

dc_1060_15

MTA Doktora Pályázat

**Connexinek és sejtkommunikációs csatornáik
tanulmányozása csontvelőben, nyirokszervekben,
szövetregenerációban és daganatokban**

Krenács Tibor

Budapest, 2015.

Tartalomjegyzék

1. Connexinek és sejtmembrán csatornáik felépítése, szabályozása és szerepe	4
1.1. Connexinek és „gap junction” csatornáik molekuláris szerkezete	4
1.2. A connexin csatornák szelektív áteresztőképessége	7
1.3. A connexin csatornafunkciók szabályozása	7
1.4. A connexin transzkripció és transláció genetikai és epigenetikai szabályozása	8
1.5. Connexinek életciklusa: összeszerelődés, szállítás, lebomlás és újrahasznosítás	9
1.6. A connexinek poszt-transzlációs módosítása	10
1.7. Connexon félcsatornák és csatornafüggetlen interakciók	10
1.8. A connexin direkt sejt-sejt kommunikáció fiziológiai és patológiai szerepe	11
1.9. Connexin csatornák regenerációs folyamatokban	12
1.10. Connexin csatornák daganatokban	13
2. Célkitűzések	14
3. Módszerek	15
4. Connexin expresszió és direkt sejt-sejt kommunikáció normál, regenerálódó és leukémiás csontvelőben	20
4.1. Bevezetés	20
4.2. Anyag és Módszer	21
4.3. Eredmények	23
4.4. Megbeszélés	26
4.5. Összefoglalás – Az eredmények újdonságtartalma	31
5. Connexin expresszió és direkt sejt-sejt kommunikáció a másodlagos nyirokszervekben különös tekintettel a nyiroktüszőkre	32
5.1. Bevezetés	32
5.2. Anyag és Módszer	33
5.3. Eredmények	36
5.4. Megbeszélés	45
5.5. Összefoglalás – Az eredmények újdonságtartalma	49
6. Connexin expresszió excimer lézer-ablációt követő cornea regeneráció során	50
6.1. Bevezetés	50
6.2. Anyag és Módszer	51
6.3. Eredmények	52
6.4. Megbeszélés	56
6.5. Összefoglalás – Az eredmények újdonságtartalma	59

7. Connexin csatornák szerepe harántcsíkolt izomdifferenciálódás és regeneráció során	60
7.1. Bevezetés	60
7.2. Anyag és Módszer	61
7.3. Eredmények	63
7.4. Megbeszélés	74
7.5. Összefoglalás – Az eredmények újdonságtartalma	78
8. Connexin 43 expresszió és csatornafunkciók óriássejtes csonttumorban	79
8.1. Bevezetés	79
8.2. Anyag és Módszer	80
8.3. Eredmények	84
8.4. Megbeszélés	88
8.5. Összefoglalás – Az eredmények újdonságtartalma	93
9. Connexin expresszió normál emlőszövetben és emlőcarcinomákban	94
9.1. Bevezetés	94
9.2. Anyag és Módszer	95
9.3. Eredmények	99
9.4. Megbeszélés	109
9.5. Összefoglalás – Az eredmények újdonságtartalma	113
10. A tézisek rövid összefoglalása, az eredeti megfigyelések hasznosítása	115
11. Irodalomjegyzék	116
12. Köszönetnyilvánítás	145
13. Az értekezés alapját képező közlemények	146
14. További fontosabb saját közlemények	149
15. Tudománymetriai adatok – az MTMT szerint jóváhagyva	155

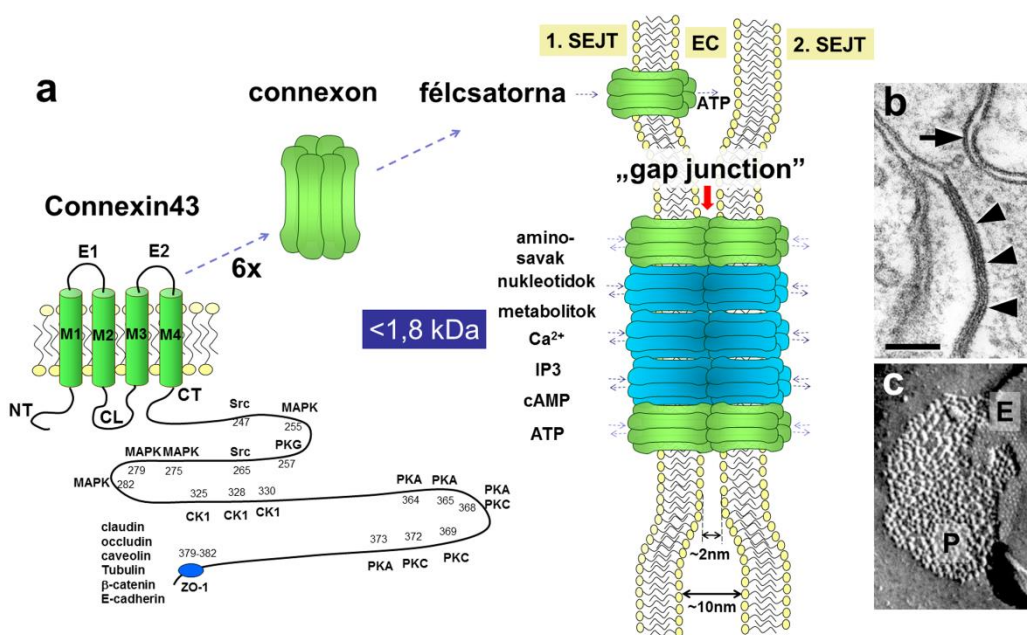
1. Connexinek és sejtmembrán csatornáik felépítése, szabályozása és szerepe

A többsejtű lét alapfeltétele a sejtek közötti kommunikáció a sejtfunkciók összehangolása és a homeosztázis fenntartása érdekében. A receptor-ligand kapcsolatokon alapuló interakciók az extracelluláris tér közbeiktatásával, szolubilis növekedési faktorok, extracelluláris matrix komponensek és sejthez kötött ligandok, valamint receptoraik egymásra hatásával indukálnak intracelluláris adaptációs válaszokat. Ezzel szemben a metabolikus sejt-sejt kommunikáció ún. „gap junction” („rés-kapcsolat”) membrán csatornákon keresztül az extracelluláris tér kizárásával hoz létre közvetlen citoplazma-citoplazma kapcsolatot ionok és <1,8 kDa méretű metabolitok (ATP, NAD⁺, nukleotidok, aminosavak), morfogének, linearizált oligopeptidek, másodlagos hírvivők (cAMP, IP3, Ca²⁺) diffúziójához szomszédos sejtek között (1). Gerincesekben a direkt csatornákat connexinek, gerinctelenekben innexinek képezik, melyek hasonló szerkezetűek, de szekvencia homológiát nem mutatnak (2). Az innexinokkal homológiát mutató sejtmembrán csatornák gerincesekben a pannexinek (3), melyek azonban nem formálnak sejt-sejt kapcsolatokat (4). Mára a connexin csatornák szerepét a morfogenezistől, a sejt differenciáció, proliferáció és apoptózis szabályozásában, akciós potenciálok közvetítésében, a kompartmentális szövetfunkciók összehangolásában, valamint regenerációs és patológiai folyamatok széles körében igazolták (5). A connexinek és csatornáik alapvető élettani jelentőségét jelzi, hogy A) az egyedfejlődés során már a 4-sejtes szedercsírában megjelennek; B) az érett spermium és harántcsíkolt izomrostok kivételével minden magvas sejtben nagy számban képződnek; C) az izotípusoknak általában egy-egy kódoló exonból álló egyszerű génszerkezetük van; és D) gerincesekben nagyfokú evolúciós konzerváltságot mutatnak (6, 7).

Az általános bevezetőben a csatornák legalapvetőbb tulajdonságait mutatom be, jellemző példákkal megvilágítva a rendszer komplexitását, ami segíthet a későbbi fejezetekben tárgyalt saját kutatások eredményeinek szélesebb körű értelmezésében.

1.1. Connexinek és „gap junction” csatornáik molekuláris szerkezete

A connexinek tetraspan sejtmembrán molekulák, emberben 21, egérben 20 izotípusuk ismert (8) (**1. ábra**). Az izotípusokat molekula méret, vagy molekuláris/evolúciós rokonságuk szerint (α , β , γ , δ , vagy ϵ) nevezzük el, így a legősibb és legelterjedtebb 43 kDa-os izotípus a Cx43, ill. GJA1 ($\alpha 1$ család) azonosítót kapta. A connexin-kódoló gének és az izotípusok előfordulását az **1. táblázat** foglalja össze.



1. ábra. A connexin43 molekula, a connexon félcsatornák és a „gap junction” sejtmembrán direkt sejt-sejt kommunikációs csatornák felépítése. NT: N terminális, E1 és E2: extracelluláris, CL citoplazmatikus hurok, M1-M4: transzmembrán és CT: C-terminális domének; EC: extracelluláris tér, 1. és 2. sejt: intracelluláris tere. A connexin molekula CT régiójában számos foszforilációs hely, valamint citoszkeletális és sejtadhéziós interakciókra alkalmas régió van (a). Hat connexin molekula épít fel egy connexon félcsatornát, mely közvetlenül az extracelluláris térbe, vagy szomszédos sejtek connexonjával összeállva teljes csatornaként azok citoplazmái között közvetít <1.8 kDa méretű metabolitokat, szabályozó molekulákat és ionokat. Az újonnan képződő (zöld) csatornák a periférián csatlakoznak a membrán plakkhöz, ahol a dokkolásánál a szomszédos sejtek membrán távolsága ötödére csökken. A „gap junction” plakk (nyílhegyek) elektronmikroszkópos képe (b), a normál membrán távolságot nyíl jelzi. A csatornák rendezett aggregátumai (c) a fagyasztva töréses elektronmikroszkópiával szétválasztott sejtmembránban. P: a citoplazma felőli, E: az extracelluláris tér felőli felszín. Méretvonal a (b) ábrán, b:120 nm, c: 80 nm.

A connexin fehérje citoplazmatikus N-terminális és C-terminális doménjeit négy transzmembrán (TM) szakasz kapcsolja össze, két extracelluláris hurokkal a TM1 és TM2 (E1), illetve a TM3 és TM4 domének között (E2), valamint egy intracelluláris hurokkal (CL) a TM2 és TM3 között (9). A molekula legvariábilisabb C terminális régiója a poszt-transzlációs szabályozás legfontosabb támadáspontja. Hat connexin molekula oligomerizálódik egy félcsatornává (connexon) és két szomszédos sejt connexonja áll össze teljes „gap junction” csatornává. A sejtmembránban sok száz csatorna formáz rendezett aggregátumokat, melyek a fiziológiás direkt sejt-sejt kommunikációt közvetítik. Mindez erőteljes adhéziót is feltételez, hiszen a szomszédos sejtek külső membrán távolsága ~10 nm-ről az ötödére csökken. A „gap junction” („réskapcsolat”) elnevezés is innen ered, a „tight junction”-októl való megkülönböztetésre és nem a csatornák lumenére utal (10). A connexin izotípusok nem csak azonos, hanem többnyire a saját családon belül más izotípusokkal is képezhetnek félcsatornát (heteromer), illetve teljes (heterotípusos) „gap junction” csatornát (11). Így például az α

alcsoporthoz tartozó Cx37 vegyes csatornákat képezhet az ugyancsak α Cx40-el (12) és Cx43-al, de a β csoportos Cx26-al, ill., Cx32-vel nem (12, 13).

1. táblázat. A humán connexin géncsalád és izotípusainak jellemző szöveti expressziója
(Sohl és Willecke, 2004; valamint Bendner és mtsai, 2012; munkái alapján)

Gén szimbólum	Név (molekula tömeg)	Gén lokalizáció	Gyakori előfordulás
GJA1 (α család)	Cx43	6q22.31	myocardium, osteoblast, cholangiocyta
GJA3	Cx46	13q12.11	szemlencse (rost sejtek)
GJA4	Cx37	1p35.1	endothel, petesejt, granulosa sejt
GJA5	Cx40	1q21.2	pitvari myocardium, endothel
GJA8	Cx50	1q21.1	szemlencse (epitheliális és rost sejtek)
GJA9	Cx59	1p34	
GJA10	Cx62	6q15	retina és központi idegrendszeri idegsejtek
GJB1 (β család)	Cx32	Xq13.1	Schwann sejt, hepatocyta, vese hám
GJB2	Cx26	13q11-q12	hepatocyta, epidermis, vese hám, cochlea
GJB3	Cx31	1p34	epidermis, placenta
GJB4	Cx30.3	1p35-p34	epidermis, vesehám
GJB5	Cx31.1	1p34.3	here, epidermis
GJB6	Cx30	13q12	epidermis
GJB7	Cx25	6q15	
GJC1 (γ család)	Cx45	17q21.31	idegsejt, szív ingerképző nodulusai
GJC2	Cx47	1q41-q42	oligodendrocyta
GJC3	Cx30.2/Cx31.3 (mCx29)*	7q22.1	Leydig sejtek, szív ingervezető sejtek
GJD2 (δ család)	Cx36	15q13.1	retina és központi idegrendszeri idegsejtek
GJD3	Cx31.9 (mCx30.2)*	17q21.1	pancreas
GJD4	Cx40.1 (mCx39)*	10p11.22	harántcsíkt izom
GJE1 (ϵ izotípus)	Cx23	6q24.1	

*: egér connexinek, ahol eltérnek a humántól

Minden sejtípusra jellemző két vagy több connexin izotípus expressziója, ahol arányuktól függ a potenciális homo- ill. heteromer oligomerizáció mértéke. A szívpitvari myocarciomban a Cx40 és Cx43 együttesen fejeződik ki és formál heteromer csatornákat is (14), ami a CT régiók interakciói révén fokozza a csatornák pH érzékenységét (15, 16).

Bár *in vivo* még kevés vegyes csatorna létezését bizonyították (17), a 21 izotípus eltérő ionszelektivitású és permeabilitású homogén csatornái mellett az izotípusok kombinációi a sejtfunciók finomhangolásának széleskörű lehetőségeit kínálják.

1.2. A connexin csatornák szelektív áteresztőképessége

A csatornák működése szelektív feszültség és kémiai szabályozás alatt áll (18). A legtöbb tanulmányozott homomer Cx26, Cx32, és Cx43, valamint heteromer Cx26/Cx30, ill. Cx26/Cx32 csatorna áteresztő olyan másodlagos hírvivőkre és metabolitokra mint a Ca^{2+} ionok, adenosin trifoszfát (ATP), adenosin difoszfát (ADP), ciklikus adenosin monofoszfát (cAMP), inozitol trifoszfát (IP3), glutamát és glutation, de eltérő mértékben. Például a Cx43 csatornák ATP áteresztőképessége 100-300-szor meghaladja a Cx32 izotípusét, de glutamatra, glutationra, vagy ADP-re annak „csak” 10-20 szorosa, míg a Cx32 adenosin szelektivitása 10x nagyobb a Cx43 csatornákénál (19). A csatornák ionszelektivitása is eltérő, pl. a Cx26 csatornák alacsonyabb Ca^{2+} koncentrációnál zárnak, mint a Cx43 csatornák (0.5, ill. 1.8 mmol/l) (20), a Cx32 csatornák mérsékelt anion preferenciát, míg a Cx40, ill. Cx43 erős kation preferenciáját mutatnak (21-23).

A csatornaszelektivitás fiziológiai jelentőségét a connexin izotípus cserével járó egér kísérletek is alátámasztják. A Cx43 izotípus cseréje Cx26-ra, vagy Cx31-re anatómiai és funkcionális defektusokkal járt (előbbi a reprodukív funkciók és a szívkamrai ingervezetés zavarához, utóbbi a jobbkamrai kiáramlást gátló malformációhoz vezetett) (24, 25), míg a Cx32 cseréje Cx40-re nem járt jelentős élettani változással (26). A cserék következménye azonban szövetfüggő. Az idegi Cx45 cseréje Cx36-ra nem befolyásolta a retina neuronok ingervezetését, azonban ha szívben vagy embrionális őssejtekben történt, akkor cardiális hypertrophia, vezetési rendellenességek, ill. embrionális halál következett be, hiszen a Cx45 az ingerképző rendszer kizárólagos izotípusa (27).

1.3. A connexin csatornafunkciók szabályozása

A csatornafunkciókat a csatornák száma, a nyitott állapotuk valószínűsége, valamint izotípus összetételtől függő metabolit permeabilitása és ion szelektivitása („permselectivity”) határozza meg (28). A csatornák aktivitása (nyitás-zárás dinamikája) feszültség, pH, foszforiláció és fehérje interakciók által szigorúan szabályozott. A leginkább tanulmányozott Cx43 csatornák neutrális pH-n (pH 7,2) nyitottak (29). Csökkenő intracelluláris pH zárja a Cx26, Cx32, Cx43 és Cx46 (1) csatornákat, csakúgy, mint az emelkedő intracelluláris Ca^{2+} ion szint (30). Utóbbi mechanizmus például

gátolja, hogy az apoptotikus sejtek a kapcsolt sejteket is elpusztítsák. A leggyorsabb adaptációt a transzjunkcionális feszültség (V_j :a két citoplazma között), valamivel lassabbat a transzmembrán (V_m) feszültség általi szabályozás tesz lehetővé (31). Ezt követik sebességben a csatornafehérje poszt-transzlációs módosításai, például a CT régió foszforilációja, a csatornák lebomlása és újra hasznosulása, végül az új csatornák képződése (transzkripció és transzláció).

Célzott mutációs kísérletekkel kimutatták, hogy a Cx43 csatornákat a CT régió és a CL hurok interakciója, golyó és lánc modell szerint zárja (32). Cx26 esetében az N terminális és a TM1 régió egymásra hatása játszik hasonló szerepet (33). A feszültség szabályozás szempontjából az NT szakasz terminális régiója is fontos, ami Cx26, Cx30 és Cx46 estén negatív töltésű, így a csatornák pozitív intracelluláris töltésnél zárnak (31). A kémiai és a feszültség szabályozás átfed, hiszen a CT csontolt Cx43 csatornák, mind az alacsony pH-ra, mind a feszültségre érzéketlenné válnak (34).

1.4. A connexin transzkripció és transzláció genetikai és epigenetikai szabályozása

A „gap junction” aggregátumok méretét (a connexonok mennyiségét) a transzkripció és transzláció mértéke, valamint a transzport és lebomlási folyamatok (poszt-transzlációs interakciók) szabják meg (1). A connexin gének szelektív átírását az eltérő 5'UTR promoter régióikhoz kötődő általános és szövetspecifikus transzkripciós faktorok és represszorok határozzák meg (35). Például, Cx32 esetében hepatocytákban a GJB1 gén promoter régióhoz a hepatocytá nukleáris faktor-1 (36), míg Schwann sejtekben a Sox-10 transzkripciós faktor kötődik és indukál génátírást (37). Szívizomban a pitvari myocardiumban Cx40 és Cx43 együttesen fejeződik ki, míg a kamrákban csak Cx43 (38). A Cx40 kifejeződést a szívspecifikus Tbx5 (39) és GATA4 (40), illetve az általános transzkripciós faktor Sp1, vezérlik (41). Kéthetes embrió szívkamrájában a Cx40 még kimutatható, későbbi eltűnéséért a kamrákból a HRT2 transzkripciós represszor felelős, mely korlátozza a Tbx5 (42) és GATA4 képződését (40).

A connexin kifejeződést epigenetikai faktorok is befolyásolják. Hiszton acetiláció lazítja kromatin struktúrát, ami segíti a génátírást. Az acetilációt hiszton acetiltranszferázok (HAT) támogatják, hiszton deacetilázok (HDAC) pedig csökkentik. Mind a fokozott HAT aktiváció (43), mind a gátolt HDAC enzim szerepért igazolták például a Cx43 (44), és Cx32 fokozott kifejeződésében (45). A gének metilációja fontos szerepet játszik a connexinek differenciált képződésében. Cholangiocytákban, ahol Cx43 fejeződik ki a Cx32 gén promotere metilált, míg hepatocytákban ahol a Cx32 és Cx26 termelődik, ott a

Cx43 géné (46). Az mRNS stabilitását és transzlációját mikro-RNS-ek is szabályozzák a target RNS 3'-UTR régiójához kötve, ahol a Cx36, Cx43 és Cx45 géneknél számos kötőhelyet azonosítottak (47). Harántcsíkolt izom regenerációban a myoblastok fúziójakor a Cx43 gyors csökkenéséért a miR-1 és a miR-206 felülregulációja felelős (48, 49). Osteoblastokban viszont, ahol az osteocyta éréshez szükség van Cx43 csatornákra, a miR-206 kórosan csökkenti a Cx43 szintet és gátolja a csontdifferenciálódást (50).

1.5. Connexinek életciklusa: összeszerelődés, szállítás, lebomlás és újrahasznosítás

A connexinek gyorsan és dinamikusán keletkeznek, fél-életidejük, rövid, a Cx43 esetében csak ~1,5 óra, ami gyors adaptációs válaszokat tesz lehetővé (51). Az endoplazmás retikulumban (ER) veszik fel érett konformációjukat, innen COPII fedett transzport vezikulákkal kerülnek a Golgi rendszerbe, ahol connexon félcsatornákká oligomerizálódnak (52). Egyesek szerint a Cx26 kikerüli a Golgi-komplexet, a Cx46 pedig a monomerként van jelen ott is (53, 54). Magas a Cx26, Cx32, vagy Cx43 expressziónál jelentős mennyiségű oligomer képződhet az ER-ben is (55). A connexin sejtmembránba szállítása szekretoros vezikulákban az Arf1 GTPáz támogatásával a mikrotubulusok mentén történik, így intakt citoszkeletont igényel (56). Az új connexonok a sejtmembrán „gap junction” plakkok perifériájára épülnek be (57). A beépült Cx43 csatornák enyhe detergens rezisztenciája és P2 foszforilációs állapota kommunikáció képességük jellemzője (58, 59).

A „gap junction” plakkok internalizációjakor, clatrin-függő endocitózissal dupla sejtmembránba csomagolt, teljes csatornákat magukban foglaló vezikulák ún. connexosomák fűződnek le (60). Növekedési faktorok, így az epidermális növekedési faktor (EGF) (61), a tumor promotor forbol észter (TPA) (62), a carcinogén DDT (diklór-difenil-triklóretán) fokozzák a Cx43 csatornák internalizációját és degradációját, ubiquitináció és endocitózis indukálásával (63). Ezek a megfigyelések is támogatják a connexin csatorna dereguláció feltételezett szerepét a daganatképződésben. A connexinek lizoszomális degradációja monoubiquitinálás, míg proteaszomális degradációja poliubiquitinálás után történik (64). A connexinek egy része újrahasznosul, vagyis az internalizált csatornák rab4 és rab11 közvetítéssel visszajuthatnak a plazmamembránba (65). Ez a mechanizmus a ciklusban levő proliferáló sejtekben alapvetően fontos a mitózis telofázisában a kommunikáció azonnali helyreállításához (66).

1.6. A connexinek poszt-transzlációs módosítása

A connexinek foszforilációja, ubiquitinációja, acetilációja, metilációja, oxidációja, deaminációja és glutamát karboxilációja befolyásolja mind a csatornafunkciókat, mind a connexinek életciklusát, az összeszerelődéstől a szállításon, membrán stabilizáción át a degradációig (67, 68). Leggyakoribb a connexinek foszforilációja CT doménen, kivéve a Cx26-ot, ahol ez a szakasz nagyon rövid. A Cx43 esetében általában egy nem foszforilált (P0) és két lassabban vándorló (P1 és P2) foszforilált forma mutatható ki (69).

A Cx43 CT régió 21 foszforilációs hely van (**1. ábra**), ezek elsősorban szerin célpontok, de a tirozin Tyr247 és Tyr265, valamint a treonin foszforiláció szerepét is leírták (70, 71). Myocardiumban a Cx43 CT régió disztális szakaszának TPA indukálta Ser368 foszforilációja protein kináz C (PKC) által csökkenti a Cx43 csatornák áteresztőképességét (72), míg ischemia defoszforilációt és a csatornák internalizációját kiváltva mérsékli a közvetlen ingerület átvitelt (73). A Cx40 defoszforilációja a mikrovaszkuláris endothel sejtek szétkapcsolásának fontos mechanizmusa szepszis során, ami protein kináz A (PKA) aktiválással gátolható (74).

A szemlencsében előforduló Cx46 CT régiójában 11 funkcionálisan fontos foszforilációs helyet, az NT, CT és CL régiókban pedig 5 hasítási helyet azonosítottak (75). A Cx26 és Cx32 csatornák funkcionális szabályozásában a foszforiláción kívül karboxilációs és hidroxilációs módosítások is részt vesznek (76).

1.7. Connexon félcsatornák és csatornafüggetlen interakciók

A connexon félcsatornák („hemichannel”) parakrin szignálokat (cAMP, ATP, Ca^{2+}) is közvetíthetnek az extracelluláris térbe teljes csatornák nélkül (77) és a connexin fehérje specifikus interakciókban is részt vesz más fehérjékkel (78). Tehát funkcionáló connexin molekulák a sejtek citoplazmájában és szabadon álló sejtek membránjában is találhatóak. A félcsatornák szerepet játszanak a sejtek közötti Ca^{2+} hullámok propagálásában, például astrocytáknál (79), osteoblastokban és osteoclastokban (80).

A biszfoszfónát (alendronát) a connexon félcsatornák nyitásával gátolja az osteoblastok és osteocyták apoptózist, de az osteoclastokét nem, ami osteolitikus óriássejtes csonttumor (GCTB), illetve daganat csontáttétek kezelésében hasznosítható (81). A hatást az extracelluláris szignál-függő kinázok ERK/MAPK (extracelluláris szignál szabályozott kináz/mitogen-aktivált protein kináz) és Src aktiválás közvetítik, míg connexon csatornagátlók felfüggesztik (82).

A connexinokkal specifikus intracitoplazmatikus interakciókat kialakító közel félszáz fehérjét „gap junction proteome”-ként említik (78). Az elsősorban CT régiót érintő kölcsönhatások csatornafüggetlen funkciókat is, pl. csatornafüggetlen proliferáció gátlás, is támogatnak (83). Az interakciókban részt vesznek protein kinázok (PKA, PKC, MAPK, Akt), citoskeletális fehérjék (actin, spectrin, b-catenin, és tubulin) sejtadhéziót közvetítő fehérjék (zonula occludens-1 és -2: ZO-1, ZO-2; claudinok és cadherinekkal) (84); intracelluláris transzport fehérjék (caveolin 1 és 2, Rab20), valamint növekedés-szabályozó és onkogén fehérjék (NOV, CIP75, CIP85, c-Src és Dlg1) (78).

1.8. A connexin direkt sejt-sejt kommunikáció fiziológiai és patológiai szerepe

A connexin csatornák elterjedtsége és a közvetített molekulák változatossága magyarázza széleskörű élettani szerepüket, amire mutációik okozta, nem-daganatos, többnyire dominánsan öröklődő kórképek és célzott génmanipulációs kísérletek is utalnak (85, 86). *Connexin génmutációhoz társuló betegségek.* A Cx43/GJA1 mutációi oculodentodigitális dysplasia (ODDD) néven ismert komplex fejlődési rendellenességet is okozzák, ami a csontfejlődés zavarával (craniofaciális malformációk, mikrooftalmia, mikrodontia) végtag deformitásokkal (syndactylia) és neurológiai diszfunkciókkal (ataxia, vizelet- és széklettartási zavarok) jár (87, 88). A Cx46/GJA3 és Cx50/GJA8 alapvető avaszkuláris szövetek, így a szemlencse tápanyagellátásában és adaptációs szignálok közvetítésében. A GJA3, illetve a GJA8 gén mutációi kongenitális, zoluláris homálllyal járó familiáris katarakta kialakulásához vezetnek (89, 90). Az X kromoszómához kötött progresszív demielinizációval járó motoros és szenzoros neuropátia, a Charcot-Marie-Tooth (CMTX) betegség hátterében a Cx32/GJB1 gén mutációi állnak, ami a Schwann-sejtek tápanyagellátását, így az ellátott perifériás idegeket károsítja (91). A Cx47/GJA12 mutációja központi idegrendszer hipomielinizációját és fehérállomány progresszív degenerációját okozza (92). A kialakult Pelizaeus-Merzbacher-szerű betegség fizikális és mentális leépüléssel jár. A connexin csatornák fontos szerepet játszanak belső fülben a cochlea K^+ ion áramlásában, így az öröklött neuroszenzoros sükettség közel 50% elsősorban a Cx26/GJB2, kisebb mértékben a Cx30/GJB6, Cx31/GJB3, Cx32/GJB1, esetleg a Cx43/GJA1 gén mutációjához köthető (93). Hasonló connexin repertoárt képeznek az epidermis keratinocytái is (Cx26/GJB2, Cx30/GJB6, Cx30.3/GJB4, Cx31/GJB3, Cx43/GJA1), melyek mutációi elégtelen barrier funkciókkal járó hiperproliferatív epidermális kórképekkel járnak, akár halláskárosodással is kombinálva (88). *A connexin csatornák ismertebb élettani funkciói.* A szív ingerképző és vezető

rendszerében és a működő myocardiumban az akciós potenciál gyors és szinkron terjedésében a Cx45, Cx43 és Cx40 csatornák szerepe („low resistance pathway”) régóta ismert (38). Az emberi Cx43 mutációk szívfejlődési rendellenességekhez (94), míg a csatornák kóros eloszlása aritmiákhoz vezetnek (95, 96).

Azonban a „gap junction” csatornák az akut sejtkárosodás metabolitjait is közvetítik, például akut ischemia és infarktus során szívizomban („spreading depression”). Ezért kísérletes modellben a kommunikációs kapcsolatok gátlásával az infarktus méretét is mérsékelni lehet (97). A káros metabolitok közvetítése az ún. „bystander” daganatpusztító kezelésre is kihasználható. Daganatokban retrovírus vektorral indukált hepes simplex timidin kináz expresszió a sejtek pusztulásához vezet nukleozid analóg ganciclovir kezelés hatására (98). Timidin kinázzal és Cx43 cDNS-sel kettősen transzfektált HELA sejteket timidin kináz negatív, de Cx43 pozitív HELA sejtekkel tenyésztve, ganciclovir kezelésre a teljes populáció elpusztul, igazolva, hogy a „bystander” sejtölést a kommunikációs csatornák képesek közvetíteni (99).

Petesejtek meiotikus profázisban tartásáért ovulávióig a granulosa sejteket összekapcsoló Cx43 és a granulosa sejtekből Cx37 csatornákon a petesejtbe átjutó cGMP felelős, ezért Cx37/GJA4 gén ablációja terméketlenséghez vezet (100, 101). Ösztrogének fokozzák, progeszteron csökkenti a Cx43 szintet és csatorna funkciókat (102, 103). A Cx43 csatornák szülés során a myometrium kontrakciókat koordinálják (104).

A connexin csatornák magasabbrendű koordinációs szerepét az érzelmi memória kialakításában bizonyították. Az idegi Cx36 izotípusú csatornák farmakológiai blokkolása szignifikánsan gátolta patkányok pavlovi-reflexen alapuló félelemtanulási memóriáját, az amygdala-hippocampus-kéreg γ -aminovajsavat felszabadító (GABAerg) interneuron hálózatán (105).

