). A csont irányú differenciálódást jelző extracelluláris kalcium lerakódást Alizarin Red S festéssel tettük láthatóvá. A mintákat Olympus CKX41 inverz fénymikroszkóppal vizsgáltuk és Olympus Camedia C-5060 kamerával fényképeztük. Mércse: 50 µm.

A vad típusú és Gal-1 hiányos MSC-k egyaránt hordozzák az MSC kritériumnak megfelelő markereket



XII. 2 ábra. Az MSC-k pozitívak a CD44, CD73, CD90 és Sca-1 sejtfelszíni markerekre. Vad típusú és Gal-1 knockout MSC-eket jelöltünk anti-CD44, CD73, CD90 és anti-Sca-1 phycoerithrinnel (PE) konjugált monoklonális ellenanyagokkal és áramlási citofluorimetriával analizáltuk. Hematopoetikus markereket, azaz CD3, CD11b, CD34, CD45R, Ly6G, TER119 az MSC-k nem hordoztak (nem bemutatott adatok).

Az MSC^{vt} és a H5V endotél sejtek felszínéről kimutatható a Gal-1 jelenléte, míg a MSC^{Gal-1^{-/-}} esetén nem detektálható



XII. 3. ábra. Sejtfelszíni Gal-1 kimutatása H5V és MSC-ken. A sejtfelszíni Gal-1 kimutatásához 3×10^5 sejtet fixáltunk, majd a mintákhoz Gal-1-et felismerő kecske anti-egér IgG ellenanyagot (R&D Systems) adtunk ($50 \mu\text{l}$ $15 \mu\text{g/ml}$ ellenanyag, jégen 45 perc). Másodlagos ellenanyagként NL493 kapcsolt anti-kecske IgG ellenanyagot (R&D Systems) alkalmaztunk (1:200 hígításban jégen 30 perc) és áramlási citométerrel detektáltuk a fluoreszcens jelet.

Tripánkék oldat (sejtszámoláshoz)

0,16% (w/v) tripánkék (Reanal)

0.9% NaCl (Merck) desztillált vízben

Foszfáttal pufferelt fiziológiás sóoldat (PBS pH 7,4)

1,8 mM NaH₂PO₄ (Reanal)

10 mM Na₂HPO₄ (Reanal)

135 mM NaCl (Merck)

3 mM KCl (Reanal)

Immunfluoreszcencia puffer (IFB)

PBS

1% (v/v) FCS (Invitrogen)

0,1% Na-azid (Sigma-Aldrich)

Fixáló puffer

PBS

4% paraformaldehid (Sigma-Aldrich)

A paraformaldehydet 50-70°C-on oldjuk 1 órán keresztül, majd szobahőmérsékletre hűtve 7,2-re állítjuk a pH-t. Legfeljebb 1 hónapig 4°C-on, sötétben tároljuk.

Propídium jodid

1mg/ml propídium jodid (Sigma-Aldrich)

PBS-ben

Permeabilizáló puffer

PBS

0,1% Triton X