1.9. Connexin csatornák regenerációs folyamatokban

A leginkább tanulmányozott bőrsebek gyógyulását komplex és differenciált connexin kifejeződés kíséri. Az epidermisben számos connexin izotípus (Cx26, 30, 30.3, 31, 31.1, 32, 37, 40, 43 és 45) található (106), melyek fontos szerepét a normál barrier funkciók kialakításában a connexin génmutációkhoz társult öröklött bőrelváltozások is jelzik (88). Hasonlóan a psoriasisához, az érett barrier funkciókhoz elengedhetetlen Kruppel-szerű faktor (Klf) génjének ablációját erőteljes Cx26 expresszió, éretlen epidermális fenotípus és a bőrsebek elégtelen regenerációja kíséri (107). Sebgyógyulási modellekben a gyulladás jelentős Cx43 szintemelkedéssel jár a granulációs szövet gyulladásos

sejtjeiben, fibroblastokban és epidermális keratinocytákban. Ezért a Cx43 csatornák antiszenz oligonukleotiddal történő szelektív gátlásával a sebgyógyulás felgyorsítható és a hegesedés mérsékelhető (108), ami a kozmetológiai jelentőségén túl a nehezen gyógyuló diabetikus lábszárfekélyek kezelésében is komoly lehetőséget hordoz (106). Hasonló alapon, a Cx43 transzláció lokális gátlásával mérsékelhető az égési sérülések kiterjedése (109), és hatékonyabb a genrinccvelő kompressziót követő regeneráció (110).

1.10. Connexin csatornák daganatokban

Connexin mutációkat eddig malignus daganatokban nem igazoltak. A connexin expresszió és kommunikáció gyakori csökkenése, vagy elvesztése daganatokban azonban már korán felvetette szerepüket a carcinogenezisben (111). Később számos kísérletben igazolták a connexinek tumor növekedés gátló hatását (112-114). A kémiai tumor promoterek (pl. TPA, DDT) és onkogén hatás (pl. ras, raf, src) is gátolják a connexin sejt-sejt kommunikációt, míg az onoszuppresszor gének aktiválása ellenkező hatású, csakúgy, mint az ismert tumorgátló retinoid kezelése (115, 116).

Connexin deficiens transzgenikus egek fokozott daganatképződési hajlama is ezt a nézetet támogatta (117). Cx32 hiányos egerekben az indukált hepatocelluláris carcinoma (118), Cx43 hiányos egerekben pedig a tüdőcarcinoma gyakorisága emelkedett (119). A Cx csatornák tumorgátló hatása gyakran a sejtciklus szabályozás elemein keresztül érvényesül. A Cx43 génexpresszió felülregulációja osteosarcoma sejtekben differenciáltabb fenotípussal és emelkedő ciklin dependens kináz inhibitor (p27^{waf1}) szinttel járt (120), hepatocelluláris carcinomában pedig mérsékeltebb proliferációt és ciklin D1 szintet eredményezett (121). Ektópiás Cx43 expresszió a kommunikáció helyreállítása mellett szignifikánsan gátolta az invazív melanoma *in vivo* növekedését (122). A hasonló hisztogenezisű, de elétő fenotípusú daganatok connexin szintje eltérő lehet, így az epidermis bazális sejtes carcinomájában szignifikánsan magasabb Cx43 szint mérhető, mint laphámrákban (123). Igazolták azt is, hogy a tumorszuppresszív szerep nem mindig köthető membrán csatornához (124). Később azonban leírták a Cx43-felülregulált glioma sejtek invazivitásának fokozódását; melanoma, emlőcarcinoma és glioma áttéti tumorinváziót kísérő diapedezise során a daganatsejtek és endothel sejtek közötti connexin kommunikációt (125, 126), valamint áttéti lokalizációban a connexinek re-expresszióját (117). Tehát a connexinek és membrán csatornáik szerepe daganatokban kontextus függő, amit befolyásol a csatornák és a daganat típusa és a daganatprogresszió mértéke.

2. Célkitűzések

Vizsgálataink kezdetén, a 1990-es évek közepén, publikált eredmények a connexin csatornákról és lehetséges szerepükről a csontvelőben és az immunrendszerben alig vagy egyáltalán nem voltak. A későbbiek során is csak részleges adatok voltak elérhetők a csatornákról regenerációs folyamatokban és daganatokban. A connexin csatornák szisztémás *in situ* tanulmányozását nehezítette gyakran szubmikroszkópos (0,5-1 μm) méretük, az elektronmikroszkópos technikák technológia igénye, mintáik vizsgálati orientációigénye és nagyon korlátozott mérete, valamint az archivált szöveteken működő specifikus antitestek hiánya. Az ultratrakturális módszerek kezdeti alkalmazása után a kis csatornaméret miatt nagyfelbontású fluoreszcens módszerek alkalmaztunk, kezdetben házilag készített később kereskedelmi antitestekkel. A konfokális lézerpásztázó mikroszkópia mellett, többsíkú és többcsatonás fluoreszcens digitális mikroszkópia és a szöveti multiblokk („tissue microarray” – TMA) módszer kombinálásával nagyszámú minta permanens jeleit tudtuk a teljes metszet vastagságában, nagy optikai felbontás mellett, akár automatizált képanalízissel is tanulmányozni. Vizsgált rendszereinkben állatkísérletekkel, sejt és génmanipulációs tesztekkel, a csatornák metabolit permeabilitását jelző festék-transzfer kísérletekkel, valamint klinikai végpont-analízis korrelációk kutatásával, törekedtünk a struktúra és a funkció kapcsolatának megismerésére is.

A disszertáció célkitűzései az alábbiak:

A connexinek és „gap junction” csatornáik előfordulásának és szerepének vizsgálata:

1. Csontvelőben, a vérképzésben és leukémiákban;
2. Másodlagos immunszervekben különös tekintettel a csíracentrumra;
3. Lézer ablációt követő cornea regeneráció során;
4. Harántcsíkolt izomdifferenciálódás és regeneráció során;
5. Az óriássejtes csonttumor progressziójában; valamint
6. Normál emlőszövetben és emlőcarcinomák progressziójában.

3. Módszerek

A több fejezetben ismétlődő módszereket ebben az általános módszertani részben mutatom be, további specifikus részletek az adott fejezetben találhatók.

Reagensek

Az alkalmazott antitestek specifikációját (specifitás, klón, származás, hígítás) a **2. és 3. táblázat** foglalja össze. Az egyéb reagenseknél, ahol a disszertációban más jelzés nem szerepel ott minden reagens a Sigma-Aldrich cégtől származott (St. Louis, MO, USA).

Immunhisztokémia

Az immunhisztokémiai reakciók az alábbiak szerint zajlottak. A 10%-os formalinban rögzített, majd paraffinba ágyazott szövetekből, adhézios táglyelemekre (1%-os 3-aminopropil-trietoxiszilánnal bevont, vagy SuperFrost Ultra Plus, Thermo-Fischer, Waltham, MA, USA) felvett, 3-5 μm vastag metszeteket xilolban, majd leszálló alkoholsorban deparaffináltuk. Az antigének feltárását 0.1 M-os pH 6.0-os citromsav/Na-citrát pufferben; 0,01 M Tris és 0.001 M EDTA pH 9.0-es elegyében, vagy pH 6.1-es kereskedelmi antigénfeltáró pufferben (TRS, Dako, Glostrup, Dánia) végeztük (127). A metszeteket metanolban hígított 1%-os hidrogénperoxiddal, majd 1% marha szérum albumint (BSA), 0.1 % Na-azidot és 0.05% Tween-20 detergenst tartalmazó TBS-ben (TBST) 15 percig előkezeltük. A **2. táblázat** a disszertációban alkalmazott connexin izotípus-specifikus antitestek, a **3. táblázat** a felhasznált egyéb antitestek specifikációját és alkalmazási körülményeit foglalja össze. A feltüntetett antitesthígítások éjszakán át (~16 h) szobahőn történő inkubálási lépésekre értendők. Módszertani negatív kontrollként a primer antitest helyett 1% kecskeszérumot és vagy BSA-t tartalmazó TBST pufferrel inkubáltuk. A primer antitestek kimutatásához Envision plus (Dako, Glostrup, Dánia), vagy Novolink (Leica-NovoCastr, Newcaste, UK) polimer peroxidáz konjugátumot használtunk kit formájában 40 perces kezeléssel. Utóbbinál az ún. poszt-primer reagenssel a peroxidáz konjugátum alkalmazása előtt 30 percig inkubáltunk. Az immunperoxidáz reakciók előhívását 3,3' diaminobenzidin-tetrahidroklorid (DAB, barna), vagy 3-amino-9-etilkarbazol (AEC, piros) kromogén és 0,1% hidrogénperoxid (szubsztrát) elegyét tartalmazó kit-tel végeztük mikroszkópos ellenőrzés mellett. A jobb morfológiai értékeléséhez a sejtmagokat hematoxilinnal felülfestettük.

Immunfluoreszcens szimpla és kettős jelölés. Formalinban rögzített és paraffinba, vagy műgyantába ágyazott szöveti metszeteken a deparaffinálás, antigénfeltárás, nem-specifikus fehérje kötőhelyek gátlása és a primer antitestekkel történő inkubálási lépések megegyeznek az immunperoxidáz reakcióknál leírtakkal. Félvékony metszetekből az epoxi gyantát nátrium hidroxiddal telített etanolba 8-12 percig mártva, majd metanol/xilol 1:1 arányú elegyében, ezután metanollal mosva távolítottuk el. A mikrosz-

2. táblázat. Az értekezésben alkalmazott connexin izotípus-specifikus antitestek

Connexin	Epitóp szekvencia	Hígítás	Állatfaj	Specifikáció/klón	Forrás/Referencia
Cx26 (GJB2)	-aa 101-119 patkány Cx26	1:200	egér	monoklonális CX-12H10	Zhang és Nicholson,1989(128) Invitrogen-Life Tech.
	-aa 106-119, patkány Cx26	1:300	nyúl	poliklonális Des3	Becker és mtsai, 1995(129)
	-egér Cx26	1:4000	nyúl	poliklonális	Evans és mtsai, 1999(130)
	-egér/patkány Cx26	1:500	egér	monoklonális CX-1E8	AB8143, Millipore Invitrogen-Life Tech.
Cx30 (GJB6)	-i.c., C-terminális humán Cx30	1:75	nyúl	poliklonális	HPA014846, Sigma- Aldrich
Cx32 (GJB1)	-i.c., C-terminális patkány Cx32	1:200	egér	monoklonális CX-2C2	Milks és mtsai, 1988(131) Invitrogen-Life Tech.
	-aa 108-119, patkány Cx32	1:300	nyúl	poliklonális Des5	Boitano és mtsai, 1998(132)
	-aa 264-283, i.c. C-terminális, patkány Cx32	1:300	nyúl	poliklonális Gap9	Evans és mtsai, 1999(130)
	-humán Cx32	1:30	nyúl	poliklonális	HPA010663, Sigma- Aldrich
Cx37 (GJA4)	-aa 266-281, i.c. C-terminális, patkány Cx37	1:300	nyúl	poliklonális Y16Y/R4	Yeh és mtsai, 1998(133)
Cx40 (GJA5)	-aa 254-268, i.c. C-terminális, patkány Cx40	1:200	nyúl	poliklonális	Goudie és mtsai, 1993(134)
Cx43 (GJA1)	-i.c., C-terminális patkány Cx43	1:200	egér	monoklonális CX-1B1	Krenacs és mtsai,1998(135) Invitrogen-Life Tech.
	-aa 131-142, i.c. C- terminális patkány Cx43	1:200	egér	monoklonális Gap 1A	Becker és mtsai, 1995(129)
	-i.c., C-terminális humán Cx43 (Ser369,-372,-373)	1:200	nyúl	poliklonális Gap15, ill. HJ	#3512, Cell Signaling, Danvers, MA
	-i.c., C-terminális	1:100	nyúl	poliklonális	71-0700, Invitrogen-Life Tech. (Zymed)
Cx45 (GJA7)	-aa 354-367, i.c. C-terminális, patkány Cx45	1:500	tengeri- malac	poliklonális	Coppen és mtsai, 2001(136)
Cx46 (GJA3)	-humán Cx46	1:100	nyúl	poliklonális	SAB13005557, Sigma- Aldrich

3. táblázat. Az értekezésben immunhiszto-/citokémiára alkalmazott egyéb specifikus antitestek

Antigén	Forrás (állatfaj)	Klón/ Azonosító	Származás/Forgalmazó	Hígítás
Actin (izom)	egér	HHF35	Dako, Glostrup, Dánia	1:50
Actin (α -simaizom)	egér	1A4	Dako (előhígított, RTU)	1:2
Actin (β)	nyúl	#4970	Cell Signaling	1:2000
Catepsin C	nyúl	A0561	Dako	1:500
CD3	nyúl	A0452	Dako	1:100
CD4	egér	4B12	Dako	1:20
CD10	egér	56C6	Dako	1:20
CD15	egér	C3D-1	Dako	1:40
CD19	egér	HD37	Dako	1:50
CD20	egér	L-26	Dako	1:100
CD21	egér	1F8	Dako	1:20
CD23	egér	1B12	Dako	1:10
CD31	egér	JC70A	Dako	1:30
CD34	egér	QBend10	Dako	1:20
CD35	egér	Ber-Mac-DRC	Dako	1:50
CD68	egér	PGM-1	Dako	1:100
CD163	egér	10D6	Thermo-LabVision, Fremount, CA, USA	1:200
Desmin	egér	D33	Dako	1:200
Desmin	egér	DE-R-11	Dako	1:20
Desmin	nyúl	D8281	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	1:200
Desmoplakin	nyúl	Dp12	A.I. Magee, National Institute for Medical	1:300
Desmoglein	nyúl	Dgl917	Research, Mill Hill, London, UK	1:300
EGFR	egér	EGFR.113	Leica-NovoCastra, Newcastle, UK	1:30
ER	egér	6F11	Dako	1:100
Faktor VIII	nyúl	IR527	Dako	1:800
Glikoforin C	egér	RET 40f	Dako	1:100
HER2	egér	CB11	Dako	1:100
HER2	nyúl	4B5	Roche-Ventana, Tuzon, AZ, USA	1:1
IgG	nyúl	A0423	Dako	1:500
IgM	nyúl	A0425	Dako	1:300
Ki67	egér	Mib1	Dako	1:100
Ki67	nyúl	SP6	Thermo-LabVision	1:500
Kollagén III	kecske	1330-1	Southern Biotechnology, Birmingham, AL, USA	1:50
Kollagén IV	egér	CIV 22	Dako	1:40
Laminin	nyúl	AHP420	Serotec	1:200
LNGFR	egér	8211	Boehringer, Ingelheim, Németország	1:10
LNGFR	egér	7F10	AbCam, Cambridge, MA, USA	1:300
Myo D1	egér	5.8A	Leica-NovoCastra	1:50
p21 ^{waf1}	egér	SX118	Dako	1:100
p27 ^{kip1}	egér	SX53G8	Dako	1:100
PR	egér	1A6	Dako	1:100
Sca-1-FICT	egér	E13-161.7	Serotec	1:30
S-100	nyúl	Z0311	Dako	1:300
Vimentin	egér	V9	Dako (RTU)	1:2

LNGFR: alacsony affinitású idegi növekedési faktor receptor

kópos fedőlemezen tenyésztett sejtkultúrákat metanol-aceton 1:1 arányú elegyében, vagy 10%-os formalinban rögzítettük 10 percig (utóbbiakat TBST-vel permeabilizáltuk), majd az immunreakció, antigén feltárás nélkül, a fenti immunperoxidáz módszerrel megegyező módon zajlott, kivéve az alkalmazott detektáló rendszereket. A primer antitesteket az 4. és 5. fejezetben fluoreszcein izotiocianáttal (FITC, zöld) konjugált anti-

egér immunglobulinokkal (1:50), illetve, Texas Red-del (piros) jelölt streptavidinnel (1:300; előtte biotinnal jelölt kecske anti-nyúl immunglobulinnal, 1:400); a későbbi fejezetekben Alexa488 (zöld), vagy Alexa546 (narancs-piros) fluorokrómmal konjugált anti-egér immunglobulinok, illetve anti-nyúl immunglobulinok TBS-sel készített 1:200-as hígításával, 60 percig inkubálva mutattuk ki. Kettős jelöléskor az eltérő fluorkrómmal konjugált anti-egér, ill. anti-nyúl immunglobulinokat szimultán alkalmaztuk, miként előtte az egér, ill. nyúl eredetű primer antitesteket is (137). A sejtmagokat Hoescht, DAPI (kék), vagy 7-aminoactinomycinnel (7AAD; piros) festettük. A fluoreszcens reagensek az Invitrogen/-Life Tech., (korábban Molecular Probes, Carlsbad, CA) cégtől származtak. A reakciókat Leica TCS SP (Leica Lasertechnique, Heidelberg) konfokális lézerpásztázó mikroszkóppal, vagy Panoramic Scan (3DHISTECH, Budapest) metszetdigitalizálóval 3-7 optikai síkban vizsgáltuk, hogy a $<1\mu\text{m}$ -es connexin csatornákat a teljes $\sim 5\mu\text{m}$ -es metszetvastagságban kimutassuk. Az immunperoxidáz reakciókat szintén teljes metszet digitalizálás után tanulmányoztuk.

Félvékony műgyantás metszetek és elektronmikroszkópia

Kisméretű, 1-2 mm³-es szövetmintákat 2%-os glutáraldehidben, majd 4%-os osmium tetroxidban rögzítettünk, majd blokkban 1% uranil acetáttal kontrasztoltunk, végül dehidráció után propilén oxidból Durcupan ACM (Fluka, Sigma-Aldrich), vagy TAAB 812 (Aldermaston, UK) epoxi műgyantába ágyaztuk. Félvékony (1 μm vastag) metszeteket metilénkék-bázikus fukszinnal festettük, melyek ellenőrzése alapján a blokkok reprezentatív területeiből ultravékony (80-100 nm) metszeteket készítettünk. Reynold-féle ólom citrátos utókontrasztolás után JEOL JM 1010 (Tokió, Japán), vagy Philips CM10 (Eindhoven, Hollandia) elektronmikroszkópot használtunk 80 kV-on.

Fagyasztva töréses elektronmikroszkópia. Emberi csontvelőből izolált stromasejteket poli-D-lizinnel fedett mikroszkópos fedőlemezekre tenyésztés után, illetve emberi tonsilla darabjait 4 °C-on előbb 1%-os paraformaldehid és 1.25%-os glutáraldehid elegyében, majd 4%-os formaldehid és 5%-os glutáraldehid elegyében rögzítettük (138). A mintákat emelkedő koncentrációjú 5%, 12,5 %, majd 25%-os glicerinnel infiltráltuk, majd folyékony freonban lefagyasztás után torziósan törtük (Cressington, Watford, UK), végül szén és platina gőzöléssel, majd szén filmmel vontuk be (139). Nátrium hipokloritos maratás után a replikákat elektronmikroszkóppal vizsgáltuk.

Northern blot vizsgálatok. Az összes RNS-t fenol-kloroformmal izoláltuk (140), 1%-os agaróz/formaldehid gélen futtattuk, majd blottoltuk nitrocellulóz membránra (Boehringer, Mannheim, Németország). A mintákat 50% deionizált formamid, 4x SSC (Na kloriddal izotonizált, pH 7,4-es citromsav-Na citrát puffer), 1x-es Denhardt-oldat elegyével előkezeltük, majd patkány szöveteken 68°C-on, emberi szöveteken 45°C-on hibridizáltunk a patkány Cx43 gén 714-1349-es bázissorrendjét felismerő antiszenz-RNS próbával éjszakán át (141). A Bluescript plazmidba klónozott patkány Cx43 cDNS-t XHO I restrikciós endonukleázzal linearizáltuk, majd a próbát digoxigenin RNS jelölő kittel, *in vitro* „run-off” transzkripcióval T3 RNS polimerázzal készítettük (135). Végül a membránokat alkalikus foszfátáz-jelölt anti-digoxigenin antitesttel kezeltük (1:5000) 2 órán át, majd 5-bromo-4-chloro-3-indoxilfoszfát (BCIP) kromogénnel hívtuk elő.

Funkcionális festék-transzfer vizsgálatok a metabolikus kommunikáció igazolására.

Izzított Omega Dot üveg kapillárisból (Clarke Electromedical, Hamden, UK) 60 M Ohm-os ellenállású mikroelektrodot húztunk, amit 3-5 %-os, desztillált vízben hígított Lucifer Yellow CH lítiumsó (lucifersárga; Sigma L 0144, Ms:457 Da) (142) fluoreszcens festékkel töltöttünk fel. A mikroelektrodon keresztül, a connexin csatorna-permeabilis festéket mikroszkópos manipulátorral ionoforézissel injektáltunk egyedi sejtekbe (143). A szomszédos sejtekbe történő festéktranszfer mértékét, mint a sejt-sejt kommunikáció jelét 3-5 perccel a kezelés után konfokális lézerpásztázó mikroszkóppal vizsgáltuk. A festéktranszfer kísérletekben a sejteket 1%-os gentamicin és 10 % újszülött borjúsérum (FCS) taralmú Iscove-féle módosított Dulbecco médiumban (IMDM) kezeltük.

Vizsgált szövetek. Az archivált, formalinban-rögzített, paraffinba ágyazott emberi szövetek felhasználása az illetékes intézmények, a Szegedi Tudományegyetem, a Budai MÁV kórház, a Zürich-i Egyetem, a University College London, a Rizzoli Istitute, Bologna és a Semmelweis Egyetem etikai bizottságainak előírásai és engedélyei alapján történtek. A friss emberi szövetek a betegek beleegyezésével kerültek a vizsgálatokba. A kísérleti állatok és állati szövetek felhasználása tudományos célra az Animal Scientific Act 1986-os előírásai alapján, a fenti Intézmények által kiadott etikai engedély alapján zajlott. Szöveti multiblokk készítéshez a számítógép vezérelt TMA Master berendezést (3DHISTECH, Budapest) használtuk.

Statisztika. Statisztikai értékeléshez az SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) szoftver csomag programjait használtuk, $p < 0.05$ -nél húzva meg a szignifikancia alsó határértékét.

4. Connexin expresszió és direkt sejt-sejt kommunikáció normál, regenerálódó és leukémiás csontvelőben

4.1. Bevezetés

Mind a veleszületett, mind az adaptív immunsejtek a csontvelőben pluripotens őssejtekből fejlődnek sejtvonalelkötelezett prekursor sejtekké, majd érett effektor sejtekké a tímuszban és a perifériás nyirokszervekben válnak (144). Rágcsálókban az embrionális máj is fontos korai vérképző szerv (145). A hemopoetikus sejtek fejlődése és érése az intersinusoidális teret behálózó stromális sejtekből, extracelluláris matrixból és endothel sejtekből álló háromdimenziós váz mikrokörnyezetében zajlik (146). A stromális sejtálózat szolubilis növekedési faktorokat is termel és a migráló hemopoetikus sejtekkel szoros interaktív kapcsolatban van. A vérképzést alapvetően hemopoetikus növekedési faktorok (146, 147), valamint sejt-sejt és sejt-extracelluláris matrix direkt interakciók szabályozzák (148, 149). Ezen a mechanizmusok receptor-ligand kapcsolatokon alapulnak. Már az 1970-es években felmerült, hogy a receptor-ligand szabályozás mellett a direkt sejt-sejt kommunikáció is szerepet játszik a vérképző-lymphoretikuláris funkcióinak a koordinálásban is (150).

Az „gap junction” csatornák létezésének megbízható kezdeti bizonyítékai a hemopoetikus rendszerben közvetlenül az értekezésben részletezett munkáink (135, 151) előtt kerültek közlésre (138, 152-154). Közleményünk megjelenésekor (135) az Am J Pathol szerkesztője a direkt sejt-sejt kommunikációt választotta a szerkesztői kommentár témájául, kiemelten hivatkozva munkánkra (155).

Bár hemopoetikus/lymphoid sejtekben a „gap junction” csatornák elektrofiziológiai jeleit már 40 éve megfigyelték (156), és ezt követően ultrastruktuális megjelenésüket is leírták (157-160), a bizonyítékok sokáig nem voltak egyértelműek (138). A problémák a korszerű molekuláris módszerek hiányával, a kommunikációs csatornák szubmikroszkópos méretével, nyugvó csontvelőben relatív ritka megjelenésével, ill. elektronmikroszkóposan a membránokra merőleges metszési orientáció igényével magyarázhatók. Ráadásul a csersavas, ill. galluszsavas előkezelés után megfigyelt „gap junction” kapcsolatokra emlékeztető penta/heptalamináris ultrastruktúrákról kiderült, hogy az előkezelés műtermékei (161, 162). Végül anémiás egér csontvelő stromasejtjeiben (163), valamint citotoxikus kezelést követő csontvelői regeneráció után igazolt jelentős felülregulációjuk tette lehetővé megbízható azonosításukat (138). Azonban a connexin csatornák pontos lokalizációjáról, sejttypus asszociációjáról

csontvelőben nem volt adat. Ugyancsak hiányzott regenerálódó csontvelőben a folyamat dinamikájának és strukturális *in situ* követésének pontos mennyiségi és a csatornák méretbeli meghatározása, valamint a potenciális heterocelluláris sejt-kommunikáció irányultságára vonatkozó információk.

Ide vonatkozó munkánkban emberi és egér csontvelőben tanulmányoztuk a connexin csatornák eloszlását, sejttípus asszociációját fiatal és idősebb állatokban, csontvelő ablációt követő regeneráció kapcsán, valamint vérképzőszervi malignus elváltozásokban, leukémiákban (135, 151). Immunmorfológiai alapú vizsgálatainkat kiegészítettük mRNS expressziós, valamint funkcionális mikromanipulációs festék-transzfer kísérletekkel. Speciális módszert fejlesztettünk ki a connexin csatornák érzékeny és megbízható kimutatására, melyben félvékony műgyantás metszetekben (167), optimalizált antigénfeltárás után (127) szimpla és kombinált immunfluoreszcens jelölést (137) és több optikai síkban konfokális lézerpásztázó mikroszkópos elemzést végeztünk.

4.2. Anyag és Módszer

Egér csontvelő minták. Az egér csontvelő minták 6 és 12 hetes C57BL/Sn10 egerek femorális csontjaiból származtak. Az epiphyseális és a csontközép régiót különválasztva 10%-os formalinban történt rögzítés, majd dehidráció után a mintákat Araldite (epoxi) műgyantába (Agar Sci. Stansted, UK) ágyasztuk és dekalcinálás nélkül metsztük.

Emberi csontvelő biopsziák. A Szegedi Tudományegyetem Belgyógyászati Klinika Hematológiai részlegében Jamshidi tűvel vett csontvelő mintákat neutrálisan pufferelt 10%-os formalinban rögzítettük, majd a Patológiai Intézetben Durcupan (szintén epoxi) műgyantába (Fluka, Bazel, Svájc) ágyasztuk (164). Az üveggéssel ultramikrotómmal készített félvékony (1 µm-es) metszetekből a gyantát az *általános 3. Módszer fejezetben* leírtak szerint távolítottuk el. A diagnózisok a klinikai adatok, szövetmorfológia és immunfenotipizálás alapján készültek (**4. táblázat**).

Immunhisztó-/citokémiai vizsgálatok. A *3. Módszer fejezetben* leírtak szerint zajlottak azzal a kiegészítéssel, hogy a poliklonális Cx43 (HJ, 1:300) antitest alkalmazásakor az antigénfeltárást még egy 3-6 perces 0,1%-os tripszin emésztés (Difco, Michigan, MI) is követte az immunfluoreszcens reakció előtt. Sejtenyészeten és fagyasztott metszeteken a Cx43 fehérjét a CX-1B1 egér hibridomából nyert klónnal mutattuk ki.

4. táblázat. A vizsgált emberi csontvelő biopsziák klinikopatológiai jellemzői

Eset/Azonosító	Életkor/Nem (év)	Diagnózis	Kezelés	Sejtsűrűség/Jellemzők biopszia előtt
1. 8/92	33 nő	Normál csontvelő	-	HL stádiumhoz/normocelluláris
2. 362/92	62 férfi	Normál csontvelő	-	HL stádiumhoz/normocelluláris
3. 106/94	37 nő	Malignitás nem volt	-	Mérsékelt hipercelluláris
4. 57/93	19 nő	Erythropoetikus hiperplázia	-	Hipercelluláris
5. 362/93	65 nő	Erythropoetikus hiperplázia	-	Hipercelluláris
6. 23/92	64 nő	Megakaryoblastos dyserythropoiesis	-	Normocelluláris
7. 248/93	16 férfi	ALL	-	Hipercelluláris (Tdt+, CD34+)
8. 47/94	39 férfi	ALL	-	Fibrózissal (CD34+)
9. 305/93	20 férfi	ALL (tekervényes sejtmag)	-	Hipercelluláris
10. 304/93	16 férfi	ALL (részleges remisszió)	IT	Hipopláziás
11. 215/93	35 férfi	ALL-FAB-L2	IT	Hipercelluláris (relapszus)
12. 301/93	66 nő	ALL, FAB-L2 (pre-B sejtes)	-	Hipercelluláris, citoplazma IgM+, CD20+
13. 401/93	46 férfi	ALL, FAB-L2 („common”)	-	Hipercelluláris (CD20+)
14. 131/93	18 férfi	ALL, FAB-L2	-	Mérsékelt hipocelluláris
15. 312/91	43 férfi	ALL, FAB-L3	-	Hipercelluláris, Burkitt- típusú
16. 208/91	75 férfi	AML, FAB-M2	-	Myelodysplasiás szindrómából
17. 44/91	36 férfi	AML, FAB-M4	IT	Hipocelluláris, remisszóban
18. 126/94	37 nő	AML, FAB-M4	-	Myelodysplasiás szindrómából
19. 346/92	58 férfi	AML, FAB-M4-5	-	Fibrózis
20. 361/92	66 nő	AML, FAB-M4-5	-	Mérsékelt fibrózis
21. 295/92	75 nő	AML, FAB-M5	-	Hipercelluláris
22. 406/92	71 férfi	AML, FAB-M7	-	Acut myelofibrózis (CD34+)
23. 87/94	44 nő	CMPD, PRV	-	Tricelluláris hiperplázia
24. 250/92	48 férfi	CMPD, PRV	-	Megakaryocita dominancia
25. 29/93	51 nő	CMPD, CGL	-	Megakaryocytás/granulocytás myelosis
26. 167/93	98 nő	CMPD, CGL	-	Granulocytás myelosis
27. 95/94	34 férfi	CMPD, PRV	-	Blastos krízis
28. 54/94	79 nő	Myeloma multiplex	-	Plazmasejtes típus
29. 90/94	79 férfi	Myeloma multiplex	-	Plazmablasztos típus
30. 378/93	75 férfi	Hajassejtes leukémia	-	Behúzott sejtmagok
31. 358/92	51 nő	Köpenysejtes non-Hodgkin lymphoma	-	Centrocytás
32. 96/94	62 nő	DiGuglielmo-szindróma	-	Krónikus

Rövidítések: ALL – akut lymphoblastos leukémia; AML – akut myeloid leukémia; CGL – krónikus granulocytás leukémia; CMPD – krónikus myeloproliferatív szindróma; FAB – „French-American British” klasszifikáció; HL – Hodgkin lymphoma; IT – indukciós terápia; MDS – myelodysplasiás szindróma; PRV – polycythaemia rubra vera

Egér csontvelő ablációja 5-Fluorouracillal. 12-hetes C57BL/Sn10 egerek farok-vénájába 150 mg/testsúly kg 5-Fluorouracilt (5FU, Sigma F6627) injektáltunk. Az állatokat 6 egymást követő napon feláldoztuk majd femorális csontjaikat epiphyseális és középső régiókra választva pikrinsavas formalinban (Zamboni) rögzítettük, majd 0,3 M/l EDTA oldatban dekalcináltuk 4 napig, végül paraffinba ágyasztuk.

Funkcionális festék-transzfer vizsgálatok a metabolikus kommunikáció igazolására.

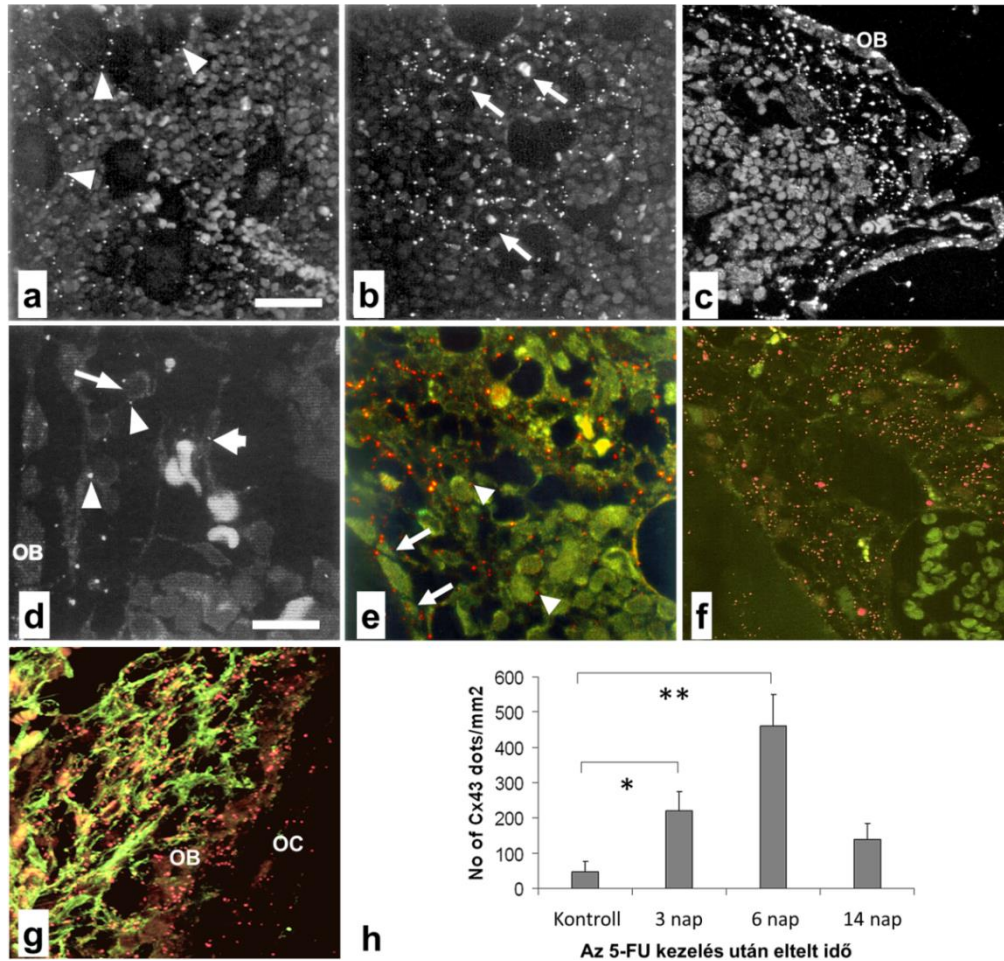
A csontvelői FBMD1 hemopoetikus stromális sejteket (144) 10^{-5} M/l hidrocortizont, 10% BSA-t, 5% lószérumot tartalmazó, módosított Eagle-féle médiumban (α -MEM) tenyésztettük 5% O₂ és 10% CO₂ jelenlétében. A mikropilláris festéktranszfer módszer mellett (3. *Módszer fejezet*) egy másik kísérletben hemopoetikus sejteket jelöltünk 1 mmol/l koncentrációjú BCECF-AM-el (2',7'-bis-(2-karboxietil)-5,6-karboxifluorescein acetometil észter), majd a jelölt sejteket konfluens stromasejt tenyészetre rétegeztünk. A lipofil BCECF-AM molekulákból az észterkötés endogén hasítása után a sejtekben hidrophil zöld fluoreszcens festék keletkezett, mely a connexin csatornákon jutott át érintkező szomszédos sejtbe.

A „gap junction” plakkok mérése és számának meghatározása. A Cx43 immunjelölt plakkok méretét és számát konfokális lézerpasztázó mikroszkópos képeken az Image J 1.29 software-rel (NIH, Bethesda, MD) határoztuk meg. A standard „pin-hole” és feszültség értékek mellett immunfluoreszcens módszerrel mért „gap junction” méretek jól egyezést mutattak a fagyasztva tört mintákon ultrastrukturálisan meghatározottakkal (165). A végső értékeket 1 mm³ csontvelőre számítottuk (135). Az eredmények statisztikai összevetésére független t-próbát használtunk.

4.3. Eredmények**Connexinek fiatal és felnőtt egér csontvelőben, illetve csontvelő abláció után**

Emberi és egér csontvelőben is igazoltuk a Cx43 (GJA1) expresszióját, mind mRNS, mind fehérje szinten. Cx37 immunreakciót csak érendothel sejteken láttunk, azonban csontvelőben sem Cx32, sem Cx26 fehérjét nem tudtunk kimutatni. Fiatal (6 hetes) C57BL/Sn10 egér femoralis csontvelő metszetein a Cx43 immunhisztokémiai reakció, a vérképzősejtek határán elszórt pontszerű reakciót adott (**2. ábra**). A „gap junction” plakkoknak megfelelő Cx43 reakció random eloszlásban csontvelőszerte, minden hemopoetikus sejttípus körül előfordult. Arteriolákon, szinusz endothel és megakaryocita sejteken egyértelműen azonosítható volt (**2a-b. ábra**). Legnagyobb számban osteocytákon, az endosteális-hemopoetikus határ osteoblast rétegében és az ezzel kapcsolatot mutató, csontvelői stromasejtek nyúlványain mutattuk ki (**2c. ábra**). Zsírsíkban optikailag tovább szeletelt metszetben a Cx43 plakkok gyakran a stromasejt nyúlvány és hemopoetikus sejtek között látszóttak (**2d. ábra**). A Cx43 reakció sűrűsége

az osteoblastoktól a velőúr belseje felé csökkent és jelentősen magasabb volt epiphyseális, mint a csont középső régióit kitöltő velőben.



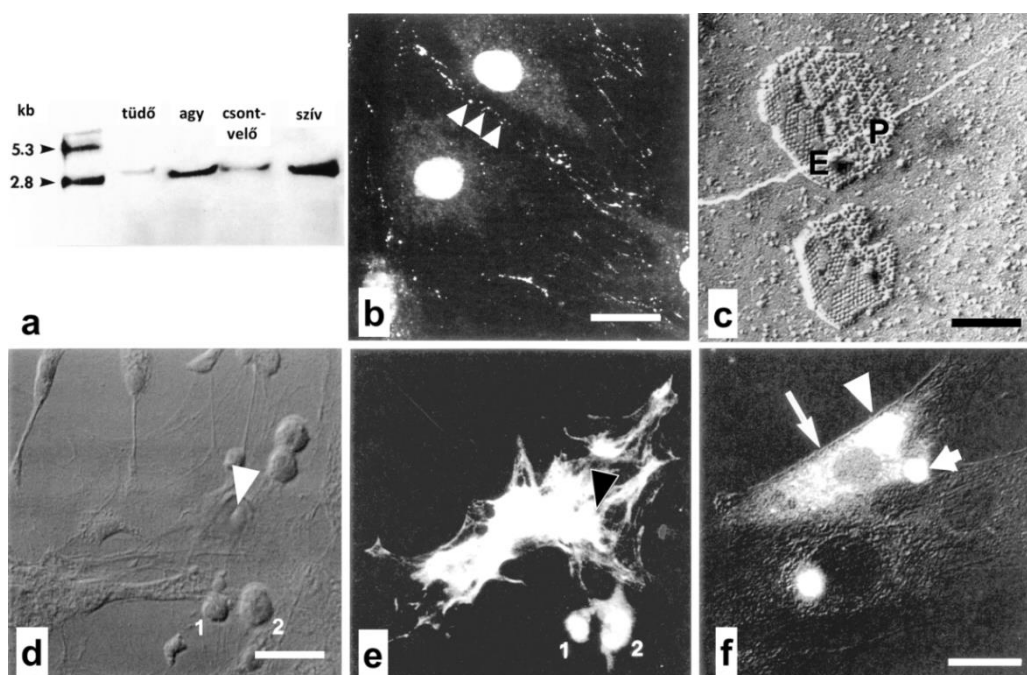
2. ábra. Cx43 immunfluoreszcens reakció C57BL/Sn10 egér femorális csontvelő félvékony metszetein. 6 hetes egér csontvelő (a-d) centrális régiójában a pontszerű Cx43 csatorna aggregátumok (gap junction) random eloszlást mutatnak a megakaryocyták (a - nyílhegyek) és az arteriolák (b - nyilak) körüli halmozódással. Az epiphyseális régió endosteális csontvelő határán az osteoblastokon (OB) és a környező stromális sejtek nyúlványain jelentősen dúsulnak (c). Optikailag szeletelt (~0.3µm vastag) metszeten a Cx43 csatornák (nyílhegyek) stromasejt nyúlványok és az érintkező hemopoetikus sejtek (vékony nyíl) között és szinusz endothel sejteken (vastag nyíl) azonosíthatók. Szignifikánsan emelkedett számú (**p<0.001; *p<0,01) Cx43 csatorna 12 hetes egerek femorálisának középső (e) és epiphyseális (f-g) régióiban 6 nappal az 5-FU abláció után (lásd grafikon - h). Nagyszámú Cx43 reakció az osteoblastokon (nyilak), hemopoetikus sejteken (nyílhegyek) (e), a III-as típusú kollagént (zöld) kifejező csontvelői stromasejtek nyúlványain és osteocytákon (g). Méretvonal az (a) ábrán, a-c:25 µm; d:10 µm. e-g:12 µm.

Felnőtt (12 hetes) egér csontvelő hasonló eloszlásban, szignifikánsan kevesebb (p<0.01) Cx43 plakkot (gap junction) tartalmazott ($0.89 \times 10^5/\text{mm}^3$; SD = $+0.18 \times 10^5$; n = 10), mint a fiatal (6 hetes) állatoké ($1.75 \times 10^5/\text{mm}^3$; SD = $+0.42 \times 10^5$; n = 10). Legnagyobb Cx43 jelsűrűség a fejlődésdinamikailag legaktívabb epiphyseális csontvelő endosteális hemopoetikus határ-régiójában volt. Egerekben az átlagos „gap junction” plakk méret 0.49 µm-nek (SD = $+0.18$; n = 50) bizonyult.

3-6 nappal az 5-FU-val 12 hetes C57BL/Sn10 egerekben végzett csontvelő abláció után, a csontvelő-csont határon épen maradt osteoblast rétegtől a csontvelő irányában csupán 3-5 réteg újonnan képződött vértképző sejtréteg látszott (**2e-h. ábra**). Ebben a régióban szignifikánsan magasabb volt a Cx43 csatornák száma, a kezeletlen állatokéhoz képest ($p_{3nap} < 0.01$; $p_{6nap} < 0.001$). Kezelt állatok femurjának közepén a reakció sűrűsége hasonló volt a fiatal állatok epiphyseális régiójához, ahol nagyszámú ősz- és progenitorsejt részvételével a dinamikus vértképzés zajlik. A sűrű Cx43 csatornák osteocytákon, osteoblastokon, a III-as típusú kollagén reakciót adó stromasejtek nyúlványain és a hemopoetikus sejteken is azonosíthatók voltak.

Funkcionális festék-transzfer a direkt sejt-sejt kommunikáció igazolására

Emberi csontvelőben a Cx43 mRNS-t Northern blot módszerrel mutattuk ki kontroll szív, agy és tüdő minták mellett (**3a. ábra**). Konfluens, FBMD1 csontvelői stromasejtvonal tenyészetében a Cx43 csatornákat nagy denzitásban a sejtek egymással érintkező membránján láttuk (**3b. ábra**). A szabályos plakkokba rendeződött connexin csatornákat



3. ábra. Cx43 expresszió és funkcionális festék-transzfer kísérletek emberi csontvelői sejtekben. A Cx43 mRNS kimutatása Northern blot módszerrel, kontroll szövetek mellett (a). Sejtmembránba rendeződött Cx43 plakkok (nyílhegyek) FBMD1 stromasejt tenyészetben (b). Connexin csatornák rendezett aggregátuma („gap junction”) primer csontvelői stromasejt membránjában (E: extracelluláris; P: citoplazma felszín) fagyasztva töréses elektronmikroszkópiával (c). A stromasejtbe juttatott lucifersárga festék (nyílhegy a kapilláris behatolását jelzi) számos szomszédos stromasejtbe és két hemopoetikus sejtbe (1 és 2) is átjutott, hosszúéletű csontvelő tenyészetben (d: differenciál interferencia kontraszt, e: fluoreszcencia mód, azonos látótérben). BCECF fluoreszcens festékkel jelölt hemopoetikus sejtől (nyílhegy) az alatta levő stromasejtbe (nyíl) történő ritka festék-transzfer (f). Sem a rövid nyíllal jelölt sejt, sem a különálló fluoreszkáló sejt nem ad festéket a stromasejtbe. Méretvonal, b és f: 10 μ m, c: 150 nm; d-e: 20 μ m.

fagyasztva töréses elektronmikroszkópiával, mind FBMD1, mind primer csontvelői stromasejtek membránjában azonosítottuk (**3c. ábra**). Heterocelluláris kommunikáció bizonyítását FBMD1 stromasejtekkel létrehozott hosszúéletű csontvelő tenyészetekben végeztük. Konfluens primer, ill. FBMD1 csontvelői stromasejt tenyészetben az egyedi sejtekbe injektált lucifersárga (Ms: 547 Da), 5 perc után a kísérletek 10%-ában átjutott 1-4 szomszédos stromasejt rétegbe, igazolva a direkt sejt-sejt kommunikációt (3d-e. ábrák). Amikor BCECF-AM észterrel jelölt hemopoetikus sejteket rétegeztünk konfluens stromasejtekre, ~ <1%-ban tudtuk igazolni a festék átjutását stromasejtekbe (**3f. ábra**).

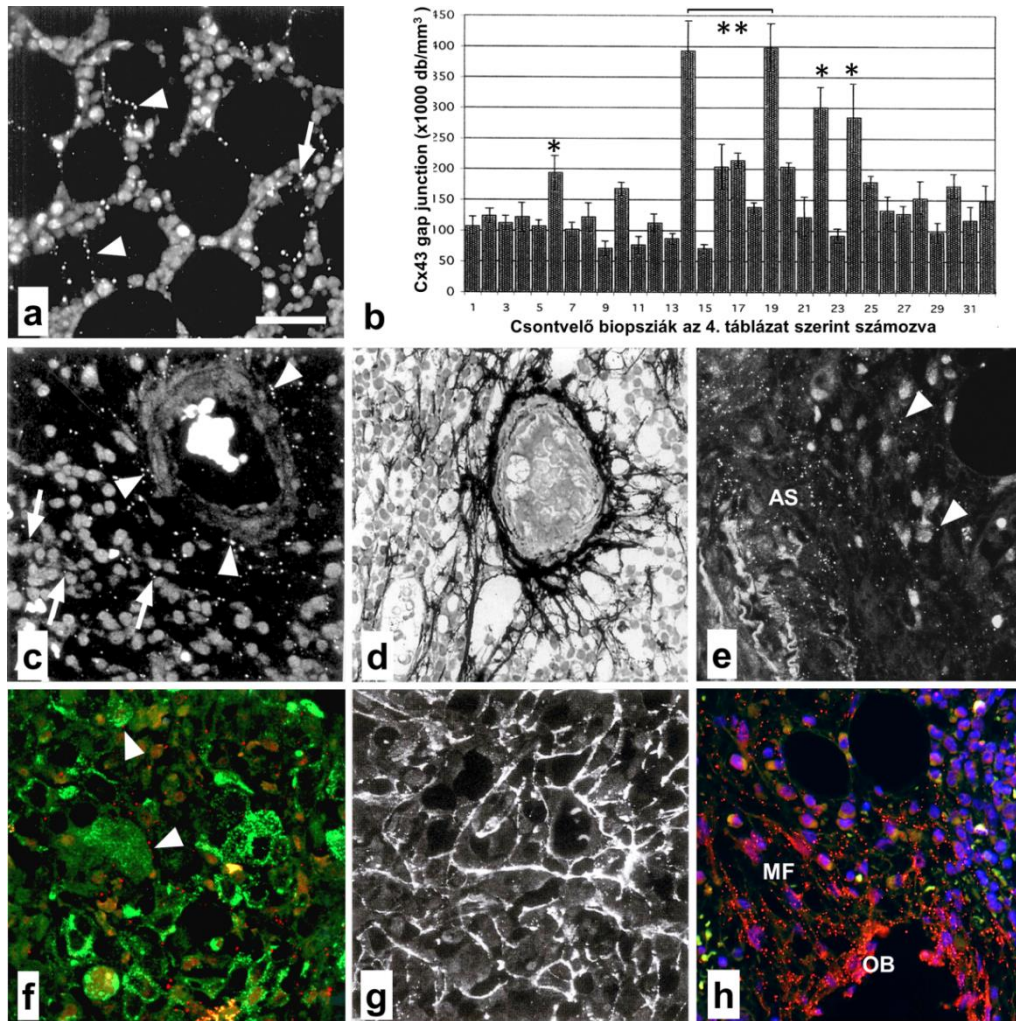
Connexinek normocelluláris és leukémiás emberi csontvelőben

Az *in situ* Cx43 expressziót a **4. táblázat**ban felsorolt emberi csontvelő biopsziák félvékony metszetein is tanulmányoztuk. Normocelluláris csontvelőben a Cx43 lokalizációja az egér csontvelőéhez hasonló volt, kiegészülve az adipocita membránok pozitívításával (**4a. ábra**, 2-es eset). A legtöbb Cx43 a III-as típusú kollagén és alacsony affinitású idegi növekedési faktor receptor (NGFR) pozitív csontvelői stromasejtek hálózatán volt. Az immunfestett Cx43 plakkok konfokális mikroszkóppal meghatározott átlag mérete emberi csontvelőben 0.40 μm -nek (SD = + 017; n = 50) bizonyult.

A hematológiai kórképekben (elsősorban leukémiák) a szöveti szerkezet torzulásától eltekintve a Cx43 reakció eloszlása a normál csontvelőjéhez hasonló volt. A vizsgált elváltozásokban a Cx43 „gap junction” plakkok mm^3 mintára vonatkoztatott mennyiségét a **4b. ábra** összesíti. A legkevesebb Cx43 reakció sejtdús, heveny lymphoblastos leukémiákban (ALL), különösen az előrehaladott, nem-kezelt esetekben volt. Az Cx43 immunjelekkel feltüntetett csatornák mennyisége szignifikánsan felülregulálódott (** $p < 0.001$; * $p < 0.05$) sejtsegregény ALL-ben (**4c-d. ábra**, 14-es eset), heveny myeloid leukémiában (AML) M4-5 (**4e. ábra**, 19-es eset), egy CD34 pozitív differenciálatlan hemoblastosisban (valószínű AML, FAB-M7) (**4f-g. ábra**, 22-es eset), megakaryocita hiperpláziával járó krónikus myeloproliferatív szindrómában (CMPD, 24-es eset) és krónikus granulocytás leukémiában (CGL) (**4h. ábra**, 25-ös eset). Minden Cx43 felülregulált esetben a stroma/hemopoetikus sejtarány szignifikánsan emelkedett volt a normocelluláris kontroll csontvelőkhöz képest.

4.4. Megbeszélés

A connexin csatornákon megvalósuló direkt sejt-sejt kommunikáció szerepét a vérképzésben számos megfigyelés bizonyítja (138, 152-154, 161, 162). Az itt bemutatott



4. ábra. Cx43 expresszió emberi leukémiák csontvelőbiopsziás félvékony metszetein. Sűrű Cx43 reakció normocelluláris csontvelő adipocita membránjain (nyílhegyek), kevés a hemopoetikus sejtek között (nyíl) (a). Cx43 plakkok mennyisége mm³ csontvelőre vonatkoztatva az **1. táblázat** eseteiben (b). Szignifikánsan megnövekedett Cx43 expresszió (**p<0.001) egy sejtsejény ALL-ben (14-es eset) az arteriola körüli stromasejteken (c, nyílhegyek), melyek 3-as típusú kollagén pozitívítást mutatnak (d), és kevés reakció a hemopoetikus sejtek között (nyíl). Nagyszámú Cx43 csatorna egy heveny myeloid leukémiában (AML) FAB-M4-5 (19-es eset) (e, AS: adventiciális stromasejtek). Felülregulált Cx43 expresszió (piros, *p<0,01), CD34 pozitív (zöld) differenciálatlan hemoblastosisban (valószínű AML, FAB-M7) (f, 22-es eset), a daganatsejtek között sűrű, NGFR pozitív stromasejt nyúlványokkal (g). Emelkedett Cx43 expresszió az osteoblastokban és a myelofibrotikus (MF) régióban, krónikus granulocytás leukémiában (CGL) (h, 25-ös eset). Immunfluoreszcens (a,c,e-h) és immunperoxidáz (d) reakciók. Méretvonal az (a) ábrán; a, b-h: 20µm.

munkáinkban a connexinek mikroanatómiai eloszlását, sejtípus asszociációját vizsgáltuk normál és regenerálódó egér csontvelőben, valamint emberi normocelluláris és leukémiás csontvelőben (135, 151). Továbbá, csontvelői sejttenyészetekben a „gap junction” kommunikáció lehetséges irányait tanulmányoztuk funkcionális festék-transzfer kísérletekkel.

Igazoltuk: 1) a Cx43 csatornákat endosteális és adventiciális stromasejteken, megakaryocytákon, adipocytákon, osteoblastokon és ritka eloszlásban bármilyen típusú

hemopoetikus sejten, illetve azokkal érintkezve; 2) a Cx43 csatornákat stromális és hemopoetikus sejtek közös határán; 3) hogy szignifikánsan emelkedett a Cx43 csatornák száma a fiatal (6 hetes) állatok csontvelejének epiphyseális régiójában a felnőtt (12 hetes) állatokéhoz képest, illetve, 5FU-val végzett csontvelő abláció után regenerálódó egér csontvelőben a kezeletlen kontroll állatokéhoz képest; 4) hogy, sejtenyészetben kétirányú direkt sejt-sejt kommunikáció lehetséges a stroma-hemopoetikus sejtirány preferálásával; és 5) hogy, az emelkedett stroma-hemopoetikus sejtaránnyal járó leukémiákban a Cx43 csatornák száma 2-4 szeresére növekedhet a normocelluláris csontvelőhöz képest.

A direkt sejt-sejt kommunikációs csatornák megbízható azonosítása, sokáig jelentős korlátokba ütközött. Az ultrastrukturális kimutatás orientációs nehézségeiről a bevezetőben már szóltam (166). Ugyanakkor a connexin mRNS vagy fehérje kimutatása sem feltétlenül igazol működő csatornákat, a funkcionális festék-transzfer vizsgálatok pedig nem tájékoztatnak a csatornafehérje típusáról. Ráadásul az adott connexin mRNS mennyisége nincs mindig összhangban a termelt connexin fehérje szintjével és a csatornafunkciókkal hemopoetikus sejtekben (153). Ezért kombináltuk a fenti módszereket, hogy egyedi korlátaikat minimalizáljuk.

A szubmikroszkópos immunfestett connexin csatornák pontos lokalizációja, egy mineralizált csontszövettel védett mobilis vérképző sejtekkel kitöltött szemi-szolid szövetben komoly kihívást jelentett. Ezért erre a célra a Jamshidi csontvelő biopsziák diagnosztikájára beállított módszerünket adaptáltuk (167). Ebben epoxi-műgyantába dekalcinálás nélkül beágyazott csontvelőminták félvékony (~2 µm) metszetein, nátrium-metoxidos maratás, majd antigénfeltárás után végeztünk szimpla vagy kettős immunfluoreszcens reakciókat, melyek eredményét nagy-felbontású konfokális lézerpasztázó mikroszkóppal analizáltuk akár több virtuális síkban (165). Ez különösen az 1990-es évek közepén unikális megközelítés volt, amely megengedte a sejtek immunfenotipizálása mellett a connexin jelek szemikvantitatív mennyiségi analizisét normál, regenerálódó, ill. leukémiás csontvelő mintákban.

Ma már elfogadott, hogy connexin csatornákat a lymphoretikuláris rendszer, ideértve a vérképző csontvelőt (138, 152, 153), tímuszt (168) és a másodlagos nyirokszerveket (166, 169, 170), is képez. A direkt sejt-sejt kommunikáció alapvető jelentőségét sugallja a connexinek jelentős konzerváltsága az evolúció során törzsfajlásban távoli fajok között is (171), ami lehetővé tette azonos mRNS és antitest próbák alkalmazását emberi és egér csontvelőben egyaránt (135).

A vizsgált négyféle connexinből (Cx26, Cx32, Cx37 és Cx43) csontvelői stroma és vérképző sejteken csak a Cx43 izotípust tudtuk egyértelműen igazolni mRNA és fehérje szinten mind egér, mind emberi szövetmintákban. A stromasejtek membránjában a connexin csatornák utrastrukturális megjelenését is bizonyítottuk. Elektron-mikroszkóppal, a szomszédos sejtek összefekvő külső membránlemezei közti (normálisan ~10 nm-es) távolság ~2 nm-re lecsökkenő szakaszait, valamint fagyasztva törés után a sejtmembrán connexon partikulák rendezett aggregátumait („gap junction”) is kimutattuk. Mindmáig a Cx43 bizonyult a domináns csatorna izotípusnak (172), annak ellenére, hogy egy csoport 9 connexin izotípus mRNA-t mutatta ki tenyésztett S-17 egér csontvelői stromasejtekben (173), míg mások a Cx43 mellett, egér csontvelőben Cx45 és Cx31 mRNA expressziót is igazoltak (174).

A Cx43 csatornákat nagyobb mennyiségben az osteoblastok és a csontvelői stromasejtek hálózatán igazoltunk mind egér, mind emberi csontvelőben. A hemopoetikus endosteális határon e közös hisztogenezisű két sejtípus szoros kapcsolatot mutatott egymással, így sejthálózataik között a Cx43 csatornák mind a homocelluláris, mind heterocelluláris kapcsolatokat fenntarthatnak (175, 176). A csont osteocytái szintén Cx43 csatornákkal kapcsolódnak egymáshoz (177) és az osteoblastokhoz (*lásd részletesen az 8. fejezetben* (178). Ezért valószínű, hogy a primitív mesenchymális sejtek a csont és a velő határán mikrokörnyezeti hatásra akár csontvelői stromává, vagy osteoblastokká, majd osteocytákká alakulnak és a differenciálódási folyamatok koordinálásában a Cx43 (részben a Cx45) csatornák szerepet játszanak (178, 179).

A stromasejtek jól adaptálódnak a vérképzés igényeihez. A szinuszok és arteriolák körüli adventiciális stroma emelkedett Cx43 expressziója szerepet játszhat a szisztémás humorális szignálok közvetítésében. Nyugalmi vérképzés során a stromasejtek adipocytákká differenciálódnak, azonban nagymértékű vérvesztés, vagy citotoxikus kezelés hatására visszaalakulnak vérképzést támogató stromasejtekké (180). Mivel az adipocyta membránokban következetesen kimutathatók a Cx43 csatornák, szerepük feltételezhető a reaktivációs folyamat koordinálásában is. A legtöbb Cx43 csatorna a megakaryocyták körül, legalább is részben, az ott futó stromasejt nyúlványokon mutatható ki. Az, hogy a megakaryoblastos daganatsejtek akut myeloid leukémiában (FAB-M7) szintén hordoztak Cx43 immunjeleket, támogatja e sejtek képességét a csatornafehérje termelésére. Egyéb hemopoetikus sejtípusok körül csak ritka és random Cx43 csatornákat tudtunk igazolni, szintén stromasejt nyúlványok mentén.

Mind fiatal állatokban, mind citotoxikus kezelést követő csontvelői regenerációban a Cx43 csatornák számának szignifikáns emelkedését láttuk az aktív vérképzés epiphyseális csontvelő, endosteális-hemopoetikus határrégiójában. Mindkét esetben fokozott az igény őssejtekből korai hemopoetikus progenitor sejtek képzésére (138, 181), ami a connexin csatornák szerepét felveti a vérképzés korai szakaszában. Ezt támogatja, hogy a csatorna funkciók farmakológiai gátlása korlátozta a csontvelői őssejtek fejlődését hosszúéletű tenyészetekben (153, 182). Genetikailag Cx43 hiányos stromasejtekkel végzett tenyészetben ugyancsak jelentősen csökkent a késői megjelenésű, differenciálatlanabb sejtekből kiinduló, 3-5 hetes sejtpopuláció (174). Hasonlóan, a Cx43 genetikai felülregulációja emelte a differenciálatlan myeloid sejtfrakciót, míg a Cx43 gátlása támogatta a myeloid sejtek differenciálódását egér csontvelő tenyészetben (183). Funkcionális festék transzfer kísérletekkel igazoltuk a connexin csatornákon zajló sejt-sejt kommunikációt nem csak stromasejtek (152), de stroma és hemopoetikus sejtek között is. A csatornapermeabilis BCECF fluoreszcens festékkel jelölt hemopoetikus sejtekkel ugyan ritkán (<1%-ban), de egyértelmű hemopoetikus-stromaset irányú kommunikációt is igazoltunk. Eredményeink, *in vitro* bizonyítják, hogy csontvelői stroma és hemopoetikus sejtek között mind homo-, mind heterocelluláris direkt sejt-sejt kommunikáció lehetséges, elsősorban stromasejt-hemopoetikus sejt irányban. Heterológ kommunikációt S17 stromasejtek és korai B-sejtek együtt tenyésztésekor mások nem tudtak igazolni (154). Azonban mi hosszúéletű csontvelő tenyészetet használtunk FBMD-1 stromasejtekkel, melyek öt tesztelt stromasejtvonal közül a legerősebb Cx43 expressziót mutatták és a legjobbnak bizonyultak a hemopoézis fenntartásában (153).

Annak megítélésére, hogy a Cx43 csatornák melyik csontvelői sejtben játszhatnak preferált szerepet, Jamshidi tüvel emberi leukémiás csontvelőkből vett biopsziákat is vizsgáltunk (164). A Cx43 immunreakció 2-4-szeres emelkedését láttuk egy hypopláziás ALL, egy AML-FAB-M4-5, egy myelodyspláziás szindróma emelkedett számú megakaryocytával és egy CD34+ akut megakaryoblastos leukémia (AML-FAB-M7) vizsgálatakor. Az esetek közös jellemzője a sejtszegénység emelkedett számú megakaryocytával és az emelkedett stroma/hemopoetikus sejtaránnyal. Mindez felveti a megakaryocytá fibrózis promotor citokinek, így a TGF- β és a PDGF szerepét a Cx43 expresszió támogatásában (184, 185). Ugyancsak a szolubilis faktorok és a direkt sejt-sejt kommunikáció együttműködésére utal, hogy a retinol kezelés felülregulálja, hidrokortizon és IL-1 viszont csökkenti a connexin kifejeződést és a direkt metabolikus

sejtkapcsolódást csontvelői stromasejtekben (154, 173). A Cx43 immunjelek száma a leukémiás minták döntő többségében nem tért el a normocelluláris csontvelőétől.

4.5. Összefoglalás – Az eredmények újdonságtartalma

Emberi és eger csontvelőben elsők között igazoltuk:

- a connexin (Cx43) csatornákat endosteális és adventiciális stromasejteken, megakaryocytákon, adipocytákon, osteoblastokon és ritka eloszlásban hemopoetikus sejteken;
- a connexin (Cx43) csatornákat stromális és hemopoetikus sejtek közös határán.
- hogy, sejttenyészetben kétirányú heterocelluláris direkt sejt-sejt kommunikáció lehetséges a stroma-hemopoetikus sejtirány preferálásával;
- hogy szignifikánsan emelkedett a Cx43 csatornák száma a fiatal (6 hetes) állatok csontvelőjében a felnőtt (12 hetes) állatokéhoz képest, valamint 5-Fluorouracillal végzett csontvelő abláció utáni regenerációban, ill. fokozott fibrózissal járó leukémiákban a normocelluláris csontvelőhöz képest.

Eredményeinkkel elsők között bizonyítottuk, hogy a „gap junction” direkt sejt-sejt kommunikáció része a csontvelői vérképzés multifaktoriális szabályozó mechanizmusainak stroma-stroma, valamint stroma hemopoetikus sejt közvetlen metabolikus kapcsolatokkal. A Cx43 csatornák szerepét igazoltuk a vérképzés korai szakaszában, fiatal állatokban és csontvelő ablációt követő regenerációban, amikor fokozott igény merül fel nagy mennyiségű progenitor sejt képzésére, valamint fokozott megakaryocyta számmal és fibrózissal járó leukémiákban.

5. Connexin expresszió és direkt sejt-sejt kommunikáció a másodlagos nyirokszervekben különös tekintettel a nyiroktüszőkre

5.1. Bevezetés

A másodlagos nyirokszervek specializált antigénszűrők, ahol a stromális sejthálózat és az immuntámogató sejtek jól szervezett mikrokörnyezete biztosítja a mobilis immunsejtek hatékony válaszreakcióit a potenciális patogénekre. A fibroblasztos retikulumsejtek (FRC), follikuláris dendritikus sejtek (FDC), lymphoendotheliális és vasculáris endothel sejtek hálózata, valamint az interdigitáló retikulumsejtek (IDC) által formált mikrokörnyezet fontos szerepet játszik a lymphocyták vándorlásában, aktiválásában és érésében. A nyirokszervek magasán szervezett szerkezetének és immunfunkcióinak szabályozásában a sejt-sejt ill., sejt-matrix adhéziós mechanizmusok és a szolubilis növekedési faktorok hatása régóta ismert és kutatott területek (186-188). Az adhézió közvetlen kapcsolatot feltételez, a citokinek pedig hamar felhígulnak diffúziójuk során. Tehát ezek a rövidtávon ható interakciók önmagukban nem magyarázzák az immunválasz kapcsán kialakuló szigorúan szabályozott szerkezetet és folyamatokat. A connexin direkt sejt-sejt kommunikáció képes a sejthálózatok funkcióinak összehangolására (189), ezért tanulmányozása nyirokszervekben is kézenfekvő volt (166, 169, 170, 190), amire vizsgálataink kezdetén publikált adatot nem találtunk.

A másodlagos nyirokszervekben az adaptív humorális és celluláris immunválasz bár együttműködve, de morfológiailag is jól elkülöníthető régiókban zajlik. A T-sejtfüggő humorális immunválasz során az aktivált B lymphocyták a másodlagos nyiroktüszőben szaporodnak és érnek. A sejtes immunitás effektor és memória T-sejtjei pedig az IDC sejtek által katalizálva a perifollikuláris régiókban fejlődnek. A nyiroktüszők csíranetrumának vázát képező FDC sejthálózat a B lymphocyták túlélését közvetlen FDC-B-sejt interakciók révén támogatja, ideértve a CXCL13/CXCR5, CXCL12/CXCR4, ICAM-1/LFA-1, VCAM/VLA-4 kapcsolatokat; a CD21 (C3d) és CD35 (C3b) komplement receptorok, valamint az immunglobulin FC γ R és FC ϵ R (CD23) receptorok által kötött és a B-sejtek számára bemutatott antigéneket; illetve a termelt BAFF, IL-6 és IL-15 citokineket (191-195). A FDC hálózat mikrokörnyezetében, follikuláris T helper sejtek támogatásával zajlik az aktivált B-sejtek klonális expansziója, a B-sejt klónok pozitív affinitási szelekciója az FDC által kínált antigénfelismerés minősége alapján, majd a B-sejtek izotípus váltása és érése immunglobulintermelő plazmasejteké vagy memóriasejteké (193, 196).

A normál/reaktív nyirokszervek mellett a connexin csatornákat a csíracentrum aktivált B-sejteiből kiinduló follikuláris lymphomában (FL) is tanulmányoztuk, ahol a nyirokcsomó szerkezete is jelentősen károsodik. Az FL egy lassan progrediáló lymphoma, melyben a t(14;18)(q32;q21) kromoszóma transzlokáció miatt az anti-apoptotikus Bcl-2 fehérje rendszerint felülregulált (197, 198). A CD10, bcl-2 és bcl-6 pozitív FL tumorsejtek a reaktív csíracentrumokat utánzó follikulusokat formálnak, melyek azonban szabálytalanok, eredeti polarizációjukat elvesztették (199, 200). Az FL follikulusokat a reaktív csíracentrumokhoz hasonlóan CD21, CD23 és CD35 pozitív, de eltorzult és hiányos FDC hálózat béleli (164). Grade 3-as daganatokban az eltűnő follikuláris jelleg és FDC (az esetek 25-35%-ában) az FL progresszióját jelzi a rosszabb prognózisú diffúz nagy B-sejtes lymphomába (DLBCL) (197). Az FL ugyancsak romló prognózissal járó csontvelői érintettsége, ahol FDC és follikuláris struktúrák is kialakulhatnak, az esetek 40-70%-ban fordul elő (201-203). Ugyanakkor a stromasejtek, beleértve az FDC hálózatot, támogathatják az FL sejtek kemo-, vagy CD20 célpontú biológiai (rituximab) terápia rezisztenciáját is (204-207).

Ebben a fejezetben összefoglalom a normál/reaktív másodlagos nyirokszervekben és follikuláris lymphomában a connexin csatornák lokalizációjának és szerepének feltárására irányuló immunmorfológiai, ultratrakturális, sejtenyészetekben végzett funkcionális *ex vivo* és *in vitro* vizsgálatainkat (164, 166, 169, 170, 190).

5.2. Anyag és Módszer

Normál/reaktív szövetminták. Normál morfológiájú, formalinban rögzített, paraffinba ágyazott 3-3 reaktív nyirokcsomó, tonsilla, lép, vékonybél mucosa asszociált lymphoid szövet (MALT), valamint normál morfológiát mutató 2-2 máj, szív és agyszövet blokkjai a Szegedi Tudományegyetem Patológiai Intézet archivumából származtak. Öt emberi tonsilla és 3 lép, ill. 2-2 patkány szív és agyszövetből friss fagyasztott metszeteket is vizsgáltunk, ill. belőlük teljes mRNS-t is izoláltunk (*lásd a 3. Módszer fejezetben*).

A Cx43 csatornák felülregulációja antigén-inger hatására. Hat db 8 hetes, immunológiailag naív hím C57BL/6J egér jobb hátsó lábának talp bőre alá (i.d.) antigénként 100 µl fiziológiás sóoldatban oldott 50 µg csirke tojásfehérjéből izolált lizozimot (Sigma) injektáltunk. Öt nap után 3 állatot feláldoztunk és térdhajlati (poplitealis) nyirokcsomóikat eltávolítottuk, belőlük friss-fagyasztott metszeteket készítettünk. A maradék 3 állatot az elsővel azonos módon, ismételt antigén-ingernek

tettük ki, majd újabb 5 eltelt nap után térdhajlati nyirokcsomóikat a fentihez hasonlóan feldolgoztuk. Kontrollként, azonos kísérleti protokoll szerint az állatok ellenoldali talpába fiziológiás sóoldatok injektáltunk. Immunfluoreszcens reakciókban nyúl anti-Cx43 IgG (HJ, specificitás: Cx43 C terminális, aa131-142 régiója) (164-166, 169, 170, 190) és anti-CD3 (ϵ -lánc specifikus) IgG antitesteket használtunk.

Az elektronmikroszkópos vizsgálatokat a csíracentrumokat tartalmazó emberi tonsilla blokkok ultravékony metszetein a 3. *Módszer fejezetben* leírtak szerint végeztük.

In situ hibridizáció. Emberi tonsilla adhézíós tárgylemezre felvett 10 μ m vastag friss-fagyasztott metszeteit 10%-os formalinnal rögzítettük, majd proteináz K-val emésztettük 6-8 percig, formalinnal 10 percig utórögzítettük, 0,25 %-os ecetsavanhidriddel és 0,1 M-os triethanolaminnal kezeltük, végül dehidráltuk és szárítottuk 20 percig (170). A Cx43 mRNS expresszió szöveti kimutatásának lépései megegyeztek a Northern blot módszerrel leírtakkal (3. *Módszer fejezet*), kivéve, hogy a próbát 0.5 pg/ml koncentrációban az alkalikus foszfatáz jelölt anti-digoxigenin Ig-t pedig 1:2000-es hígításban alkalmaztuk. A negatív kontroll szenz-Cx43 RNS próbát a 3. *Módszer fejezet* szerint készítettük, mellyel sem tonsilla, sem szívizom metszeteken nem kaptunk reakciót.

FDC-B-sejt tenyészet. Sebészileg eltávolított friss tonsilla szöveteket feldaraboltuk, majd 200 U/ml kollagenáz IV-et (Worthington, Freedold, NJ) és 10 U/ml DNáz (Boehringer) és 90 μ g gentamicint tartalmazó IMDM médiumban emésztettük (170). A felülúszót 1,5%, 2,5% és 5%-os BSA rétegeket tartalmazó grádiensen ülepítettük, majd a 2.5% és 5 %-os réteg közötti alacsony denzitású sejtfrakciót Pervoll grádiensre (Pharmacia, Uppsalla, Svédország) gyűjtöttük. Ebben az ~1060 mg/ml sűrűségű frakcióban feldúsultak az FDC és az aktivált B sejtek, néhány T-sejt kíséretében (208). Fedőlemezenként $2-4 \times 10^5$ sejtet gentamicint és FCS-t tartalmazó IMDM médiumban 24 órán át tenyésztettünk és vizsgáltunk 0, 2, 4, 6, 10, 16 és 24 óra után.

A Cx43 gap junction csatornák blokkolása Gap27 connexin mimetikus peptiddel. Előtesztelés után a Gap27 connexin mimetikus peptidet (G1794; Sigma-Aldrich), mely a Cx43 fehérje 2. extracelluláris doménjének aa204–214 szekvenciájával azonos SRPTEKTIFII régiónak felel meg, 200 μ M-os koncentrációban adtuk a fedőlemezekre tenyésztett $2-4 \times 10^5$ FDC-B-sejthez (190). A kezelés során a sejtek immunfenotípusát, az össz-sejtszámot és a sejtcsoportok átlagos sejtszámát határoztuk meg 2, 4, 6, 12, 16, és

24 h után legalább 3 párhuzamos tenyészet mintánként legalább 3 területén, melyek minimum 300 sejtet foglaltak magukba. Kontrollként 100 µg BSA-val (kezeletlen), ill. fals peptid szekvenciával (TFEPDRISITK) végzett kezelést is végeztünk. A fedőlemezen növesztett tenyészeteket vagy immunfestettük (*lásd lent*), vagy 7AAD-val magfestettük, majd 10%-os neutrális formalinnal utórögzítettük, végül vizes közegből lefedtük.

Folikuláris lymphoma szövetminták. A Semmelweis Egyetem I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetének anyagából 35 kezeletlen follikuláris lymphomás beteg nyirokcsomó és ebből 20 beteg csontvelő biopsziás mintáinak duplikátumait tartalmazó TMA metszeteket vizsgáltunk. A felállított FL diagnózisok a WHO (World Health Organization) klasszifikáció kritériumai szerint készültek (197). A klinikopatológiai adatokat az **5. táblázat** foglalja össze. A csontvelő mintavétel az FL primer diagnózisát követő 2 héten belül történt. Normál kontrollként 3 reaktív nyirokcsomó szolgált.

5. táblázat. A tanulmányozott follikuláris lymphomák klinikopatológiai jellemzői

		Csontvelő érintettség		Összesen
		Igen	Nem	
Neme	Nő	12 (60%)	9 (60%)	21(60%)
	Férfi	8 (40%)	6 (40%)	14(40%)
Életkor diagnóziskor	Medián	48.65	49.67	49.16
	Tartomány	26-82	33-74	26-82
	1	1 (5%)	3 (20%)	5 (12.5%)
Grade	2	16 (80%)	6 (40%)	24 (60%)
	3	3 (15%)	6 (40%)	11 (27.5%)
Szövettani típus	Folikuláris	20 (100%)	12 (85%)	32 (92.5%)
	Diffúz	0 (0%)	3 (15%)	3 (7.5%)
	Alacsony	2	9	11
FLIPI	Közepes	12	5	17
	Magas	6	1	7
	Teljes remisszió	5	13	18
Kezelésre adott válasz	Részleges remisszió	13	2	15
	Nincs válasz	2	0	2

FLIPI: „Follicular Lymphoma International Prognostic Index”

Az immunreakciók értékelése empirikus skálán és automatizált képanalízissel. Az FDC-B-sejt tenyészetekben meghatároztuk a sejtcsoportok átlagos sejtszámát, a sejtek túlélését jelző össz-sejtszámot, és a Ki67 pozitív proliferációs sejtfrakciót 3-5 reprezentatív 40x-es nagyítású felvételen, minden mintában időpontonként 3 párhuzamos mintát vizsgálva. Reprezentatív CD10 pozitív FL területeken két szakértő (RH és KT)

egy négy-osztatú skálán egymástól függetlenül értékelte a Cx43, CD21, CD23, and Ki67 pozitív tumorsejtek/-területek %-os arányát (osztályzatok: 0 <10%; 1=10-25%; 2=26-50%; míg 3 > 50% pozitivitás). Továbbá meghatároztuk a Cx43, ill. Ki67 pozitív területek arányát is HistoQuant képanalízis programmal a CD10⁺/CD21^{+/magas}, ill. a CD10⁺/CD21^{-/alacsony} nyirokcsomó és csontvelői FL területeken.

Statisztika. Spearman-féle rank analízist alkalmaztuk a markerek szintje közötti korreláció feltárására. A biomarker (CD21 és Cx43) szintek közötti eltérések statisztikai jelentőségét a vizsgált csoportok között az alacsony/negatív (0-1), illetve, magas (2-3) csoportok szétválasztása után a Fisher-exact teszttel vizsgáltuk. Wilcoxon-féle párosított non-parametrikus tesztet alkalmaztunk FDC-B-sejt kultúrában mért %-os sejtfrakciók és a kezelések közötti összefüggések, valamint a Cx43 és Ki67 szintek CD10⁺/CD21^{+/magas}, illetve a CD10⁺/CD21^{-/alacsony} területeken mért eltéréseinek elemzésére.

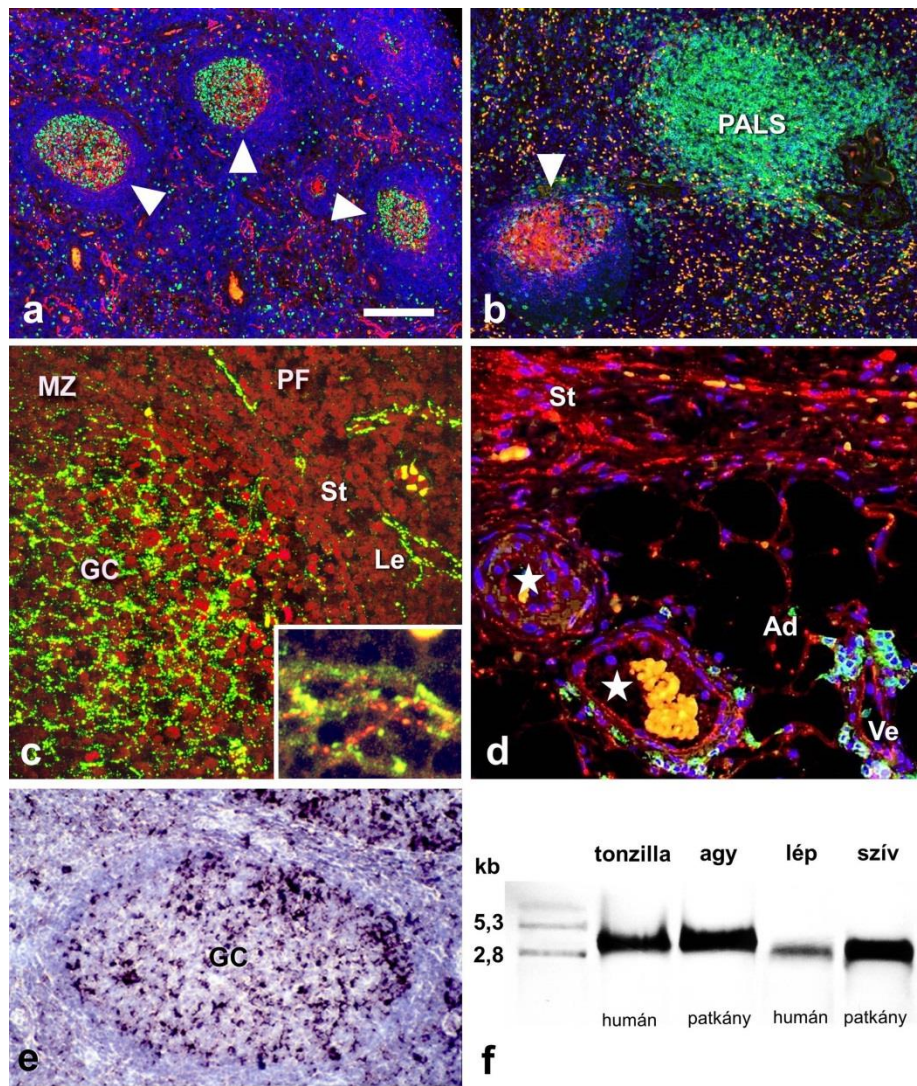
5.3. Eredmények

Connexinek perifériás humán nyirokszövetekben

Perifériás emberi nyirokszövetekben csak Cx43 fehérjét tudtunk mind mono-, mind poliklonális antitestekkel kimutatni (5. ábra); Cx26, ill., Cx32 jelenléte nem volt igazolható. A Cx43 expressziót mRNS szinten Northern blot módszerrel és *in situ* hibridizációval is validáltuk.

A Cx43 reakciót legnagyobb denzitásban a vizsgált nyirokszövetek (nyirokcsomó, tonsilla, lép és MALT) másodlagos nyiroktüszőinek csíracentrumaiban és nyirokereinek endothel sejteiben, kisebb mennyiségben B-sejtekben (ritkán T-sejtekben), stromasejtekben, adipocytákban, simaizom sejtekben, valamint arteriola, kapilláris és venula endothel sejtekben találtunk (5. ábra).

Kettős immunfluoreszcenciával igazoltuk, hogy a csíracentrumon belül a Cx43 plakkok eloszlása excentrikus, párhuzamos jelölést ad a CD21 és CD35 pozitív FDC hálózattal. Szignifikánsan kevesebb Cx43 és FDC volt kimutatható a csíracentrum proliferációs (sötét) zónájában, mint a világos zónában (6a-b. ábra). A világos zónában a Cx43 reakció kolokalizációját igazoltuk az FDC CD21 (C3d) ill. CD35 (C3b) komplement receptoraival, valamint az FDC hálózat szerveződésében fontos Ca²⁺-függő adhéziót közvetítő desmosomák desmoglein és desmoplakin fehérjéivel (6c-d. ábra). Az FDC és a lymphoendothelium „gap junction” plakkok átlag mérete 0,51 µm (±0,14 SD; n=27) volt, ami a fele a kontroll szívben mért 1,05 µm (±0,35 SD; n=25), májban mért 1,13 µm

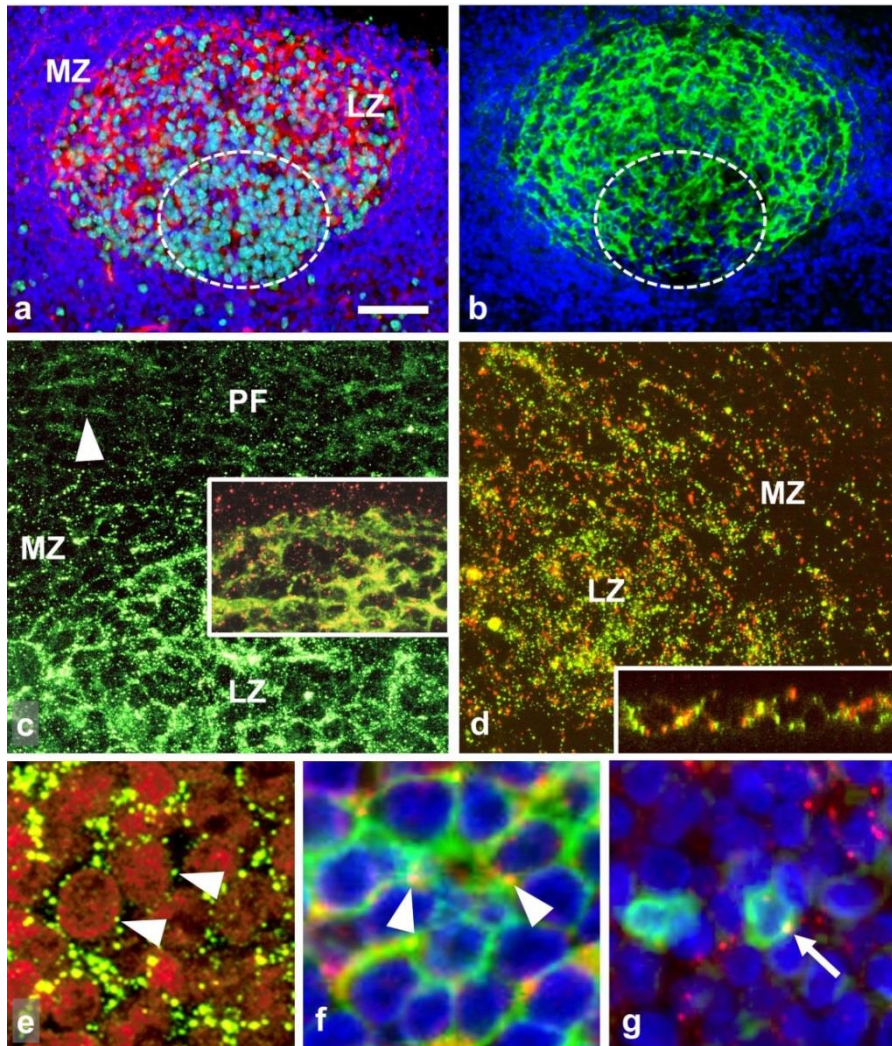


5. ábra. Cx43 expresszió igazolása fehérje szinten immunfluoreszcens módszerrel poliklonális (piros: a, b és d) és monoklonális (zöld:c) antitestekkel, ill. mRNA szinten (e-f) perifériás nyirokszervekben. Erős Cx43 reakció elsősorban a másodlagos nyiroktüszőkben mutatható ki (a-b, nyílhegyek). Nyirokcsomóban (a) a proliferáló B sejteket Ki67 (nyílak, zöld), lépben (b és d) a T lymphocytákat CD3 reakcióval (zöld) azonosítottuk (PALS: periarterioláris lymphoid lemez). Reaktív tonsillában (c) sűrű pontszerű Cx43 reakció a csíracentrumban (GC) és a nyirok-kapillárisok endothel sejtjeiben (Le), míg elszórt pozitívitas a köpenyzónában (MZ) és a perifollikuláris T-sejt régióban (PF) látszik (betéti kép: von Willebrand faktor - zöld, Cx43 - piros). Lép (d) tok alatti stromasejt hálózata (St), adipocytái (Ad), valamint kapilláris (csillagok) és venula (Ve) endothel sejtjei, ugyancsak Cx43 pozitívak. Cx43 mRNA *in situ* hibridizációval a fehérjéhez hasonló lokalizációban, főleg a csíracentrumban (GC) látszik (e). Northern blot analízis ugyancsak igazolja a Cx43 mRNA expressziót tonsillában és lépben, kontroll agy és szív izolátumok mellett (f). Méretvonal az (a) ábrán, a-b:150 μ m; c-d:40 μ m (betét:15 μ m); e:70 μ m.

$\pm 0,28$ SD; n=22), vagy a simaizomban mért 0,98 μ m ($\pm 0,12$ SD; n=20) értéknek.

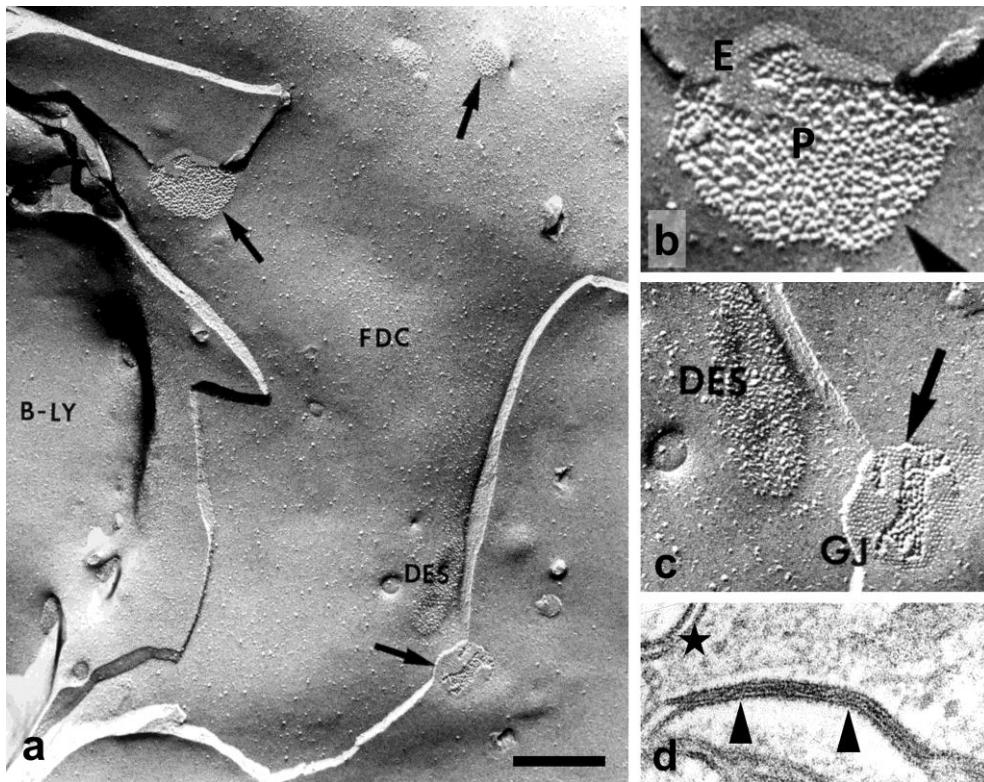
Jelentős Cx43 pozitívitas volt a köpenyzóna FDC nyúlványain, ami fokozatosan csökkent a perifollikuláris T-sejt gazdag régióban, ahol fibroblasztos retikulumsejteknek megfelelő sejtnyúlványok mentén és elszórtan is látszottak Cx43 jelek. A lymphoid szinuszok endotheljének Cx43 pozitívítása arányos volt a szinuszok gyulladásos sejt tartalmával. A csíracentrumban a Cx43 plakkok, miként az FDC nyúlványok, szorosan határolták a lymphocytákat. Erős nagyítással konfokális felvételeken a Cx43 plakkok a

világos zónában B lymphocyták sejthatárán is ill., néhol CD4 pozitív T sejteken is igazolhatóak voltak (6e-g. ábra).



6. ábra. Cx43 fehérje immunfluoreszcens kimutatása reaktív nyirokcsomó (a, b, e-g) és tonsilla (c-d) csíracentrumaiban poliklonális (a, f és g), ill. monoklonális (c, d és e) antitestekkel. A Cx43 reakció (a, piros) a csíracentrum világos zónájára (LZ) koncentrálnak és ritkább a proliferáló (Ki67, zöld) lymphoblastokkal zsúfolt sötét zónában (bekarikázott terület); hasonlóan a CD21 pozitív FDC hálózathoz (b, zöld). A pontszerű Cx43 reakció (zöld) a világos zónában (LZ) a köpenyzónában (MZ) és a perifollikuláris régióban (PF, nyílhegy) is elsősorban sejtnyúlványok mentén látszik (c és d). A világos zónában szoros kolokalizációt mutat az FDC hálózattal (c, betéti kép: Cx43 piros, CD21 zöld), ill. az FDC nyúlványok desmoplakin fehérjéjével (d; betéti kép: virtuális keresztmetszet). A Cx43 plakkok szoros kapcsolata csíracentrum B lymphocytákkal (e-f, nyílhegyek; f: Cx43 piros, CD20 zöld). Cx43 reakció (piros) egy perifollikuláris CD4 pozitív T sejt membránján (g, nyíl). Méretvonal az (a) ábrán, a-b: 50 µm; c-d: 15 µm (betét: 10 µm); e-f: 8 µm; g: 10 µm

Fagyasztva töréssel készült elektronmikroszkópos replikán 200-400 nm átmérőjű „gap junction” csatorna aggregátumokat mutattunk ki demosomális plakkok közelében FDC sejtmembránban (7. ábra). A kommunikációs csatornák transzmissziós elektronmikroszkópos megjelenését, ugyancsak igazoltuk „penta/heptalamináris” struktúrák formájában.



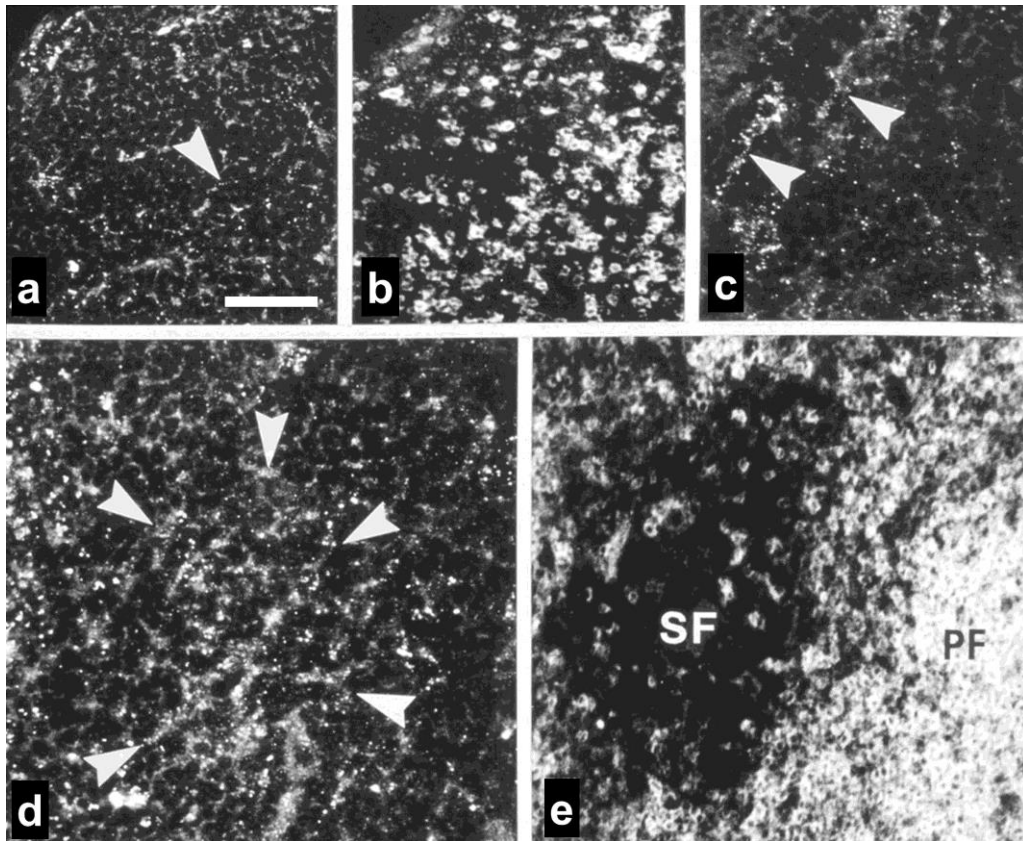
7. ábra. Gap junction csatornák ultrastrukturális igazolása tonsilla csíracentrum világos zónájában. Connexin csatorna aggregátumok (nyilak) egy FDC sejt membránjában (a). Erősebb nagyítással, a fagyasztva töréssel replika citoplazma oldali (P) felületén rendezett connexon csatornák halmaza, az extracelluláris membrán oldalon (E) pedig a csatornanyílásoknak megfelelő behúzódások látszanak (b), ill., az FDC-t jellemző desmosomális (DES) plakk és a 200-400 nm átmérőjű gap junction csatorna aggregátumok (GJ) egymáshoz közeli lokalizációja (c). Transzmissziós elektronmikroszkópiával a „gap junction” plakknak megfelelő szoros membránhatárok („close membrane apposition”) (nyílhegyek), a normál membrántávolság (csillag) mellett. B-LY: potenciális B lymphocyt. Méretvonal az (a) ábrán, a: 300 nm; b és d: 100 nm c: 200 nm.

A Cx43 csatornák felülregulációja antigén-inger határása

Immunológiailag naív egerek térdhajlati nyirokcsomóit vizsgáltuk a talpbőrükbe injektált 50 µg lizozim antigén beadása után. Kontroll állatokban, fiziológiás sóoldat adását követően 5 nappal nyiroktüszőket nem láttunk, a CD3 pozitív T lymphocyták egyenletesen elszórt eloszlást mutattak (**8. ábra**). Ugyanekkor a lizozimmal injektált állatokban Cx43 pozitív nyúlványos sejtek jelentek. Ismételt antigén-inger után újabb 5 nappal szabályos FDC hálózattal bélelt csíracentrumok fejlődtek ki, bennük nagy mennyiségű Cx43 csatornával.

Cx43 expresszió FDC-B-sejt tenyészetben

A reaktív tonsillából izolált alacsony denzitású sejtfrakció tenyészetéből „*ex vivo*” csíracentrumoknak megfelelő, aktivált B sejtekből és FDC hálózattal álló sejtcsoportok fejlődtek ki, melyek progresszív mértékben Cx43 csatornákat képeztek (**9. ábra**). Korai (2-4 órás) tenyészetekben az FDC 20-40 µm-es nyúlványokkal érte el és fogta közre a B-

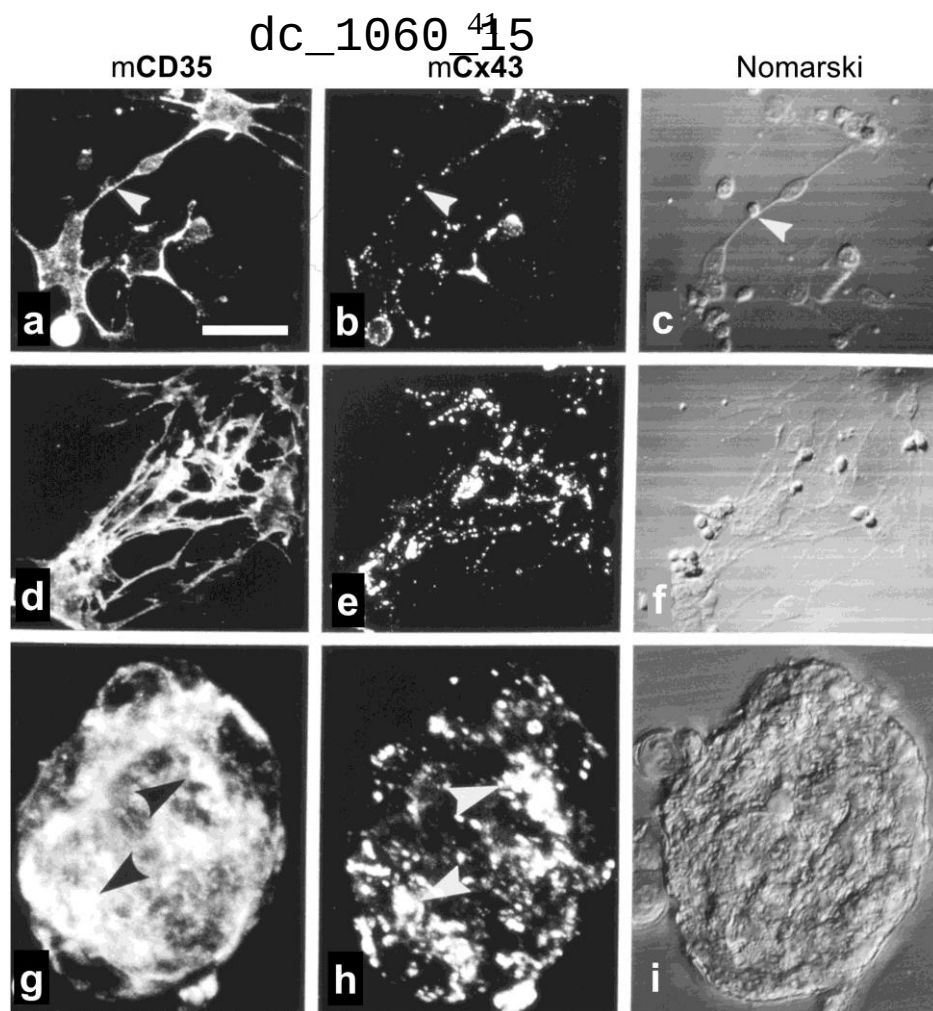


8. ábra. Cx43 kifejeződés egér nyirokcsomó kortikális régiójában ismételt antigén-inger hatására. Immunológiailag naív egér talpbőrébe szubkután injektált fiziológiás sóoldat hatására 5 nap után csupán random Cx43 reakció látszik (a, nyílhegy), nyiroktüszők nélkül (b: elszórt CD3+ T sejtek), míg lizozim antigén nyúlványos sejtek megjelenését indukálta rajtuk potszerű Cx43 reakcióval (c, nyílhegyek). Ismételt antigén-inger határása másodlagos nyiroktüszők formálódnak (SF) bennük FDC hálózat, sűrű Cx43 reakcióval (d, nyílhegyekkel határolt terület), ahol a CD3 pozitív lymphocyta ritkák, míg a határoló perifollikuláris régiót (PF) kitöltik. Méretvonal az (a) ábrán, a, b és e: 50 μ m; c: 30 μ m; d: 40 μ m.

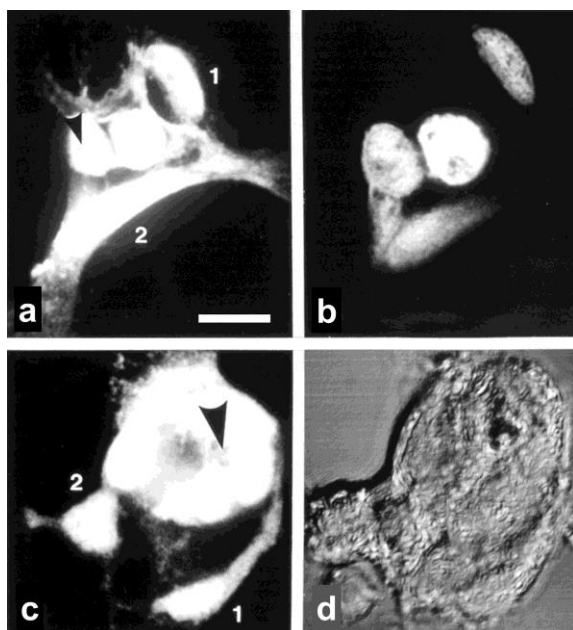
sejteket. Hat órás kultúrában már döntően 5-15 sejtből álló kompakt sejtcsoportok alakultak ki, a sejthatárokon jelentős számú Cx43 csatornával. A sejtcsoportokban egy FDC átlagosan 3-5 lymphocyta burkolt be és fogott össze lemezszerű nyúlványaival. Késői (16-24 órás) tenyészetekben akár 50 sejtet is magában foglaló csoportok formálódtak, melyek 24 óránál tovább, hagyományos tenyésztéssel nem voltak fenntarthatóak.

Funkcionális kommunikáció FDC-FDC, valamint FDC és B-sejtek között

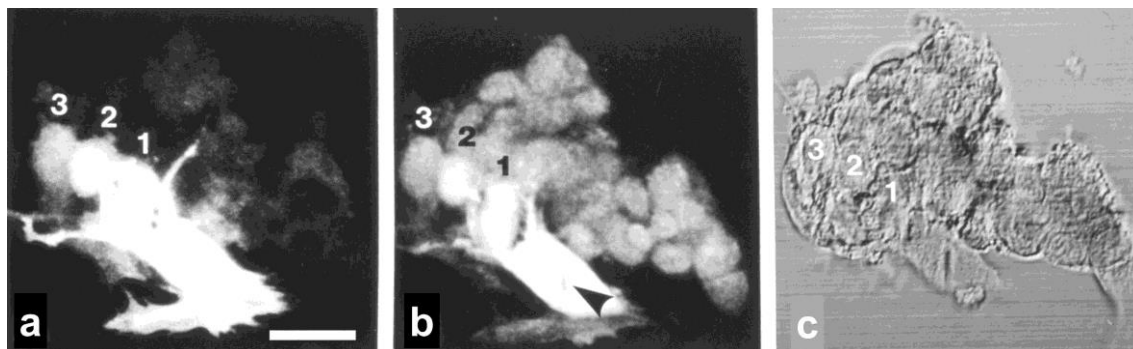
Lucifersárga festéktranszfer módszerrel igazoltuk a homo- és heterocelluláris kommunikációt FDC-B-sejt tenyészetben. Korai 2-4 órás tenyészetben elnyújtott FDC-nek imponáló sejteket injektálva, a fluoreszcens festék gyors terjedését figyeltük meg számos érintkező, ugyancsak FDC morfológiájú sejtbe (**10. ábra**). Hat óra után a festék néhány, a csoportba tartozó CD19 pozitív B lymphocyta is átjutott (**11. ábra**).



9. ábra. Az FDC marker CD35 és Cx43 fehérjék szimultán immunfluoreszcens jelölése FDC-B-sejt tenyészetben. A sejtmorfológiát differenciál interferencia kontraszt (Nomarski) kép mutatja. 2-órás tenyészetben (a-c) Cx43 csatornákat hordozó FDC sejtnyúlványok érik el a B-sejteket, ahol csatornafehérje az FDC és B-sejt között is látszik (nyílhegy). 4 óra után (d-f), még kiterjedt Cx43 pozitív FDC nyúlványokkal közrefogott B sejtek (d-f), de a legtöbb sejt már néhány FDC által beburkolt 5-15 B-sejtből álló klaszter, a sejthatárokon partikuláris Cx43 pozitivitással (g-h, nyílhegyek). Méretvonal az (a) ábrán, a-f: 30 μ m; g-i: 10 μ m.



10. ábra. Lucifersárga festéktranszfer 4 órás FDC-B-sejt kultúrában. A behatoló kapilláris helyét nyílhegyek jelölik (a és c). Korai tenyészetben, laza kapcsolatban álló sejtek csoportjában egyedi sejtekbe juttatott festék megjelent a szomszédos FDC morfológiájú sejtekben (1 és 2) is. A (b) ábra mélyebb optikai síkban az (a) sejtcsoport elkülönülő sejtmagjait, a (d) ábra pedig a (c) sejtcsoport differenciál interferencia kontraszt képét mutatja. Méretvonal a-d: 10 μ m.



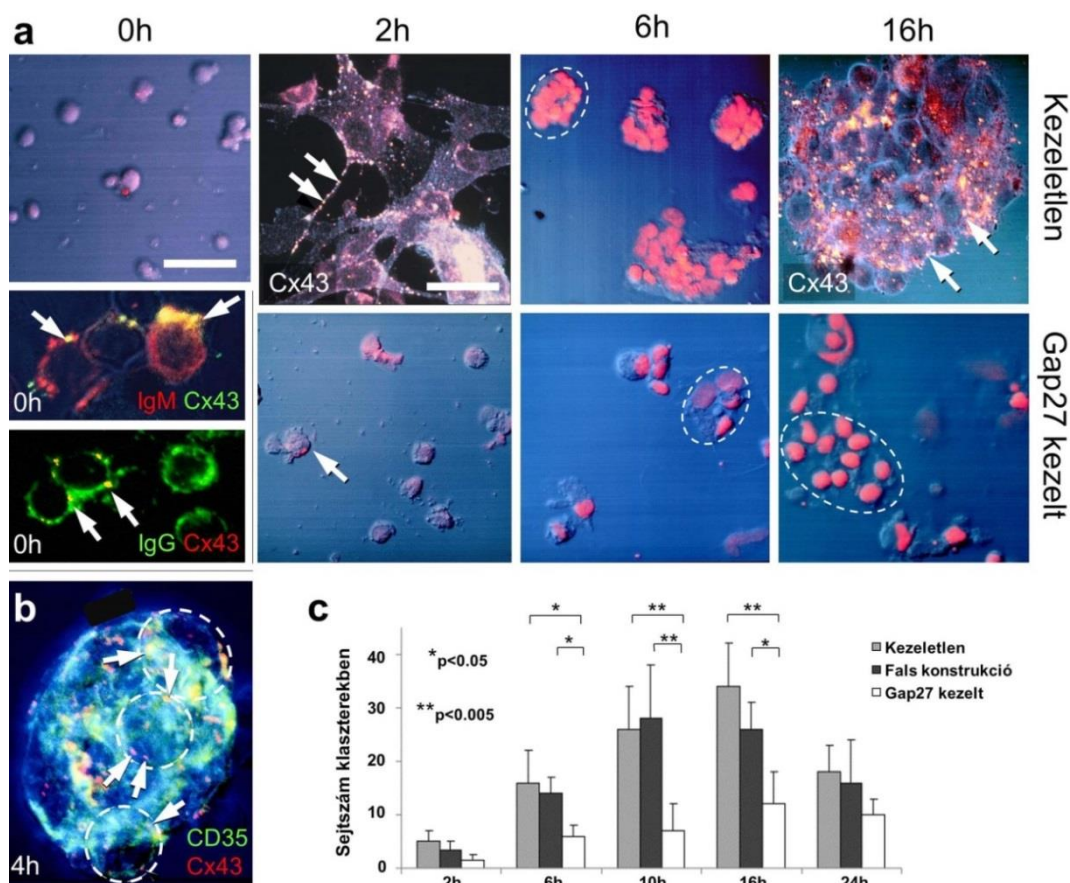
11. ábra. Lucifersárga festéktranszfer (a) CD19 immunfluoreszcencia (b) és differenciál interferencia kontraszt kép (c) egy 6 órás FDC-B-sejt csoportban. A csoporttól részben különálló FDC morfológiájú sejtbe juttatott festék (b; a behatolás helyét nyílhegy jelöli), legalább 3 ovális sejtbe jutott át (1, 2 és 3) a klaszteren belül (a). Mindhárom sejt CD19 pozitív (rodamin jelölés) B lymphocytának bizonyult (b), és a kompakt klaszter része volt (c). Az injektált festék (a) átűt a rodamin szűrőn is (b). Méretvonal a-c:12 μ m.

A Cx43 csatornák gátlása FDC-B-sejt tenyészetben

Vizsgáltuk a Cx43 második extracelluláris szakaszának megfelelő Gap27 connexin mimetikus peptiddel történő kezelés hatását a formálódó FDC-B-sejt klaszterek fejlődésére. Az eredményeket a **12. ábra** foglalja össze. Frissen, tonsillából izolált alacsony denzitású sejtekben IgM, ill. IgG pozitivitás mellett Cx43 csatornákat is ki tudtunk mutatni. Néhány sejt CD35 pozitív volt és ritkán CD4+ T sejteket is találtunk. Kezeletlen, ill. fals peptid konstrukcióval kezelt tenyészetekben a korábban leírtak szerint idővel progresszíven növekvő számú sejtet és Cx43 reakciót magába foglaló klaszterek alkultak ki. Gap27 peptiddel kezelt korai (2 órás) tenyészetekben FDC nyúlványok nem formálódtak és később is (6-16 h között) csak abortív sejtcsoportok jöttek létre, amit jelentős számú vakuolizált citoplazmájú és zsugorodott magvú, károsodott sejthalak megjelenése kísért (**12a. ábra**). Az sejtcsoportok átlagos sejtszáma kezelt tenyészetekben szignifikánsan elmaradt a kontroll tenyészetekétől (**12c. ábra**). Ugyancsak szignifikánsan csökkent a területegységre vetített össz-sejtszám is a kezelt tenyészetekben ($p < 0,05$) 6 h, 10 h és 16 h után (**13. ábra**).

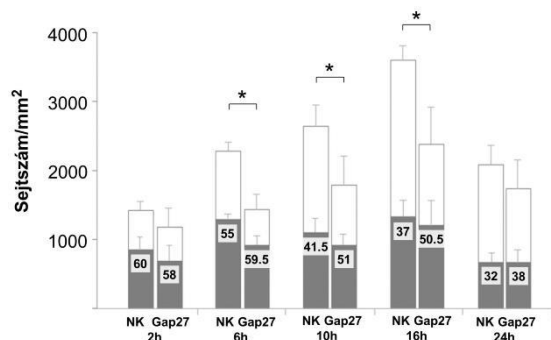
Cx43 expresszió follikuláris lymphomákban

A CD10 pozitív follikuláris lymphomákat szabálytalan formájú, polarizációjukat vesztett follikulusok és gyakran fragmentált FDC hálózat jellemezte (**14a-b. ábra**). A reaktív csíracentrumokhoz hasonlóan a Cx43 pozitivitás szignifikáns kapcsolatot mutatott az FDC hálózattal (**14c-d. ábra**, Spearman-rank korreláció: $\rho = 0.981$, $p < 0,001$), míg a CD10 pozitív, de CD21 negatív tumoros területeken alig volt Cx43 reakció.

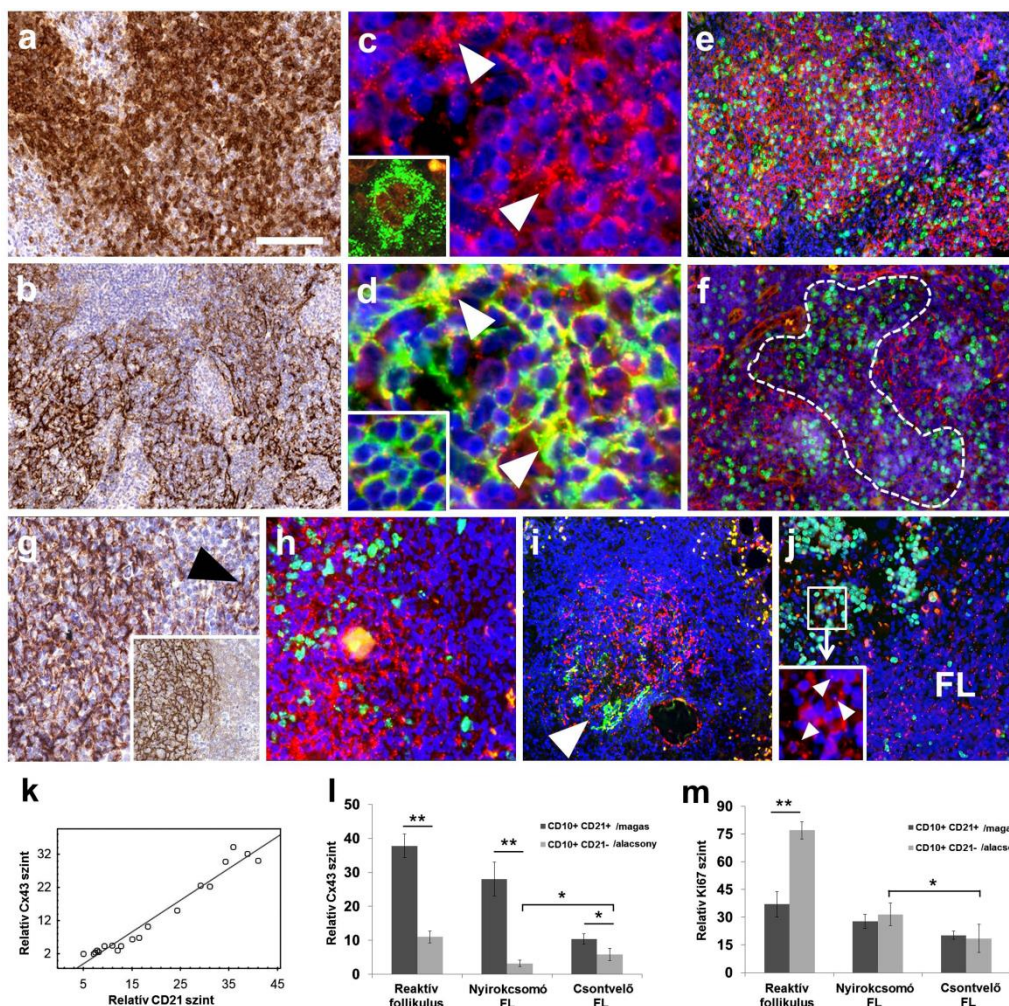


12. ábra. Gap27 connexin mimetikus peptid-kezelés hatása FDC-B-sejt tenyészetekre. a) A tenyésztés kezdetén (0h) néhány elszórt ovális sejt együttes Cx43, ill. IgG, vagy IgM expressziót mutat (nyilak). Kezeletlen 2-órás tenyészetben Cx43 pozitív nyúlványos FDC sejtek behálózzák az ovális B-sejteket. 6 óra után 10-15 FDC és B-sejtből álló klaszterek jönnek létre, melyek 16 órás tenyészetben közel 50 sejtől is állhatnak, jelentős számú Cx43 csatornát formálva a sejthatárokon. Gap27 connexin mimetikus peptid kezelés után már 2 órával az FDC-B sejt kapcsolatok és a sejtsoportok kialakulása is jelentősen károsodik, számos vakuolizált citoplazmájú, zsugorodott magvú sejthalak megjelenésével. b) Egészséges 4 órás sejtsoportban a CD35 (zöld) és a Cx43 (piros) kolokalizációja (ságra, nyilak) igazolható a sejthatárokon. Immunfluoreszcencia és differenciál interferencia kontraszt kombinációja, magfestés: 7AAD (a). c) A sejtsoportok átlagos sejtszáma kezelt tenyészetekben szignifikánsan alacsonyabb (* $p < 0.05$; ** $p < 0.005$), mint a fals konstrukcióval kezelt, vagy a kezeletlen tenyészetekben. Méretvonal az (a) ábrán, 0-16h: 50 μm (2 és 16 h fent: 30 μm); 0h kettős jelölés: 15 μm ; b: 10 μm .

A csatornafehérje erős felülregulációja látszott bi- ill., multinukleáris, abortív nyúlványokat hordozó FDC alakokban. A tumorsejt proliferáció nem tért el jelentősen a Cx43/FDC gazdag, ill. Cx43/FDC szegény területeken (**14e-f. ábra**). Csontvelőben a legtöbb Cx43 a CD21/NGFR pozitív tumoros follikulusokban látszott, ahol a Cx43 szint alacsonyabb és az FDC hálózat is fragmentáltabb volt, mint nyirokcsomó FL follikulusaiban (**14g-i. ábra**). Ugyanakkor az FDC-mentes csontvelői FL infiltrátumban a Cx43 szint magasabb volt, mint a hasonló, diffúz nyirokcsomói FL területeken a Ki67 pozitív sejtfrakció pedig ezzel ellentétes összefüggést mutatott (**14j. és l-m. ábrák**). Csontvelői FL-ben az FDC hálózattal folytonos stromasejt hálózat is NGFR pozitív volt.



13. ábra. A sejtproliferáció (szürke oszlopok), a proliferáló sejtfrakció (%-ok a szürke oszlopokban) és a túlélést jellemző össz-sejtszám (szürke és fehér oszlopok együtt) FDC-B sejt tenyészetben connexin mimetikus peptid-kezelés után. Az abszolút sejtszám szignifikánsan csökkent (* $p < 0,05$) 6h, 12h és 16h kezelés után, míg a proliferáló sejtfrakció nem-szignifikánsan emelkedési ($p_{6h} = 0,423$; $p_{10h} = 0,186$; $p_{16h} = 0,067$).



14. ábra. Cx43 fehérje kifejeződés follikuláris lymphomában (FL); nyirokcsomói (a-f), ill., csontvelői lokalizációban (g-j). Nagy, szabálytalan follikulusok CD10 pozitív FL B-sejtekkel (a) és fragmentált CD21 pozitív FDC hálózattal (b). Cx43 (c: piros) és CD21 (d: zöld) kolokalizációja (sárga; nyílhegyek) az FL follikulusban (d). Betéti kép (c): kétmagvú, nyúlvány nélküli FDC, benne felülregulált Cx43 (zöld). Proliferáló FL frakció (Ki67, zöld) denz FDC/Cx43 reakció (e: piros), ill. fragmentált FDC/Cx43 (f: a bekerikázott terület) reakció (piros) mellett. Csontvelői FL-ben az NGFR (g), ill., CD21 (inset) pozitív follikulusok (g, nyílhegy: NGFR pozitív csontvelői stromasejtek) hordozzák a legtöbb Cx43 pozitívást (h: piros) és proliferáló tumor sejtet (Ki67, zöld). Ritkán erős Cx43 reakció fragmentált CD21 pozitívítás (zöld) mellett is előfordult (i). Szignifikánsan több Cx43 (piros) és kevesebb Ki67 pozitív sejt (zöld) látszik a csontvelői FL infiltrátumban, mint a nem-tumoros csontvelői részben (j). A bekeretezett területen a nyílhegyek a Cx43 reakciót jelzik. A diagramok a Cx43 és CD21 expresszió lineáris összefüggését mutatják FL-ben (k); valamint a Cx43 (l), ill., Ki67 kifejeződés különbségét FDC gazdag, ill. FDC szegény területeken. Immunoperoxidáz (a, b és g), immunfluoreszcens (c-f és h-j) reakciók. Szignifikancia: $p < 0,05$; $*p < 0,005$. Méretvonal a (a) ábrán, a-b és i:150 μm ; c-d:30 μm (inset:15 μm); e-g és j:120 μm ; h:100 μm .

A Cx43 expresszió szoros összefüggést mutatott az FDC hálózattal, mind reaktív follikulusokban mind FL-ben (**14k-l ábra**). A Ki67 pozitív sejtfrakció csak a reaktív follikulusokban volt szignifikánsan magasabb a CD10+ FDC szegény régiókban (**14m ábra**). Nyirokcsomói FL-ben nem találtunk szignifikáns összefüggést sem a Cx43 expresszió és a csontvelői érintettség ($p_{Cx43}=0,699$), vagy a tumor grade ($p_{Cx43}=0,651$) között; sem az FDC mennyisége és a tumor grade között ($p_{CD21}=0,449$; $p_{CD23}=0,112$).

5.4. Megbeszélés

Elsőként bizonyítottuk a Cx43 „gap junction” csatornák jelenlétét másodlagos nyirokszervekben (lép, nyirokcsomó, tonsilla palatina és MALT). Immunológiai szempontból a FDC hálózaton belüli, valamint az FDC és B sejtek közötti funkcionális direkt sejt-sejt kommunikáció a legfontosabb megfigyelésünk. A T-sejtfüggő immunválasz során a memória és effektor B-sejtek a másodlagos nyiroktüszőkben az FDC mikrokörnyezetében fejlődnek (209, 210). Az FDC háromdimenziós hálózatot képez a tüsző csíracentrumában, mely komplement és immunglobulin Fc-receptorokon keresztül antigént köt és prezentál, valamint adhéziós membrán receptorokat is képez (ICAM-1 és VCAM-1), melyek fontos szerepet játszanak a nagy affinitású B-sejtek apoptózisból való kimenekítésében (208, 211, 212). A B-sejt aktiválás alapfeltétele az antigén-inger és az antigénspecifikus T-helper sejtek támogatása (187, 213, 214). Ismételt antigén-aktiválásra a B-sejtek proliferálnak és az FDC környezetébe vándorolva indukálják annak fejlődését (191). Állatkísérletünkben a dinamikus növekvő FDC hálózaton emelkedő Cx43 fehérjeszint felvetette a kommunikációs csatornák szerepét az FDC és a csíracentrum fejlődésében (170), amit connexin-mimetikus peptiddel végzett blokkolási kísérleteink igazoltak is (190). Ezzel összhangban, a nyirokcsomók és follikulusok fejlődését alapvetően szabályozó CXCL13 kemokin indukálható A-vitaminból származó retinolsavval, ami a Cx43 csatornák képződésének és működésének is ismert promótere (215-217). A desmosomák és a Cx43 gap junction csatornák ultrastrukturális közelsége és immunfluoreszcens kolokalizációja az FDC membránokban, hasonlóan az többrétegű laphámhoz, az erős, Ca^{2+} -függő sejtadhézió szerepét támasztja alá ott, ahol a kommunikációs csatornák nagy sűrűségben keletkeznek (218).

Aktivált B sejtekben a szomatikus hipermutációk számos eltérő specificitású B-sejt klónt hoznak létre, melyek közül az FDC által bemutatott antigénhez receptorukkal kapcsolódni képes legnagyobb affinitásúak túlélésre szelektálódnak, míg a többi

apoptózissal elpusztul (219). A túlélő B-sejtekben a DNS fragmentáló endonukleázok gátlódnak, ami gyorsan, <4 óra alatt lejátszódik (220). A túlélési szignálok pontos természete még ma sem teljesen tisztázott. Az endonukleázok blokkolásában Zn^{2+} ionok részt vesznek, azt támogatják az FDC által termelt BAFF, IL-6 és IL-15 citokinek (192, 194, 195), de a sejtfelszíni B-sejt receptorok, vagy az LFA-1, VLA-4, CD21, CD22, ill. CD40 keresztükötése az endonukleázok aktivitását csak késleltetni képes, meggátolni nem és a gátlásban a T-sejt citokinek közvetlen szerepét sem igazolták (220, 221). Nagy számban mutattunk ki homo- és heterocelluláris funkcionáló Cx43 csatornákat ebben a lokalizációban, melyek fél-életideje <2 óra (222), tehát dinamikus keletkezhetnek a kimenekítési folyamat ~4 órás időintervallumában. Így az FDC connexin csatornái közvetíthetnek közvetlen B-sejt szelekciós szignálokat, ami azonban további bizonyításra szorul.

A B-sejtek szelekcióját izotípus váltásuk, klonális expanziójuk, majd antitesttermelő plazmasejttekké, vagy memóriasejttekké érésük követi a csíracentrum világos zónájában (223). Ezekben a folyamatokban a CD57+ follikuláris helper T-sejt citokinek (55, 209, 210), így az IL-2 (224), IL-4 (225), IL-5 (226), IL-6 (227), IL-10 (228), IFN- γ (229) és TGF- β (230), valamint a közvetlen antigénreceptor-antigén, CD40/D40L és CD28/CD80 T/B-sejt interakciók játszanak szerepet (187). Mivel a funkcionálisan összekapcsolt FDC mind a B-, mind a T-sejtekkel, melyek maguk is formálnak Cx43 csatornákat (7, 170), szoros kapcsolatot tart fenn (223), az így kialakuló kommunikációs hálózat részt vehet szignálok rendszerszintű közvetítésében a világos zóna B-sejtek és a viszonylag kisszámú follikuláris T-sejt között. Ezt támogatja, hogy az aktivált lymphocyták közvetlenül befolyásolják az FDC hálózat fejlődését (193, 231). Ennek megfelelően, a deformált, illetve károsodott FDC hálózat follikuláris lymphomában a malignus B-sejtek FDC támogató hatásának hiányát is jelzi (197, 232). Ilyen hatással lehetnek például a B-sejtek és FDC közötti CXCL13/CXCR5; TNF- α /receptor, lymphotoxin (LT) α /receptor és LT β /receptor interakciók; illetve a T-sejtek és FDC közötti CXCR4/CXCL12 kölcsönhatások, a mindkét viszonylatban fennálló LFA-1/ICAM1, VLA4-VCAM1, ill. IL6R/IL6 kölcsönhatások (233-235). Potenciális hírvivőként az FDC hálózaton belül és FDC-B-sejtek között is a cAMP szerepe merülhet fel, ami közlekedik „gap junction” csatornákon és a Cx43 fehérjetermelés és csatornafunkciók pozitív szabályozója (10, 236). A cAMP nagy koncentrációban lokalizálható a csíracentrum világos zónájára (237), proliferáció-gátló hatást közvetít granulosejtekből petesejtekbe connexin csatornákon keresztül (100, 238), apoptózist indukál nyugvó B sejtekben, ami aktivált B-

sejtekben IL-4 jelenlétében a felszíni Ig receptorok keresztkötésével kivédhető (239). A magasabbrendű koordináció és ebben connexin csatornák szerepének bizonyítása az immunrendszerben további komplex funkcionális vizsgálatokat igényel.

Az azonos izotpusú (Cx43) csatornák igazolása a csíracentrum és a köpenyzóna FDC, valamint a velük morfológiai folytonosságot mutató stromális sejthálózaton (193), valószínűsíti a nyirokszervek sejtes vázszerkezetének metabolikus, szinciciális kapcsolatát és az FDC rezidens stromasejt eredetét is támogatja (240). A direkt sejt-sejt kommunikáció szerepét a korai morfogenezisben növekedési, és proliferációs kontroll szignálok közvetítésében igazolták (171, 241). A funkcionáló Cx43 csatornák progresszív megjelenése a fejlődő FDC hálózaton antigén-inger hatására felveti szerepüket a follikulusok és a méretüket meghatározó FDC hálózat növekedésének koordinálásban és kontrolljában is.

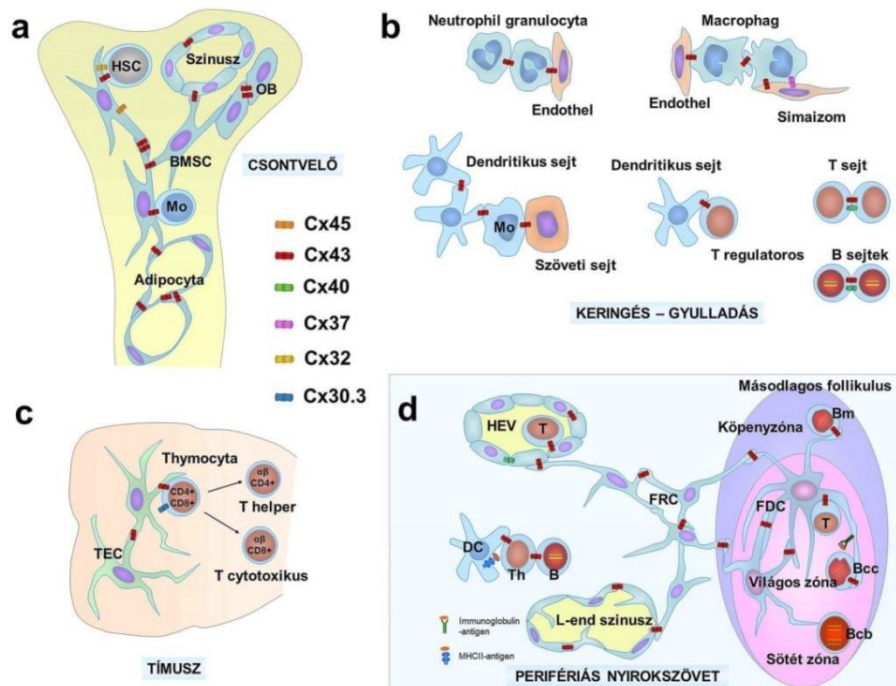
Sejttenyészetben a Cx43 második extracelluláris doménjét utánzó Gap27 peptid korai csatornazárást és a kommunikáció gyors csökkenését eredményezi (242). Mivel az FDC sejtek hosszú nyulványokkal egymással is szoros adhézíós kapcsolatot képeznek, ami Gap27 kezelésre jelentősen károsodik, valószínű, hogy az FDC adhézió is zavart szenved, mert a peptid akadályozza a szomszédos sejtek csatornáinak dokkolását is. Kísérletünkben a Gap27 peptiddel végzett kezelés szignifikánsan gátolta az FDC-B-sejt csoportok kifejlődését és a sejtek túlélését. A reaktív csíracentrumokhoz hasonlóan, az FL szabálytalan follikulusaiban is a Cx43 szint szorosan korrelált a CD21 és CD23 pozitív FDC hálózat denzitásával. Az emelkedett Cx43 szint nyulványok nélküli bi- és multinukleáris FDC sejteken, melyek vagy korai differenciálatlan, vagy abortív sejt-alakoknak felelnek meg, felveti Cx43 szerepét az FDC túlélésében is.

Az FL B-sejtekben a fokozott Bcl-2 termelés megvédi a tumorsejteket az apoptotikus sejtusztulástól, mialatt az FDC és T-sejtek B-sejt túlélési faktorokat továbbra is termelnek. Ezzel összhangban, még az FL B sejtek sem tenyésztethetők FDC támogatás vagy CD4+ T-helper sejt citokinek, így CD40L, IL-2 and IL-4 nélkül (243, 244). Mivel a Cx43 csatornák támogatják az FDC fejlődését és túlélését még FL környezetben is, blokkolásukkal gátolható lenne FL-ben az FDC növekedése és annak B-sejt túlélési faktor termelése és így mérsékelhető az FL terápia-rezisztenciája (204, 205, 207).

A Cx43 csatornák szerepe igazolt a sejtciklus kontrolljában és a sejt differenciációban (241). Reaktív csíracentrumokban erre utal a Cx43 kifejeződés és a proliferáló B-sejt frakció inverz korrelációja. Hasonló, de nem szignifikáns trendet figyeltünk meg a kezeletlen FDC-B-sejt tenyészetek intakt sejtcsoportjaiban is. Az FL diffúz csontvelői

infiltrátumaiban a CD21 negatív, de LNGFR pozitív stromasejt hiperplázia területein is emelkedett Cx43 szinteket találtunk alacsonyabb FL B-sejt proliferáció és tumor grade mellett, mint a nyirokcsomói FL hasonló diffúz területein. Ennek ellenére a Cx43 szint közvetlen hatása a tumor grade-re, ill., az FL csontvelői érintettségére, mint a tumor progresszió potenciális indikátoraira nem igazolódott.

A direkt sejt-sejt kommunikáció a lymphoretikuláris rendszerben kutatásaink kezdete óta széles körben igazolást nyert, amit a **15. ábra** foglal össze (172). Mi homocelluláris funkcionális „gap junction” kapcsolatot bizonyítottunk az FDC mellett, csontvelői stromasejtek között is, míg mások tímusz epithelsejtek között (152, 168). Heterocelluláris direkt kommunikációs kapcsolatok létezése pedig, csontvelői stroma és hemopoetikus sejtek (135), tímusz epithel és timocyták (168), valamint endothel sejtek és lymphocyták között igazolódott (172).



15. ábra. Bizonyított, connexin csatornákon megvalósuló direkt sejt-sejt kommunikáció a csontvelőben (a), keringésben (b), tímuszban (c) és a másodlagos nyirokszervekben (d). (Krenacs T és mtsai.(172)

A Cx43 a legősibb izotípus, mely az immunrendszerben is a legelterjedtebb (172). Bizonyították, hogy a humorális immunválaszban, a Cx43 csatornák farmakológiai gátlása csökkenti a B-sejtek immunglobulin termelését (245). A Cx43 csatornák szerepét leírták az LFA1-közvetített Rap1 GTPáz aktivációban CXCL12 hatására, ami támogatja a B-sejt migrációt és adhéziót (246, 247), így a csíracentrum szerveződését. A Cx43 csatornák részt vesznek a T-sejt proliferáció és érés szabályozásában is, elsősorban a

CD4/Foxp3 kettős pozitív regulátoros T-sejtek esetében (248-250), valamint a vírus és tumor antigének sejtek közötti ún. kereszt-prezentációjában (7, 248, 251, 252).

5.5. Összefoglalás – Az eredmények újdonságtartalma

Másodlagos nyirokszervekben elsőként igazoltuk:

- a connexin (Cx43) csatornák jelenlétét ultrastrukturális, mRNS és fehérje szintű bizonyítékokkal;
- a connexin (Cx43) csatornákat, nagy denzitásban a csíracentrumok FDC hálózatán és nyirokerek endothel hálózatán, kisebb számban csíracentrum B-sejteken és nyirokszövet stromasejtek hálózatán, és ritkán T-sejteken;
- hogy a Cx43 csatornák ismételt antigén-ingerre jelentősen felül-regulálódnak a formálódó csíracentrumok FDC hálózatán;
- a funkcionális direkt sejt-kommunikációt tenyésztett, *ex vivo* follikulusokra emlékeztető FDC-B-sejt csoportokban FDC-FDC, ill. FDC-B-sejtek között;
- hogy a Cx43 csatornák blokkolása Gap27 connexin mimetikus peptiddel gátolja az *ex vivo* csíracentrumok kialakulását, az FDC-B-sejt interakciót és e sejtek túlélését;
- hogy Cx43 csatornák follikuláris lymphomában is szerepet játszhatnak az FDC túlélésében, de nem mutatnak kapcsolatot a lymphoma progressziójával.

Egy addig az immunrendszerben nem ismert, Cx43 csatornák közvetítésével működő szabályozó rendszer létezését elsőként igazoltunk másodlagos nyirokszervekben (lép, nyirokcsomó, tonsilla palatina és MALT). A metabolikus kommunikáció az FDC hálózatban és FDC-B-sejtek között támogatja a Cx43 csatornák szerepét a csíracentrum ismételt antigén-ingerre bekövetkező kifejlődésének és B-sejt szelekciós funkcióinak összehangolásában. A Cx43 csatornák és így az FDC hálózat gátlása follikuláris lymphomában felveti a lehetőségét az FDC B-sejt túlélési faktor termelése és ezzel a lymphoma terápia-rezisztenciája mérséklésének.

6. Connexin expresszió excimer lézer-ablációt követő cornea regeneráció során

6.1. Bevezetés

A connexin direkt sejt-sejt kommunikációs csatornák szerepét a kapcsolt sejthálózatok funkcióinak összehangolásában az ún. kommunikációs kompartmentek kialakításában, az egyedfejlődés során (150, 171), ill. a szív cardiomyocytái közötti akciós potenciál terjedésében (38), már korán igazolták. A szinciciális funkciók szerepe regenerációs folyamatok összehangolásában is logikusan felvetődött, ahol a sejthiány pótlása mellett a struktúra és funkciók hatékony helyreállítására van szükség. A connexinek lehetséges szerepét és kapcsolatát a sejtproliferációval a szövet helyreállítás kapcsán két modellrendszerben vizsgáltunk, lézer-ablációt követő cornea regenerációban (253), valamint korai izomdifferenciálódás, ill. regeneráció során (253-256).

A cornea ablációját követő re-epithelializációt és stromális regenerációt magasfokú rendezettség jellemzi sejt, matrix és szolubilis faktorok közötti összehangolt kölcsönhatásokkal (257-259). A sebzést követően egy gyorsan növvő, kohezív epithel réteg vándorol keresztül az ugyancsak újraépülő stromán, a károsott corneafelszín védelme és a szerkezet hatékony helyreállítása céljából (260). Az epitheliális sejtek masszív proliferációja, citoszeletális vázuk dinamikus átépülésével járó migrációjuk és interakcióik a szomszédos hámsejtekkel és a mikrokörnyezettel néhány nap alatt az eredeti többrétegű laphám helyreállításához vezet (240, 261, 262).

A komplex regenerációs folyamat koordinálásában szolubilis növekedési faktorok és közvetlen sejt-matrix, valamint sejt-sejt adhézíós interakciók szerepe régóta ismert (257, 263). Később, mind a cornea normális fejlődési és adaptív funkcióiban, mind a cornea sebgyógyulásában a connexin csatornákon megvalósuló direkt sejt-sejt kommunikáció szerepe is felvetődött (264-268). Vizsgálataink idejében csak Cx43 és Cx50 izotípusokat mutattak ki corneában, később Cx30, valamint a Cx31.1 izotípusokat is (264, 265).

Előkísérletekben a Cx43 mellett Cx26 izotípust találtunk, akkor elsőként emberi és nyúl corneában, egyezően azzal, hogy ez az izotípus más többrétegű laphámokban is előfordul (264, 265, 269). A lézerek alkalmazásának kezdődő térnyerése cornea-sebészeti beavatkozásokban, az ennek megfelelő regenerációs modellek vizsgálatának hiánya és a lehetőség újabb connexin izotípus(ok) igazolására ösztönözött arra, hogy a connexinek lehetséges szerepét cornea regenerációban tovább vizsgáljuk. Az excimer lézerrel végzett keratectomia a hagyományos gyémánt kés alkalmazása helyett a 1990-es években kezdett

elterjedni, így a beavatkozást követő regeneráció részletes molekuláris morfológiai és ultrastrukturális vizsgálatára *in vivo* nyúl modellben nem volt közölt adat.

Korábban a cornea sebgyógyulás tanulmányozása általában csak a regenerációs folyamat egy-egy szempontjára korlátozódott, így pl. sejtproliferáció, növekedési faktorok és receptoraik, epithel adhézió, vagy a „gap junction”/connexin csatornák vizsgálata. Ráadásul az egymástól eltérő modellekben és körülmények között nyert eredmények összevetése szinte lehetetlen volt, ezért a saját modellünkben több faktort párhuzamosan tanulmányoztunk.

Az excimer (193 nm-es ArF) lézerrel *in vivo* nyúl modellben végzett cornea keratectomiát követő regenerációs folyamatban az epitheliális kapcsolatokat vizsgáltuk, különös tekintettel a connexin kommunikációs csatornákra. A korai gyulladásos és stromális választ, az epithel migrációt, a desmosomák, hemidesmosomák és a „gap junction” csatorák térbeli és időbeli eloszlását ultrastrukturálisan is követtük. A connexin expressziós adatokat összevetettük az epitheliális sejtproliferáció és az epidermális növekedési faktor receptor (EGFR) expresszió változásával is a regeneráció során.

6.2. Anyag és Módszer

Cornea lézerkezelési protokoll. Három hónapos új-zélandi albino nyulak (22 állat) jobb szeméről Calypsollal (Richter, Budapest) végzett altatásban Humacain szemcsepp (Teva-Human, Debrecen) alkalmazása után a corneát 96%-os alkoholos szűrőpapírral óvatosan eltávolítottuk. A stromális ablációt 193 nm-es ArF excimer lézerrel (EMG 102 MSC, Lambda Physik, Ft. Lauderdale, FL) végeztük, 6 mm-es állandó ablációs átmérővel, 2 Hz ismétlési gyakorisággal, $150+10 \text{ mJ cm}^{-2}$ energiasűrűséggel és 90 μm -es ablációs mélységgel. Műtét után az állatok operált szemét 3 napig napi 5x kezeltük Tobramycin szemcseppel (Alcon, Fort Worth, TX).

A cornea szövetmintákat a kezelést követő 0, 6 és 16h (3-3 állat), illetve 1, 2, 3 (4-4, ill. 3 állat) és 7 nap után (2 állat) vizsgáltuk. A cornea mintákból 2 mm szeleteket közepén elfeleztük, elektronmikroszkópia, ill. fagyasztott metszeteken végzett immunhisztokémiai reakciók céljára. A nem-kezelt ellenoldali szemek kontrollként szolgáltak.

A műgyantás félvékony és elektronmikroszkópos vizsgálatokat a limbus, migrációs front és ablációs centrum régióiból gyűjtött cornea minták keresztmetszetein végeztük.

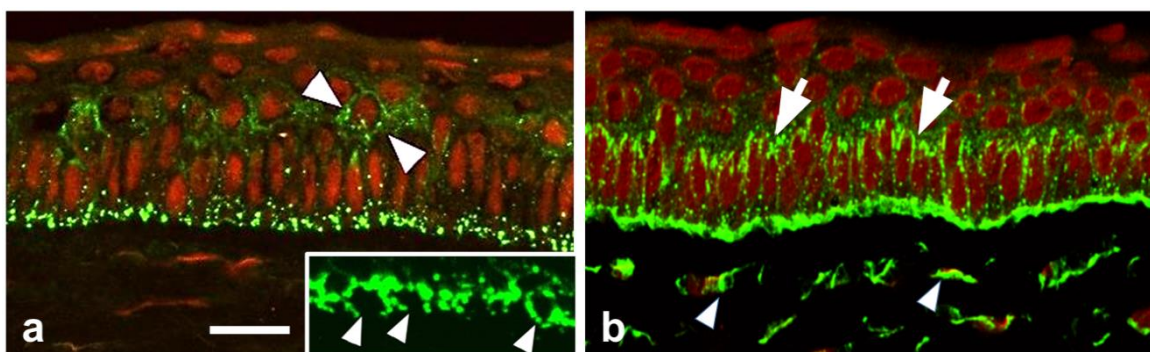
Immunohisztokémia. Nyolc μm vastag, friss-fagyasztott metszeteken immunfluoreszcens reakciókat végeztünk a 3. Módszer fejezet szerint. A cornea hám mitotikus

indexét a Ki67 pozitív cornea hámsejtek összes hámsejthez viszonyított %-os arányából számítottuk. Az eredményt statisztikailag a Student-féle kétszárú t-tesztel elemeztünk.

6.3. Eredmények

Connexinek a kezeletlen nyúl corneában

A kezeletlen (normál) nyúl corneahám 3-5 sejtrétegből állt, a bazális, vertikálisan elnyújtott sejtek fölötti rétegek fokozatosan ellaposodtak (**16. ábra**). A tesztelt connexin izotípusok (Cx26, Cx32, Cx37, ill., Cx40) közül a Cx26 és Cx43 volt kimutatható. Egyedi lokalizációjukat a monoklonális és poliklonális antitestekkel végzett reakciók



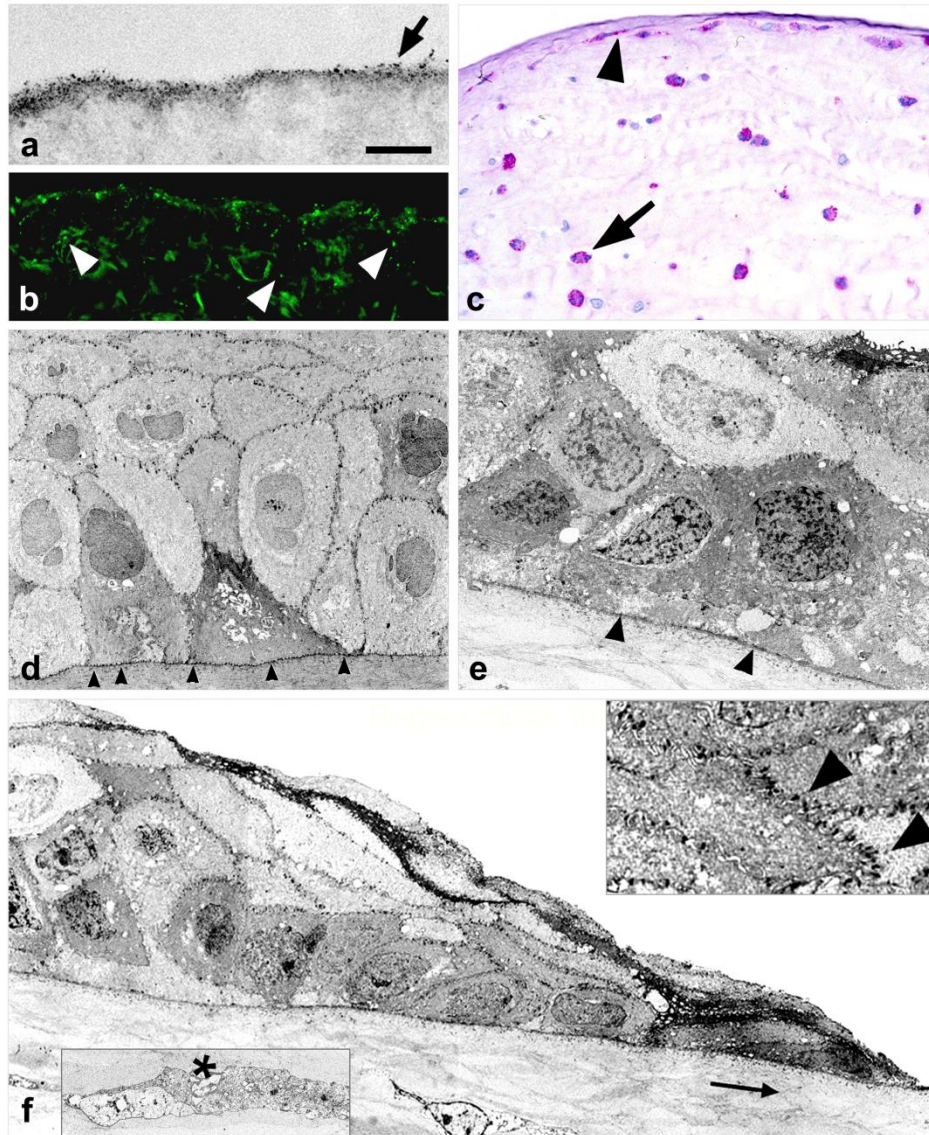
16. ábra. Cx26 (a) és Cx43 (b) immunfluoreszcens reakciók kezeletlen nyúl corneában. A partikuláris Cx26 reakció a cornea bazális hámsejtek bazolaterális régiójában, néhol a szuprabazális sejtek körül (nyílhegyek) látszik (a). A tangenciális metszés (betéti kép) a bazolaterális gyűrűszerű lokalizációt (nyílhegyek) mutatja. Cx43 reakció a bazális epithel sejtek körül, nagyobb mennyiségben a bazális és szuprabazális sejtek közös határán (nyilak) (b) és a stromális fibroblastokban (nyílhegyek). Magfestés: 7AAD, piros. Méretvonal: 20 μm .

egyformán támogatták. A connexin csatornák százait magukban foglaló immunfestett aggregátumok mérete 0.6-1.2 μm volt Cx26, illetve 0.4-1.0 μm Cx43 izotípus esetében. A pontszerű Cx26 reakció a bazális hámsejtek bazolaterális oldalát gyűrűszerűen körülölelte, néhány a szuprabazális sejtek körül is előfordult, a stroma negativitása mellett (**16a. ábra**). A Cx43 csatornák a bazális hámsejtek mentén egyenletes eloszlásban helyezkedtek el, feldúsulva a bazális sejtek és a szuprabazális sejtek közös határán (**16b. ábra**). Emellett a Cx43 fehérje immunjelei az epitheliális bazális membrán mentén, néhány szétszórva a felhám sejtek között, nagy mennyiségben a stromális sejteken (keratocyták), valamint a cornea belső felszínének endothel sejtjein volt kimutatható.

Connexin kifejeződés regenerálódó corneában

Korai események 6 és 48 óra között

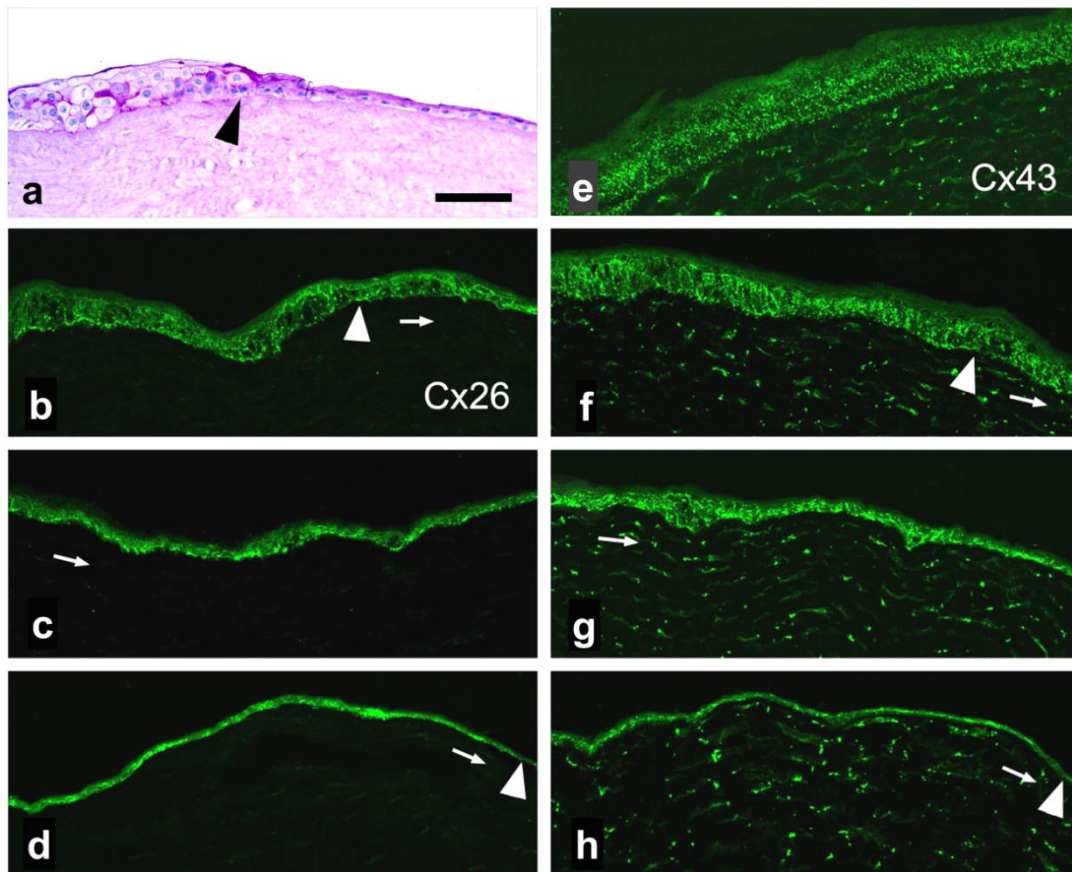
Hat órával az abláció után a stromális felszínt molekuláris törmelék, un. pseudomembrán fedte (17a. ábra). Néhány stromális fibroblast eredetű Cx43 aggregátum kimutatható volt a lecsupaszított sebfelszínen is (17b. ábra). 6-16 óra között a stroma kollagén kötegei között akut gyulladásos sejtek (neutrofil granulocyták), néhány histiocyta és aktivált fibroblastok látszottak (17c. ábra). A nyugvó bazális hámot nagy számban a bazális membránhoz kapcsoló hemidesmosomák a migráló sejtekben jelentősen megritkultak (17d-e. ábra). A sebzés irányába elnyújtott bazális és szuprabazális sejtek



17. ábra. Korai 6-16 órás események nyúl corneában excimer lézerrel végzett abláció után. Molekuláris felszíni törmelék, „pseudomembrán” (nyíl) (a) és a csupasz sebzés felszínén stromasejt eredetű gyér Cx43 reakció (b; nyílhegyek) 6 óra után. Aktivált fibroblastok (nyílhegy) és akut gyulladásos sejtek (nyíl) a csupasz sebfelszín alatt 16 óra után (c). Nagyszámú hemidesmosoma a bazális membrán mentén (nyílhegyek) nyugvó hámban (d) és jelentősen kevesebb a sebhatarhoz közeli migráló hámban (e). A lecsupaszított stroma fölé a migrációs fronton egy-sejt rétegben vándorló elnyújtott hámsejtek (f). A csillag aktivált, intenzív fehérjetermelést mutató stromasejtet, a nyílhegyek a sűrű interdigitációkat és köztük a desmosomákat mutatják. Transzmissziós elektronmikroszkópia (a, és d-f), immunfluoreszcencia (b) ill., félvékony metszet, metilénkék-bázikus fukszin festés (c). Méretvonal az (a) ábrán, a: 700 nm; b: 15 µm; c: 25 µm; d: 6 µm; e: 5 µm; f: 8 µm (betéti képek, lent: 3 µm; jobbra fent: 2 µm).

kezdték vándorolni a lecsupaszított stroma fölé a migrációs fronton ellaposodott egy-sejt rétegben (17f. ábra). A vándorló hámsejtek közötti interdigitációk és rajtuk a desmosomák száma jelentősen felszaporodott. A regenerálódó hám alatt a stomasejteken fokozott fehérje-/kollagénszintézis ultratrakturális jelei látszottak.

Tizenhat és 48 óra között, mind a Cx26, mind a Cx43 reakció pontszerű sejtek közötti reakciója migrációs front 1-2 hámsejtje kivételével nagy mennyiségben kimutatható volt az újonnan képződött, vándorló hámrétegben (18. ábra). 48 órával a műtét után a 6 mm

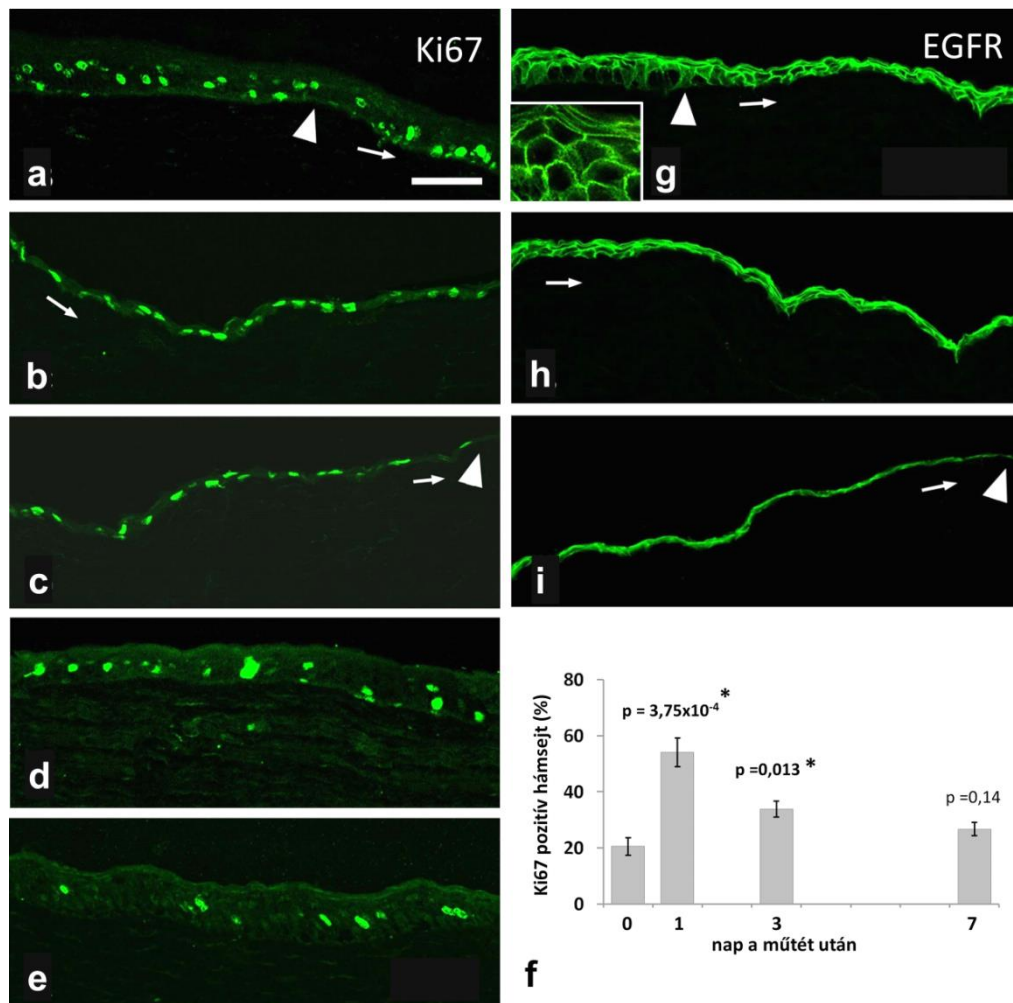


18. ábra. Cx26 (a) és Cx43 (b) immunfluoreszcens reakciók (zöld) nyúl corneában 24 órával a lézerabláció után. A sebzési fronttól (nyílhegy) jobbra a sebzésre kúszó hámsejt réteg (a). A partikuláris Cx26 (b-d) és Cx43 (e-h) reakció folyamatosan végigköveti (b és f kezdeti szakasz; c és g középső szakasz) a stromát befedő szimpla hámsejt réteget egészen a vándorlási frontig (d és h). A nyílhegyek a sebzés szélét (b és f) valamint a hámsejtvándorlás frontját (d és h), a nyilak a hámsejt vándorlás irányát mutatják. A connexin reakció kiterjed a corneahám teljes vastagságára, ami különösen a sebzést határoló régiókban (b és e-f) nyilvánvaló. Méretvonal: 50 μ m.

átmérőjű sebzést a hámsejtek teljesen befedték. Mindkét connexin izotípus jelentős felülregulációt mutatott mind az eredetileg épen hagyott limbális régióban, mind a sebzést befedő hámsejtekben. Azonban a reakciók eloszlása egyenetlen és szabálytalan volt. A partikuláris connexin reakció nem korlátozódott a bazális hámsejtekre, kiterjedt a

felsőbb hámrétegekre is. A connexin pozitív aggregátumok száma pozitív korrelációt mutatott a sebzés határának közelségével.

A bazális és szuprabazális hámsejtek már az első nap után a sebzés mindkét limbális oldalán szignifikánsan emelkedett proliferációt (Ki67 index) mutattak a kezeltlen kontroll cornea hámhoz képest (**19a-f. ábra**). A proliferáció kiterjedt a sebzést befedő, migráló hámsejt rétegre is egészen annak frontjáig. Míg a nyugalmi, kezeltlen cornea

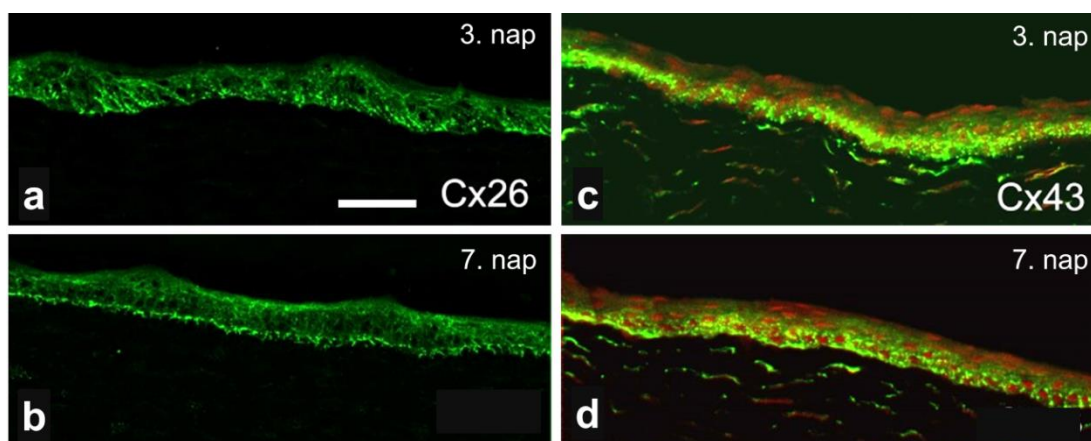


19. ábra. Ki67 (a-f) és EGFR (g-i) immunfluoreszcens reakciók (zöld) nyúl corneában a lézer-abláció után. A proliferáló (sejtmagi Ki67 pozitív) hámsejtek száma szignifikánsan emelkedett 24 órával (a-c) és 3 nappal (d) a kezelés után a kezeltlen kontroll hámhoz képest (e). Az eredményeket grafikusán az f ábra foglalja össze. A nyílhegyek a sebzés (a és g) valamint a hámsejt vándorlás frontját (c és i) a nyílak a hámsejt vándorlás irányát mutatják. Mind a sejtmagi Ki67 reakció (a-e), mind a sejtmembránhoz kötött EGFR reakció (g-i) végigköveti (a és g kezdeti szakasz, b és h középső szakasz) a stromát befedő szimpla hámsejt réteget egészen a vándorlási frontig (c és i). Mindkét reakció megjelenik a felsőbb hámsejt rétegekben is a sebzés melletti ép területeken (a és g, utóbbit betéti képen kinagyítva). Méretvonal: 50 μ m.

hámiban az epidermális növekedési faktor receptor (EGFR) fehérje elsősorban a bazális és szubabazális hámsejtekre koncentrált, addig kezelés hatására kiterjedt minden hámsejt rétegre a sebzés előtti és a sebzési területen is (**19g-i. ábra**).

Késői események, 48 óra és 168 óra között

A lézer ablációt követő 72 óra után a sebzett felszínt 2-3 kissé hullámos lefutású sejtrétegekből álló hámsejtek fedték, ahol a connexinek is egyenetlenebb eloszlást mutattak, mint a kezeletlen hámiban (20a-b. ábra). Mind a Cx26, mind a Cx43 pozitivitás részben még kiterjedt a felsőbb hámrétegekre. Egy héttel a cornea abláció után a hám ismét 3-5 sejtrétegűvé fejlődött (20c-d. ábra). A kezeletlen hámhoz képest rendezettségben mérsékelten eltérő morfológiai megjelenéssel és connexin eloszlással.



20. ábra. Cx26 (a-b) és Cx43 (c-d) immunfluoreszcens reakciók (zöld) nyúl corneában 3-7 nappal a lézer-abláció után. A regenerálódott többrétegű hám 3 nap után (a és c) még hullámos lefutású, ami 7 nap után egyenletesebbé vált (b és d). Ezzel párhuzamosan a connexinek felülregulációja és egyenetlen eloszlása is mérséklődött 7 nap után a 3 napos mintákhoz képest. Magfestés: 7AAD (c és d, piros). Méretvonal: 50μm.

6.4. Megbeszélés

A látásélesség helyreállítása excimer lézerrel végzett fotorefraktív keratektómia után a cornea stroma és hám hatékony és koordinált regenerációján múlik. Ebben a folyamatban különös figyelmet fordítottunk a direkt sejt-sejt kommunikációs csatornákat formáló connexinek, egyéb sejtkapcsolatok, valamint a hámsejt pótlás/proliferáció és az EGFR kifejeződés struktúrához kötött és időbeli változásainak tanulmányozására. Kétféle connexin izotípust azonosítottunk, a Cx43-at és Cx26-ot (utóbbit elsőként), melyek a regenerációs folyamat kezdeti szakaszától kifejeződtek a jelentős proliferációs aktivitást és sejtmembrán EGFR expressziót mutató, seb felszínre vándorló új cornea hámsejtek frontjáig. Normál morfológiájú corneában mindkét connexin izotípus a bazális hámsejtekben koncentrált. A regeneráció során mind a sebzés előtti, mind a migráló hámiban jelentősen emelkedett Cx26 és Cx43 expresszió átmenetileg kiterjedt a felsőbb hámrétegekre, ami felveti szerepüket a cornea sebgyógyulás összehangolásában.

A sejtkommunikációs connexin csatornák szerepére cornea regenerációban vizsgálatunkig kevés adat volt (265, 267). Munkánkkal a korábbi megfigyeléseket pontosítottuk és újakkal egészítettük ki. Kimutattuk 1) a Cx26 csatornákat, elsőként mind normál nyugvó, mind generálódó cornea hámában 2) Nagyobb pontossággal, denzitásban határoztuk meg a partikuláris Cx26 és Cx43 lokalizációját a normál bazális hámsejtek bazolaterális membránrégiójában, míg a Cx43 csatornákat a bazális és szuprabazális sejtek közös membrán határán is nagyszámban találtunk; 3) a stromális keratocyta és endothel sejtek Cx43 pozitivitását, ami endogén pozitív kontrollként is szolgált (266, 270); 4) regenerálódó corneában mindkét izotípus felülregulációját és kiterjedését a corneahám teljes vastagságára; 5) hogy a migráló frissen képződött hámsejtekben jelentős mennyiségű partikuláris Cx26 és Cx43 fehérje képződik, míg itt mások itt nem találtak connexineket (265, 267). Mivel mások a nyilvánvaló desmosomális kapcsolatokat sem tudták immunológiai igazolni (267), kísérletükben a connexin negativitás a migráló hámában technikai okokra vezethető vissza.

A Cx26 izotípust többrétegű laphámában másutt, így az epidermisben és a cervix hámában is korábban kimutatták (269). A corneában igazolt Cx43/GJA1 és Cx26/GJB1 nem képeznek vegyes csatornákat egymással (8, 11), így a corneahám kompartmentális funkcióinak koordinálására alternatív útvonalakat kínálnak. A bazális és szuprabazális cornea hámsejtek közötti közvetlen kommunikációban a Cx50 csatornák is részt vehetnek, melyek azonban nem kompatibilisen sem a Cx43, sem a Cx26 csatornákkal (271). Bár kezdetben az karcolósos ("scape-loading") festéktranszfer módszer nem igazolt funkcionális kommunikációt bazális és szuprabazális cornea hámsejtek között (265), a koszerűbb karboxifluoreszcein mikroinjekciós módszer ezt bizonyították (272).

A sejtmigrációt az actin/stressz-filamentumok folyamatos átrendeződése biztosítja, mely a fronton állászerű nyúlványokat, a követő sejtekben pedig hangsúlyos interdigitációkat hoz létre, hasonlóan a bőrsebek gyógyulásához (262, 273). A vándorló hámréteg folyamatos egybentartásáért desmosomoplakin és E-cadherin által közvetített kalcium-függő sejtadhézió, amit ultrastukturálisan is követtünk, és a "tight junction" kapcsolatok felelősek (263, 267). A kalcium függő sejtadhéziós mechanizmusok fontos szerepet játszanak a "gap junction" sejtmembrán csatornák kialakulásában is (166, 218). Ennek megfelelően, a kommunikációs csatornákat reprezentáló partikuláris Cx26 és Cx43 pozitivitást mutattunk ki a regenerálódó hámsejtek között, beleértve a vándorló egysejtréteget egészen annak frontjáig (265, 267). Mindez igazolta, hogy a migráló hámsejtek részben megőrzik szoros homofil adhéziójukat és a lehetőségét, hogy közvetlen

metabolikus kapcsolatot is fenntartsanak egymással a regenerációs folyamat összehangolására.

A sebzés jelentősen felülregulálta mindkét connexin izotípust. A connexinek eredeti bazális szegregációja már 24 óra után eltűnik, expressziójuk kiterjedt a hám összes rétegére, ami különösen a limbális régióban volt kifejezett. A Cx26 és Cx43 hasonlóan emelkedő szintjét és relokalizációját igazolták mitogénnel kiváltott epidermális hiperpláziában is (269). További megfigyelések is bizonyítják a connexin kifejeződés gyors modulációját hámproliferáció kapcsán, ami a direkt sejt-sejt kommunikáció szerepére utal a többrétegű hám koordinált újraépülésében (274, 275). Hogy a connexin felülreguláció a hámproliferáció kontrolljában közvetlenül is szerepet játszik-e, annak eldöntése további vizsgálatokat igényel.

A fokozott sejtproliferáció a gyors sejt pótlás és a seb hatékony elszigetelése érdekében alapvető (261, 276, 277). A sejtproliferáció masszív emelkedését figyeltük meg 24 órás sebekben, ami a vándorló hám egy-sejt rétegét is érintette. Mások csak a összejtekben gazdag limbális régióban figyeltek meg sejtproliferációt cornea regeneráció kapcsán (261, 278). Kisebb, 3 mm átmérőjű felszíni sebeknél, amit mások használtak, valószínű, hogy elegendő sejt pótlódik limbális régió proliferációjával. A mi nagyobb, 6 mm átmérőjű sebzésünkénél, a sérülés izolálásának akut szükséglete miatt, már a migráló sejtek szaporodására is szükség volt. A mienkhez hasonló masszív, fokozott sejtproliferációt figyeltek meg EGF-el támogatott epithel regeneráció során 10 mm átmérőjű sebzés után 12-24 órával (279). Cornea regenerációban a migráló endothelsejtek proliferációját is megfigyelték (280). Bár a Ki67 fehérjeszintek a proliferációs sejtfrakció túlértékelésére is alkalmasak, timidin beépüléssel végzett proliferáció becslés a Ki67 reakcióhoz hasonló eredményeket adott (281, 282).

A cornea sebgyógyulása során a hámsejt proliferációt és migrációt támogató egyik fontos szolubilis növekedési faktor az EGF (258, 283, 284). EGF-et a cornea mindhárom fő sejt típusa, a hám, stroma és az endothel is képez, míg az EGF receptor (EGFR) termelés elsősorban a hámsejtekre (esetleg a stromára) korlátozódik (8, 284). Másokkal megegyezően nagy mennyiségű sejtmembránhoz kötött EGFR fehérjét mutattunk ki a bazális hámsejtekben és fokozatosan csökkenő mennyiségben a felsőbb hámrétegek felé (285). Regeneráció során az EGFR szint emelkedett a felsőbb hámrétegekben és a sebzés fölé vándorló hám egysejt rétegében is. A regenerációs hámiban megfigyelt magas EGFR koncentráció támogatja a receptor aktiváció szerepét a sejtproliferációval járó fokozott DNS szintézisben (279). A kisebb átmérőjű felszíni sebzéssel járó regeneráció során a

vándorló hámsejtekben sem proliferációt, sem EGFR fehérjét nem tudtak kimutatni (278), ami ha nem technikai hiba következménye, szintén a két tulajdonság (EGFR szint és proliferáció) szoros kapcsolatát mutatja.

6.5. Összefoglalás – Az eredmények újdonságtartalma

Elsőként igazoltuk:

- a Cx26 csatornákat a corneában, ahol a bazális hámsejtek membránján jelentek meg, a Cx43 izotípus mellett. Mivel heteromer csatornákat a két izotípus nem képez, így szelektív permeabilitásuk révén alternatív metabolikus direkt sejt-sejt kapcsolatok lehetőségét kínálják;
- hogy excimer lézer-abláció után a regenerálódó cornea hám fokozott Cx26, Cx43 és epidermális növekedési faktor receptor (EGFR) expressziót és átmeneti relokalizációt mutat, kiterjedve minden hámrétegre ideértve a sebfelszínre vándorló egy-sejt réteget is;
- hogy a nagy (6 mm-es) sebátmérő és extrém hámsejt igény miatt nemcsak a limbális, összejtgazdag régió, hanem a migráló hámsejtek is magas proliferációs aktivitást mutatnak.

Igazoltuk, hogy a hatékony cornea sebgyógyulás érdekében fokozott növekedési faktor hatásra a sebfelszínre vándorló hámsejtek erős proliferációs aktivitásuk mellett is megtartják képességüket a metabolikus kommunikációra. Ez a megfigyelés és a connexin csatornák átmeneti felülregulációja, támogatja szerepüket a térben és időben magasszintű rendezettséggel zajló regenerációs folyamat koordinálásában.

7. Connexin csatornák szerepe a harántcsíkolt izomdifferenciálódás és regeneráció során

7.1. Bevezetés

Gerincesekben a connexin csatornák minden magvas sejtben megtalálhatók, kivéve az érett harántcsíkolt izmot (és spermiumokat), mivel az izomrostok myoblastok tucatjainak fúziójával létrejött szinciciumok (286). Másrészt a szomszédos rostok elektromos izolációja a motoros egységek szelektív aktiválása miatt is fontos (287). Azonban a izomprogenitor myoblastok képeznek connexin csatornákat és nagymértékű szervezettséggel kapcsolódnak egymáshoz, majd fuzionálnak myotubulusokká, ami felvetette a direkt sejt-sejt kommunikáció szerepét korai izomdifferenciálódásban (288). „Gap junction” csatornákat korábban igazoltak csirke, egér és patkány embrió és újszülött harántcsíkolt izmaiban (289-292). A kommunikációs csatornákat ugyancsak kimutatták myoblast sejtenyészetekben, ahol a csatornablokkoló octanol vagy β -glycerretinsav, ill. a Cx43 gén indukált ablációja a késői myogenikus faktorok, a myogenin és Mrf4 (myogenikus szabályozó faktor-4) kifejeződését gátolta (289, 293-297). Továbbá, Cx43 gén (cDNS) transzfekciója rhabdomyosarcoma sejtek differenciáltabb fenotípusát eredményezte (294, 298). A legtöbb tanulmány azonban transzformált sejtvonalakat használt, illetve kiragadott időpontokban statikusan vizsgálta a differenciálódás egy-egy részletét. Munkánk idején a myogenikus progenitor sejtek multinukleáris izomsejteké differenciálódása folyamatában a connexin csatornák szerepét szisztémásan értékelő tanulmány nem volt.

Érett harántcsíkolt izomban a rezidens, összejt tulajdonságú szatellita sejtek aktiválódnak izomkárosodás kapcsán és köteleződnak el myoblastokká. A sérült izomból felszabaduló mitogének és trofikus faktorok hatására a myoblastok proliferálnak, differenciálódnak, vándorolnak, majd sejtfúzióval hoznak létre az új izomrostokat (299). A nagyléptékű myoblast fúzió térben és időben magas szinten szervezett (299, 300), ami a sejtadhézió, a sejtciklus kontroll és az izomspecifikus génexpresszió precíz koordinálását feltételezi nagyszámú sorbarendeződött myoblastban. A connexin csatornák lehetővé teszik növekedési és differenciációs szignálok gyors és szinkron közvetítését kiterjedt sejthálózatokban (189, 301), így koordináló szerepük a myoblast fúzió összehangolásában is logikus felvetés volt. Mind az izomregeneráció, mind a myoblast tenyészetek rekapitulálják az egyedfejlődés izomdifferenciációs folyamatait, így kiváló modelleket kínáltak a myogenezis tanulmányozásához (302, 303).

Az izomfejlődést myogenikus transzkripciós faktorok (Myf5, MyoD1, Myogenin és Mrf4) irányítják (304, 305). Myogenikus molekulák átírását indukálják, majd a sejtdhéziós és a sejtciklus szabályozási jelutak interakciói a myoblastok fúzióra kész sejtláncba rendezését, végül fúzióját és kontraktilis fehérjék expresszióját eredményezik (304, 306). Korábban igazolták, hogy a ciklin-függő kináz gátló p21^{waf1} felülregulációja alapvető szerepet játszik a myoblastok differenciálódásában és életképességében (307, 308). Másrészt a p21^{waf1} fehérje aktiválható „gap junction” csatornákon keresztül is szomszédos sejtekben (309). Mások bizonyították, hogy az ugyancsak ciklin-függő kináz inhibitor p27^{kip1} közvetíti daganatsejtekben az indukált connexin expresszióval kiváltott differenciáltabb fenotípust (120, 121).

Ebben a munkában a „gap junction” connexinek térbeli és időbeli kifejeződését tanulmányoztuk izomdifferenciálódás során (254-256). *In vivo*, kígyóméreggel kiváltott szelektív myonekrózis után vizsgáltuk patkányban a soleus izom regenerációját (310), valamint a myogenikus sejtek proliferációjának (Ki67), connexin expressziójának és sejtciklus kontroll szabályozásának (p21^{waf1} p27^{kip1}) összefüggéseit. *In vitro* primer myoblast tenyészetben ugyancsak követtük az izomdifferenciálódás és a connexin kifejeződés viszonyát és a csatornák genetikai felülregulációjának, ill. gátlásának hatását a myoblast proliferációra és a myotubulus képződés dinamikájára. A myoblastok metabolikus kapcsolódását funkcionális festék-transzfer kísérletekkel követtük.

7.2. Anyag és Módszer

***In vivo* izomregenerációs modell.** Nembutal (fenobarbitál) anesztézia alatt ~350 g-os hím Wistar patkányok bal lábának m. soleus izomkötegébe 20 µg (200 µl) notexint (a *Notechis scutatus scutatus* - tigriskígyó mérge) injektáltunk (311). A jobb láb azonos régiójába fiziológiás sóoldatot adtunk, ami kontrollként szolgált. Az állatok feláldozása után csoportonként 3-3 állat soleus izmának középső harmadát metszettük ki és vizsgáltuk a 1, 2, 3, 4, 5 és 7. nap után, ill. 2-2 állatot a kezelést követő 21. és 28. napon. Kontrollként három újszülött patkány hátsó végtag izmait is tanulmányoztuk.

Primer myoblastok tenyésztése. Újszülött patkányok hátsó végtagjaiból szatellita sejteket is izoláltunk (312). Az izmot PBS pufferben 2-3 mm-es darabokra vágtuk, 0.25%-os tripszinnel (4 U/mg) 30 percig kezeltük, a felülúszót összegyűjtöttük, majd 2000 rpm-en centrifugáltuk. A fibroblastok kitapadása után a myoblastokat 2×10^5 sejt/lyuk denzitásra beállítva 10% FCS, 10% lószérum és 200 µg/ml gentamycin tartalmú

komplett Dulbecco-féle MEM (DMEM) tápoldatban tenyésztettük. A Poly-L-lizinnel és lamininnal fedett fedőlemezekben tenyésztve 3-4 nap alatt váltak konfluenssé. A myoblast fúziós indexet a myotubulusokba foglalt, ill. az összes desmin pozitív sejt 7AAD festett magjának hányadosából számoltuk ki legalább 10 látóteret vizsgálva mintánként.

Western immunoblot. A primer myoblast tenyészeteket 0,5%-os tripszinnel 4°C-on kezeltünk. Majd fagyasztva elporított pakány szív mintákkal megegyezően szacharóz, EDTA, DL-ditiotreitol (DTT), fenilmetánszulfonil fluorid (PMSF), tripszin inhibitor, leupeptin és aprotinin tartalmú lízis pufferrel szonikáltuk (254). Mintánként 30 µg fehérjét futtattunk 4.8%-os nátrium duodecilszulfát poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE) (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), majd blottoltunk immobilon-P nitrocellulóz membránra (Millipore, Billerica, MA, USA). A membránokat nyúl anti-Cx43 antitesttel (1:1,000; Zymed) majd peroxidázzal jelölt anti-nyúl immunoglobulinnal (1:2000, Vector Burlingame, CA) kezeltük, végül ECL chemiluninescens reagnessel előhívtuk (Perkin-Elmer, Boston, MA,) és Bio-Rad Gel Doc 2000 rendszerrel a Quantity 1-D software-rel elemeztük.

Immunhisztokémia. Az kísérletes izommintákat elfeleztük, egyik részüket folyékony nitrogénben lehűtött izopentánban felagyasztottuk, míg a másikat 4%-os formaldehydben rögzítettük, majd rutinszerűen paraffinba ágyztuk. Az immunreakciókat paraffinos metszeteken, fagyasztott metszeteket és fedőlemezekben növesztett tenyészeteken a 3. *Módszer fejezet* szerint végeztük.

A Cx43 és a sejtciklus asszociált fehérjék kifejeződésének mennyiségi analízise. A Cx43 kifejeződés és a p21^{waf1}, p27^{kip1}, ill. Ki67 pozitív sejtfrakciók (pozitív/összes myogenikus sejt) meghatározását az Image J 1.29 software-rel végeztük (254, 255). Statisztikai elemzésre a nem-parametrikus Kolmogorov-Smirnov tesztet alkalmaztuk. Normál eloszlásnál az eredményeket kétszárú t-tesztel is ellenőriztük. Meghatároztuk az immunjelölt partikulák nagyságbeli eloszlását is és ennek sejtszámra vonatkoztatott értékeit. Az 5-2500 pixel tartomány az összes immunjelet, az 5-80 pixelig terjedő jelek a ≤ 1 µm-es pontszerű, sejtmembránhoz kötött Cx43 reakciót, míg a 320-2500 nagyságú jelek a ≥ 4 µm-es intracitoplazmatikus Cx43 plakkokat jellezték.

Adherens myoblast tenyészetek transzfekciója Cx43 génkonstrukciókkal. Kétnapos adherens myoblast tenyészeteket csak zöld fluorescens fehérjét (eGFP) kifejező, eGFP-t és vad típusú Cx43 gént (wtCx43) kifejező, ill., eGFP-t és egy domináns negatív, C-terminálisan csomókolt (a 231-es pozícióban valin helyett glutaminsav, a 232-es pozícióban fenilalanin után trunkált) és szállításában gátolt Cx43 génkonstrukciót is kifejező (dnCx43) pIRES2-eGFP vektorral (BD-Clontech, Mountain View, CA) transzfektáltunk (313). A transzfekciót 30%-os konfluenca mellett Effectene reagenssel (Qiagen, Crawley, UK) végeztük szérumot tartalmazó tenyészetekkel (256). Lyukanként 1 µg/ml génkonstrukciót 8 µl „enhancer” reagenssel, majd Effectene reagenssel inkubáltunk, végül a kultúrákhoz adtuk 24 óráig, majd normál növekedési médiumban tenyésztettünk (256). Az eGFP fluoreszcenciája ~5-6 óra múlva jelentkezett. A sejtszámot és a myotubulusok megjelenési dinamikáját 4 napig naponta tanulmányoztuk. Minden konstrukcióval minden időpontban 4 párhuzamos tenyészetet vizsgáltunk.

Funkcionális festék-transzfer vizsgálatok. A transzfektált myoblastok metabolikus kapcsolódását szimpla lucifersárga, vagy kettős festék injekcióval 5% FITC-dextran (Ms:~10 kDa, membrán átjárhatatlan) és 5% „Cascade Blue” (kaszkádkék, Ms:538 Da, membránpermeabilis) (Invitrogen-Molecular Probes) teszteltük a 3. *Módszer fejezet szerinti* mikropilláris módszerrel (129). A festéktranszfert osztályoztuk, hiányzó kapcsolat, csak kaszkádkék átjutása szomszédos sejtekbe (connexin/junkcionális kapcsolat), ill. a FITC-dextrán (mindkét festék) átjutása szomszédos sejtekbe (cytoplazma folytonosság/kapcsolat). A myoblastok connexin kapcsolódásának hatékonyságát a festékkapcsolt/injektált sejtek hányadosával határoztuk meg.

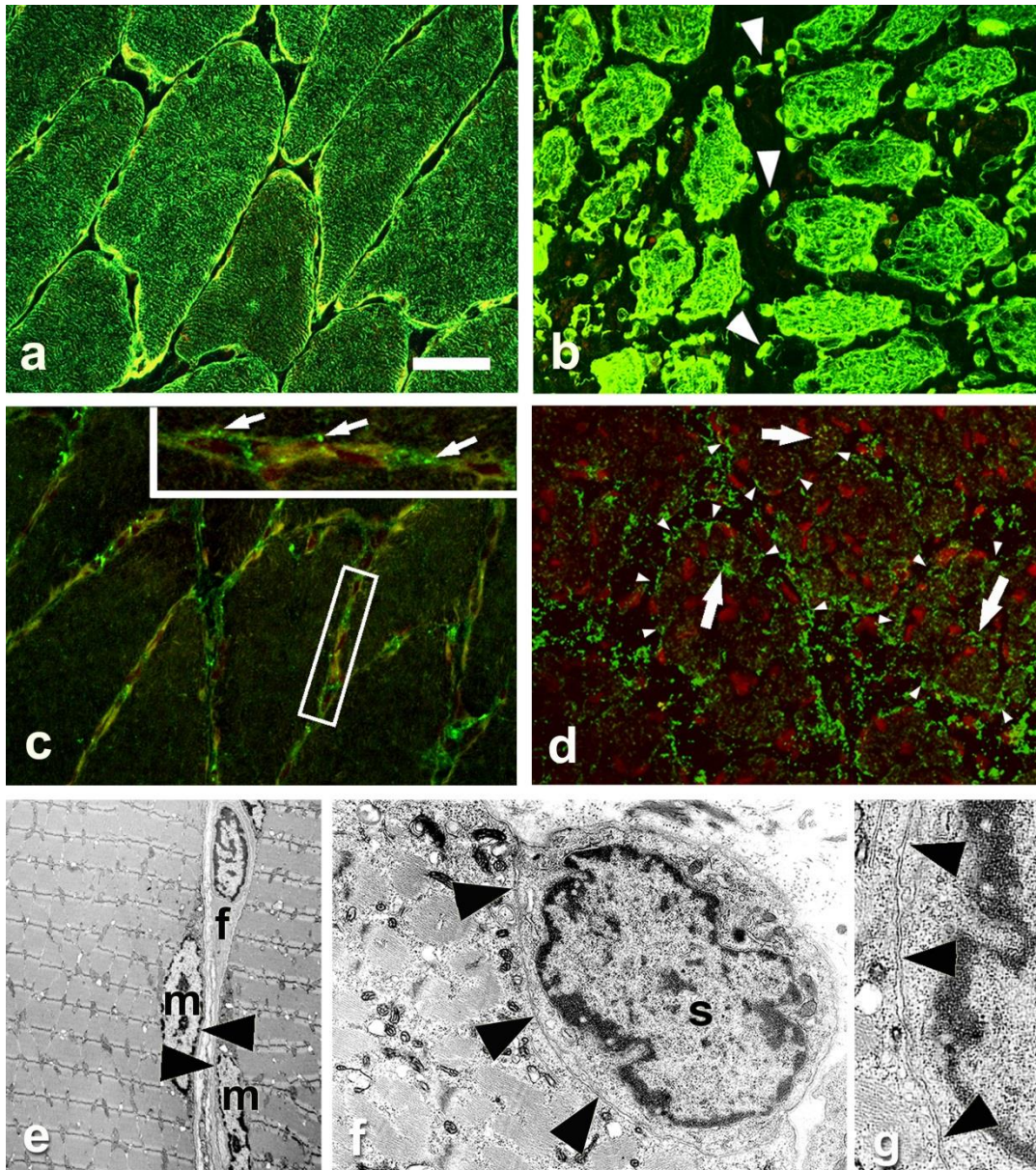
Statisztikai analízis. A transzfekció egyenletességét és megbízhatóságát és a kezelések hatékonyságát a nem-parametrikus Kruskal–Wallis-féle teszttel vizsgáltuk, majd a páros, csoportok közötti összevetésre a Dunn-féle tesztet használtuk (SigmaStat, Sigma).

7.3. Eredmények

Connexin csatornák lokalizációja pakány harántcsíkolt izomban

A regenerációs folyamat során a myogenikus sejteket a korai ovális, majd unipoláris myoblastoktól az érett harántcsíkolt izomrostokig desmin pozitívtásukkal igazoltuk (**21a-b. ábra**). Érett patkány soleus izom myogenikus sejtjeiben a Cx43 volt az egyetlen connexin izotípus (**21c. ábra**). Kevés Cx43, Cx37 és Cx40 mellett az izomrostokat

határoló vasculáris endothel sejtekben kimutatható volt. Újszülött patkány izomban Cx43 reakció az éretlen rostokon belül is látszott (21d. ábra). Az éret rostok sejtmembránjait (sarcolemma) vékony bazális membránszerű kötőszövet réteg (endomysium) választotta el egymástól (21e. ábra). Az izom progenitor szatellita sejtek a rostokkal közvetlen membrán kapcsolatban voltak, köztük „gap junction” csatornák elektronmikroszkóposan sem látszottak (21f-g. ábra).

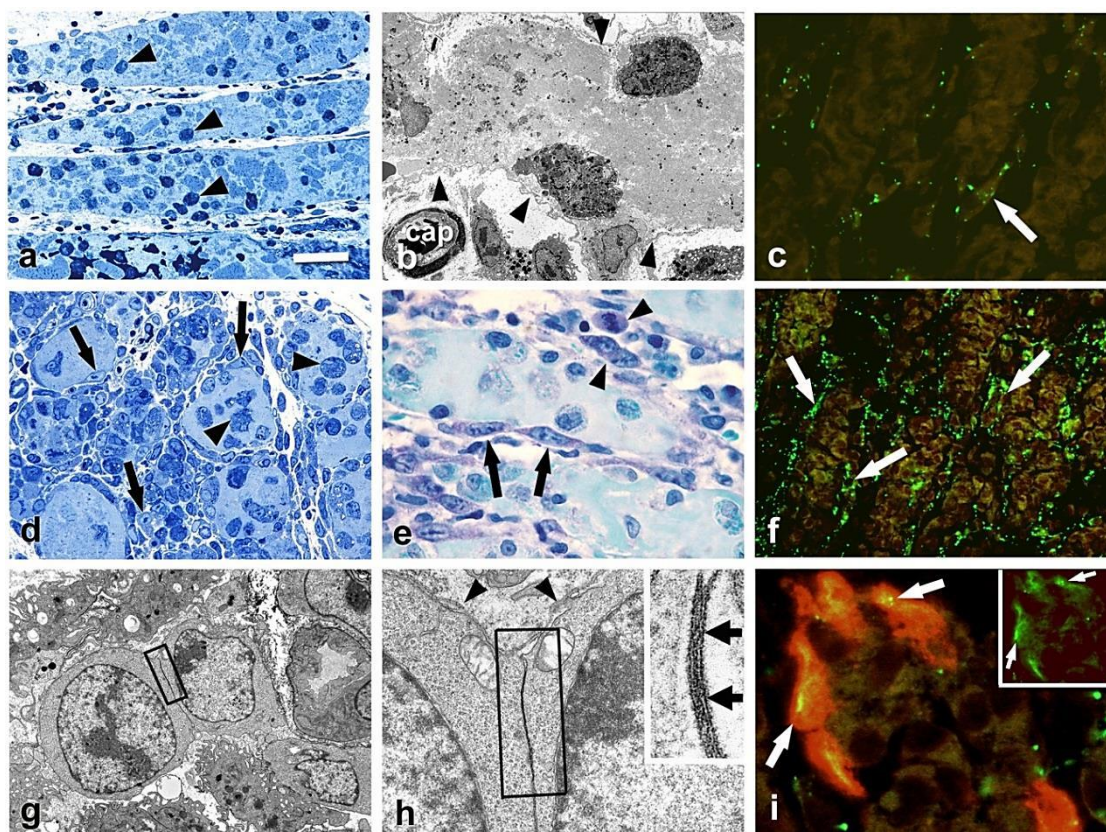


21. ábra. Desmin (a-b) és Cx43 (c-d) immunfluoreszcens reakciók (zöld) és elektronmikroszkópos vizsgálatok (e-g) patkány harántsíktolt izomban. Rendezett desmin filamentumok intakt izomrostokban (a). Notexin kezelés után 2 nappal a myoblastok is desmin pozitívak (nyílhegyek) (b). Érett izomban a Cx43 reakció a rostok között futó stoma- és endothel sejteken (c; nyilak, a keretezett rész nagyítva). Nagyszámú Cx43 plakka újszülött izomban (d), néhol a rostokon (nyílhegyek) belül is (nyilak). Az érett izomrostok sarcolemmáját (e; nyílhegyek) bazális membrán választja el, míg az ovális szatellita sejtekkel (s) azonos bazális membránon belül közvetlenül érintkeznek (nyílhegyek) „gap junction” csatornák kialakítása nélkül (f-g). Magfestés: 7-AAD (a-d; piros), m: myonucleus, f: fibroblast. Méretvonal az (a) ábrán; a, c és d: 30 μm ; b: 20 μm ; e: 3 μm ; f: 0,8 μm ; g: 0,4 μm .

„Gap junction” csatornák notexin-kezelt regenerálódó patány soleus izomban

Az izomkárosodás és a gyulladásos reakció mértéke notexin injekció után arányos volt a toxin koncentrációjával, ezért a vizsgálatainkat a m. soleus tokja (perimysium) és az injekció behatolás közötti középvolalban végeztük.

Néhány órával a notexin kezelés után neutrofil granulocyták és histiocyták szűrték be az izmot. 24 órával a kezelés után jelentős ödéma és elsősorban az izomrostokat érintő akut nekrotizáló szövetkárosodás látszott (**22a. ábra**). A feloldódott citoszeletális maradványokkal és nagyszámú aktivált macrophaggal beszűrt rostok endomysium tokja azonban intakt maradt, csakúgy, mint a rostokat körülvevő erek (**22b. ábra**). A rostok perifériáján és azon kívül néhány proliferáló (Ki67 pozitív, p21^{waf1} és p27^{kip1} negatív) Cx43 pozitív myoblast jelent meg (**22c. ábra**).



22. ábra. Notexinnel kiváltott izomregeneráció patkány soleus izomban. 1 nap után: (a-c) Acut myonekrózis, a károsodott izomrostokat macrophagok (nyílhegyek) és neutrofilek infiltrálják (a); a bazális membránok (nyílhegyek) és a kapillárisok (cap) megőrzöttek (b); a kimutatható Cx43 fehérjeszint (zöld) alacsony, de igazolható korai myoblastban is (c; nyíl). **2 nap után:** Myoblast invázió (nyílak) és nagyszámú aktivált macrophag (nyílhegyek) izom keresztmetszetben (d); a bipoláris myogenikus sejtek (nyílak), néhányuk osztódik (nyílhegyek), a megmaradt rostok mentén vándorolnak (e); jelentős Cx43 immunpozitivitás (zöld) a myoblast invázió (nyílak) megfelelően (f); A „gap junction” csatornáknak ultrastrukturális megfelelő közeli membrán összefekvés (nyílhegyek) szomszédos myoblastok között, felül, ép bazális membrán (nyílhegyek) (g-h); valamint desmin (piros) és Cx43 (zöld) kolokalizáció (sárga) a myoblastokban. Metilénkék-bázikus fukszinnal festett félvékony metszet (a, d, e), elektronmikroszkópia (b, g, h) és immunfluoreszcens reakciók (c, f, i). Méretvonal az (a) ábrán; a és d: 25 µm; b: 7 µm; c és e: 15 µm; f: 35 µm; g: 4 µm. h: 0,6 µm (inset: 0,2 µm); i: 10 µm (inset: 20 µm).

Cx43 felülreguláció a regenerálódó izmot beszűrő myoblastokban fúzió előtt

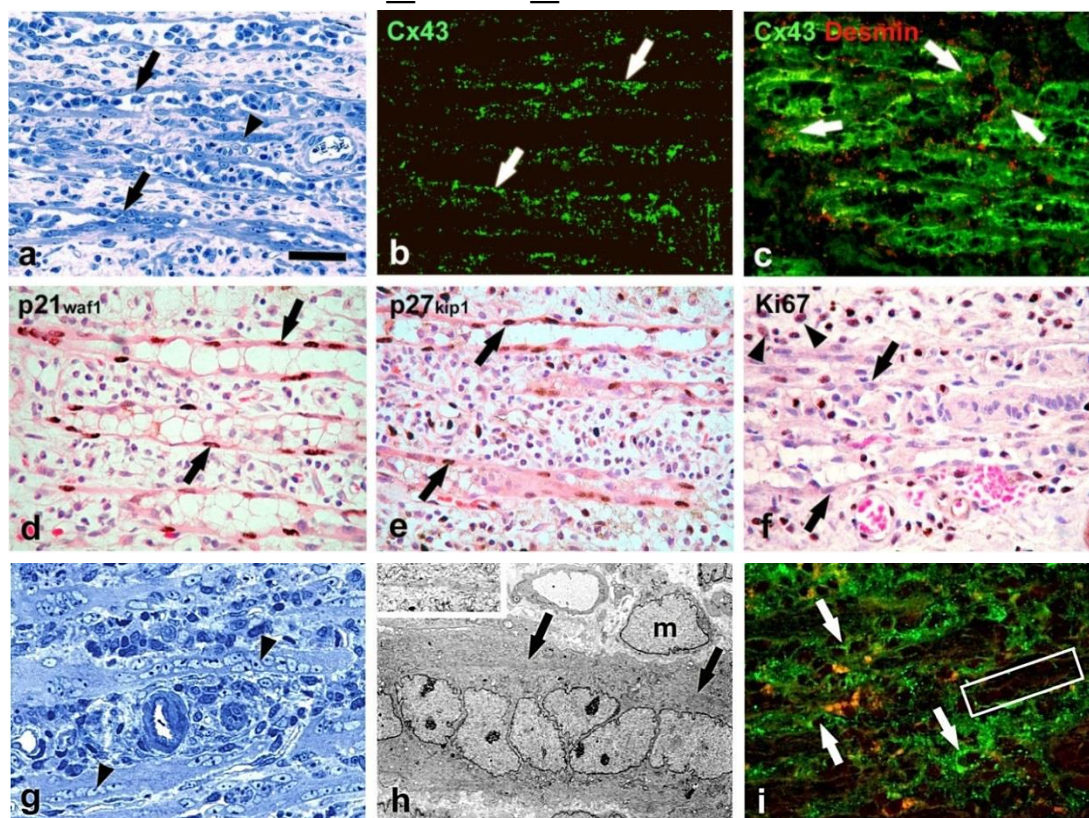
Két nappal (48h) a notexin kezelés után a szövettörmelék macrophagok általi fagocitózist masszív myoblast infiltráció kísérte (**22d. ábra**). A bipoláris orsó alakú myoblastok a megmaradt endomyseális membránok mentén gyülekeztek (**22e. ábra**) és jeletős mennyiségű pontszerű Cx43 reakciót mutattak (**22f. ábra**). Kevesebb, mint 30%-uk gyenge p21^{waf1} és p27^{kip1} sejtmagi pozitívása és 90%-uk Ki67 pozitivitása mellett. Bennük a „gap junction” direkt sejt-sejt kommunikációs csatornákat ultratrakturalisan is igazoltuk (**22g-h. ábra**) és kettős immunfluoreszcens jelölés a Cx43 és a desmin reakció kolokalizációját is bizonyította (**22i. ábra**).

p21^{waf1} és p27^{kip1} felülreguláció a sorbarendeződött myoblastokban fúzió előtt

Három nappal (72h) a notexin kezelés után az izomrostokban a sejtörmelék mennyisége a macrophag száma mérséklődött. Ugyanakkor nagyszámú myoblast sorba rendeződött az izomrostok megmaradó endomyseális bazális membránjai mentén (**23a. ábra**). Néhány myoblast csoportban a membránhatárok eltűnése, korai fúzió jelei is látszottak. A myoblast invázió és a myoblastok Cx43 pozitívításának csúcsa egybe esett (**23b. ábra**), amit kettős immunfluoreszcens reakcióval is igazoltunk (**23c. ábra**). A sorbarendeződött myoblastok döntő többsége erős sejtmagi p21^{waf1} (**23d. ábra**) és p27^{kip1} (**23e. ábra**) reakciót mutatott, miközben bennük a proliferációs marker Ki67 kifejezése megszűnt, az csak az elszórt myoblastokban látszott (**23f. ábra**).

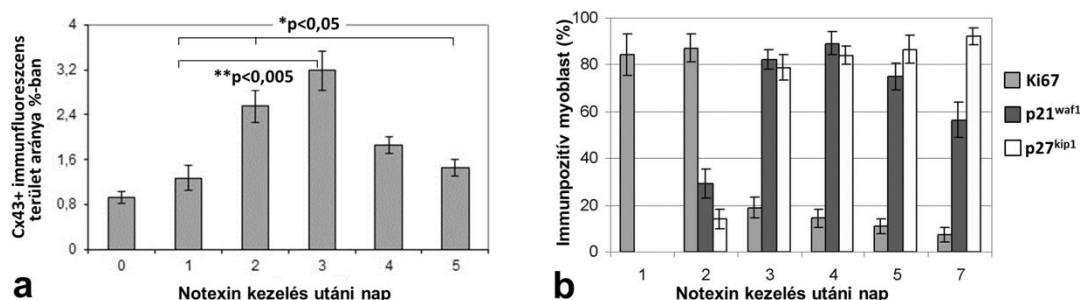
Cx43 fehérjeszint gyors csökkenése myoblast fúzió után

Négy nappal a notexin kezelés után az ödéma és a gyulladásos sejtek száma tovább mérséklődött. A legtöbb myoblast a fúziót befejezte és sokmagvú szinciciális myotubulusokat formált, melyekben korai kontraktilis elemek is megjelentek (**23g-h. ábra**). A partikuláris Cx43 reakció a myotubulus képződés során gyorsan csökkent, illetve eltűnt (**23i. ábra**), míg az elszórt nem fuzionált myoblastok még Cx43 pozitívak voltak. A Cx43 szint változását a regeneráció során mennyiségi képanalízissel vizsgálva a **24a. ábra** foglalja össze. Mindkét ciklin-függő kináz inhibitor fehérje erős pozitívítást mutatott korai myotubulusok sejtmagjaiban, majd érésük során a p21^{waf1} szintje mérséklődött, míg a p27^{kip1} szint változatlan maradt (**24b. ábra**). A desmin negatív területek Cx43 expressziója nem változott jelentősen a regeneráció alatt. Hét nappal a kezelés után az újonnan formálódott izomrostok jelentős mennyiségű kontraktilis fehérjét képeztek, de a sejtmagjaik még random helyezkedtek el és sarcoplazmájuk vakuolizált



23. ábra. Cx43 expresszió és a sejtciklus szabályozás viszonya notexinnel patkány soleus izomban kiváltott izomregenerációban. 3 nap után (a-f): A myoblastok sorbarendeződése (nyílak) és fúziója (nyílhegy) az endomysium mentén masszív gyulladásos infiltráció mellett (a); a sorbarendeződött myoblastok denz Cx43 immunfluoreszcens reakciója (zöld) (b); Cx43 (zöld) és desmin (piros) kolokalizációja (nyílak) myogénikus sejtekben (c); az erőteljes és egyenletes p21^{waf1} (d) és p27^{kip1} (e) immunreakció és hiányzó Ki67 pozitivitás (f) (nyílak), utóbbi markerre csak szabadon álló sejtek pozitívak. **4 nap után (g-i):** Sok myoblast többmagvú myotubulusokká fuzionált (g, nyílhegy), melyekben kontraktilis rostok is megjelentek (nyílak+betéti kép) (h); A myotubulusok alig, vagy nem képeznek Cx43 fehérjét (keret), míg a pre-fúziós myoblastok Cx43 pozitívak (nyílak). Metilénkék-bázikus fukszinnal festett félvékony metszet (a, g), immunfluoreszcencia (b, c, i), immunoperoxidáz reakciók hematoxilin-eozinnal felülfestve (d-f), elektronmikroszkópia (h). Méretvonal az (a) ábrán, a-f:35 μ m; g:20 μ m; h:5 μ m; i:15 μ m.

volt. Erős desmin kifejeződés mellett csak a rostok periferiáján mutattak elszórt Cx43 reakciót. A regenerációs folyamat teljessé vált a 21-28. napok között, a rostok morfológiája és Cx43 expressziója nem különbözött jelentősen az kontroll rostokétól, csupán néhány centrálisan elhelyezkedő izomsejt mag utalt a korábbi regenerációra.



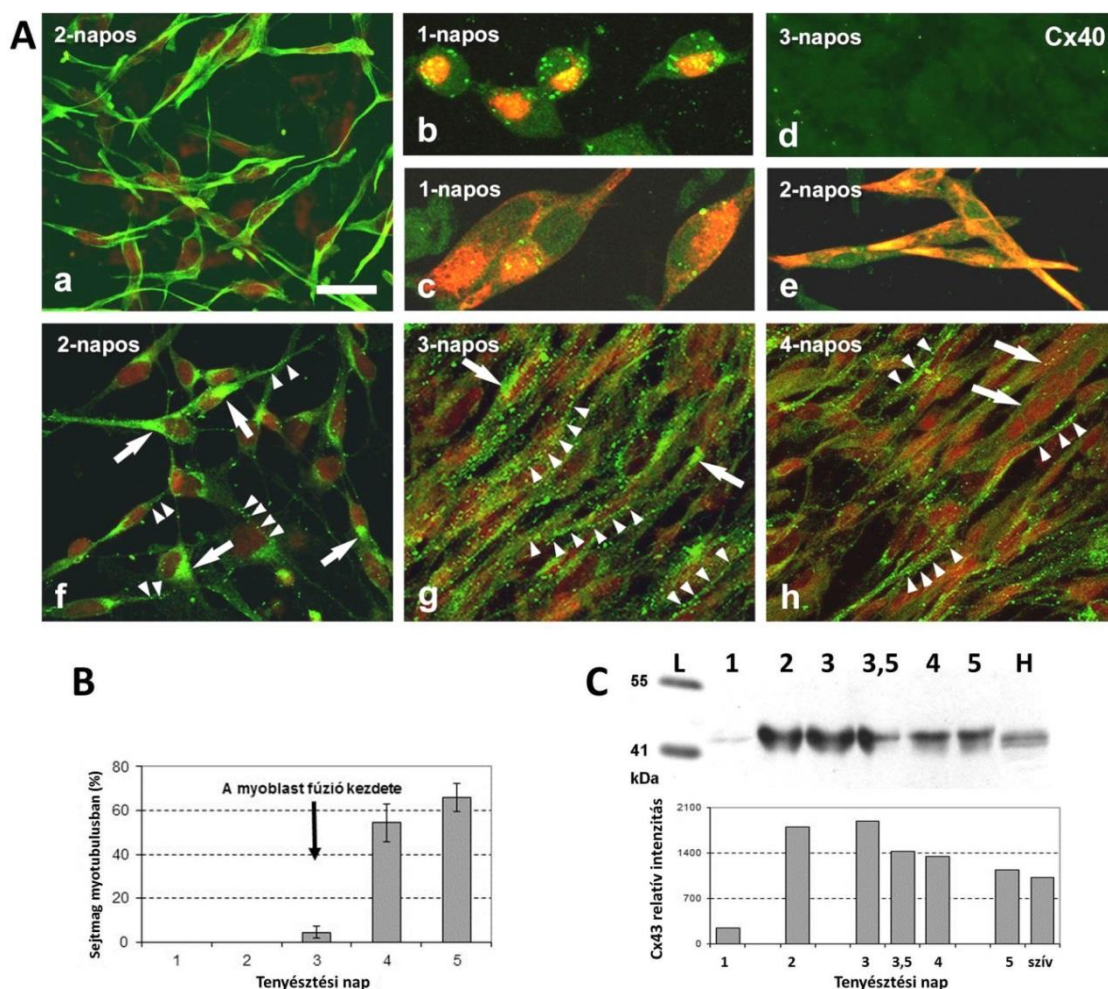
24. ábra. A Cx43 fehérje (a-d) és sejtciklus frakciók (e) meghatározása notexinnel kiváltott izomregeneráció során.

Connexin csatornák differenciálódó primer myoblast tenyészetben

A Cx43 csatornák felülregulációja a myoblast fúzió előtt

Kétnapos myoblast tenyészetben a sejtek több mint 90%-a desmin pozitív volt (25a. ábra). Cx43 fehérjét már 1 napos tenyészetekben kimutattunk a kezdetben ovális, majd elnyújtott morfológiájú, akár egymástól izolált myoblastokban is (25b-c. ábra). Az *in vivo* kísérletekhez hasonlóan Cx26, Cx32, Cx37, Cx40 és Cx45 izotípusokat tenyésztett myoblastokban sem tudunk igazolni (25d. ábra).

Kétnapos tenyészetben a bipoláris myoblastok egymással érintkeztek (25e-f. ábra). Csak



25. ábra. A Cx43 expresszió differenciálódó primer myoblast tenyészetben. A) Desmin immunpozitivitás (zöld) bizonyítja a sejtek myogenikus elkötelezettségét (a). Pontszerű Cx43 reakció (zöld) desmin pozitív (piros) ovális, szabadon álló (b) és elnyújtott, érintkező sejtekben (c) 1-napos tenyészetben. Konfluens, 3-napos myoblast tenyészet nem mutat Cx40 reakciót (d). Bipoláris egymással érintkező Cx43 (zöld) és desmin (piros) kettős pozitív myoblastok 2-napos tenyészetben (e), ahol kevesebb Cx43 jel látszik a sejtmembrán mentén (nyílhegyek), több paranukleárisan a citoplazmában (nyilak) (f). 3-napos konfluens tenyészetben az egyirányba rendeződött myoblastokon a Cx43 jelek zöme a sejtmembrán mentén (nyílhegyek), kevés a citoplazmában (nyilak) látszik (g). 4-napos tenyészetben a multinukleáris myotubulusok alig hordoznak Cx43 reakciót (nyilak), míg a mononukleáris myoblastok Cx43 pozitívak (nyílhegyek; h). A sejtfúzió a 3. naptól progresszív emelkedést mutat (B). A Western blot analízis a Cx43 szintek immunfluoreszcens reakciókhoz hasonló változását jelzi (C). L: molsúly létra. Méretvonal az (a) ábrán; a, d, e: 15 µm; b: 6 µm; c: 4 µm; f-h: 10 µm.

kevés pontszerű Cx43 jel rendeződött a sejtmembránok mentén, a reakció döntő része paranukleáris, citoplazmatikus volt. Sejtfúzió jelei nem látszóttak. Három nap után a döntően konfluens tenyészetek alakultak ki, az elnyújtott myoblastok egymással érintkezve, párhuzamosan rendeződtek. A sejtmembrán mentén elhelyezkező Cx43 pozitív plakkok száma jelentősen nőtt a citoplazma pozitivitás rovására (**25g. ábra**). Néhány bi-trinukleáris sejt jelezte a myoblast fúzió kezdetét.

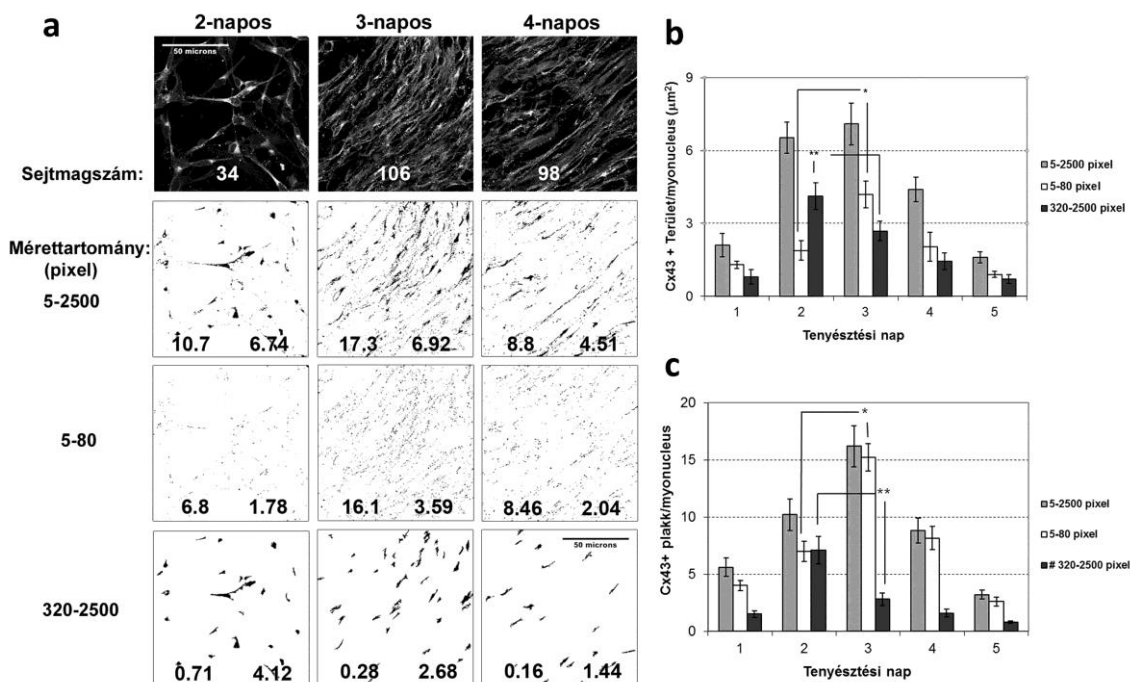
Négy nap után többmagvú, desmin pozitív myotubulusok jelentek meg. A Cx43 reakció a mononukleáris myoblastokra korlátozódott, a myotubulusokban alig, vagy nem volt (**25h. ábra**). Az 5-6. napra a sejtek többsége többmagvú myotubulusokat formált, kevés Cx43 reakcióval. Hét nap után a tenyészeteket nagy myotubulusok és emelkedő számú pusztuló myogenikus sejt jellemezte. A myotubulusokba foglalt sejtmagszám arányát az összejtszámhoz képest (fúziós index) a **25B. ábra** mutatja. A myoblast tenyészetekből izolált fehérje Western blot analízise a Cx43 expresszió immuncitokémiával megfigyelt időbeli szabályozását megerősítette (**25C. ábra**).

A citoplazma és sejtmembrán Cx43 frakciók mennyiségi analízise

Digitális képanalízissel a sejtmembránhoz kötött száz különálló Cx43 jel méretének átlaga $1,02 \pm 0,55 \mu\text{m}$ ($5,8 \pm 3,1$ pixel) volt, így az 5-80 pixel tartományt választottuk ezek automatizált meghatározására. A nagy citoplazma aggregátumok legkisebb átmérője átlagosan ennek négyszerese volt, ezért meghatározásukhoz a 320-2500 pixel tartományt választottuk. A kétféle méret-frakció (5-80-ig és a 320-2500-ig) a Cx43 pozitív immunfluoreszcens jelek döntő többségét lefedte, közel megegyezett a 5-2500 pixel tartományban mért jelek összegével. Az eszerint meghatározott Cx43 kifejeződést és méret szerinti eloszlást differenciálódó myoblast tenyészetben a **26. ábra** mutatja. Szignifikánsan nagyobb mennyiségű Cx43 fehérje képződött 2- és 3-napos myoblast tenyészetekben, mint előtte vagy utána (**26a-b. ábra**). A sejtmembrán Cx43 frakció 3 napos tenyészetben szignifikánsan emelkedett, míg a citoplazma frakció csökkent a 2-napos tenyészetekhez képest (**26c. ábra**).

A funkcionális festék-transzfer szignifikáns emelkedése myoblast fúzió előtt

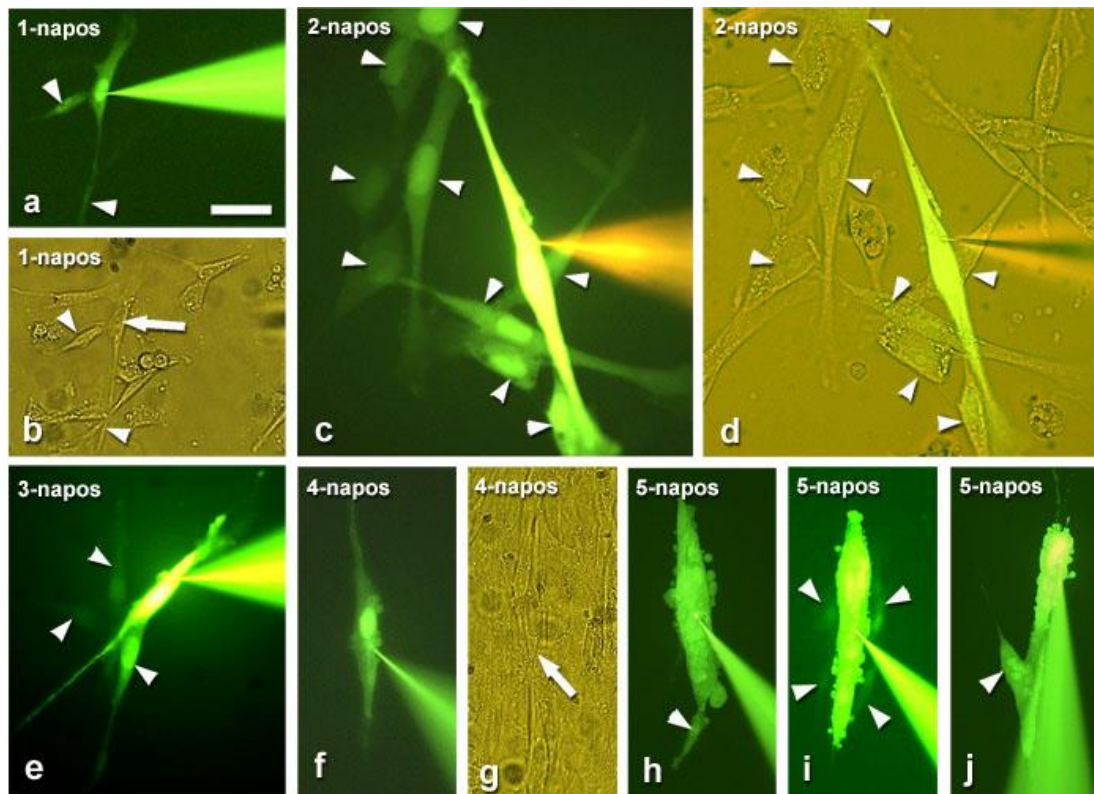
A primer myoblast tenyészeteket lucifersárga, vagy kaszkádkék és FITC-dextrán elegyével mikroinjektáltuk. A fuzionáló sejtek kizárására, nem tekintettük connexin



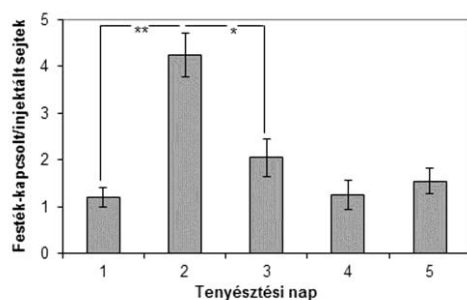
26. ábra. A Cx43 immunpozitivitás mennyiségi analízise szubcelluláris lokalizáció szerint, differenciálódó primer myoblast tenyésztetben. Reprezentatív példák a meghatározás menetére és a mérettartományok szétválasztására digitális képanalízis alapján (a). A sejtmagokra eső immunjelek száma a képek bal alsó sarkában, az immunfettett területek aránya (μm^2 /sejtmag) a képek jobb alsó sarkában látszik. A mért Cx43+ területek átlaga sejtmagonként (b) és a Cx43 plakkok számának átlaga sejtmagonként (c) a sejtmembrán frakció (5-80 pixel), a citoplazmatikus aggregátumok (320-2500 pixel) és az összes immunjel (5-2500 pixel) külön ábrázolásával. A citoplazma frakció 2-napos tenyésztetben, míg a sejtmembrán frakció a 3-napos tenyésztetekben emelkedett szignifikánsan (** $p < 0,005$; * $p < 0,05$).

csatornákon történő kapcsolódásnak azokat az eseteményeket, ahol a nagyobb FITC-dextrán is megjelent szomszédos sejtekben. Egynapos tenyésztetben a lucifersárga átjutását regisztráltuk 1-2 érintkező sejtbe (27a-b. ábra). Kétnapos tenyésztetben a festék már megjelent az injektált sejtől 2-3 távolabbi sejtrétegben is (27c-d. ábra). Háromnapos tenyésztetben a myoblastok metabolikus kapcsolódása mérséklődött a kétnaposhoz képest (27e. ábra). A junkcionális festéktranszfer négynapos tenyésztetben és később a myotubulusok progresszív megjelenésével gyorsan csökkent (27f-g. ábra). Ritkán a korai myotubulusok és myoblastok között (27h-i. ábra), valamint korai myotubulusok között is megfigyeltünk funkcionális kapcsolódást (27j. ábra).

A csatorna-átjárható kaszkádkék és csatorna impermeabilis FITC-dextrán kombinált alkalmazása is hasonló eredményt adott (28. ábra). A 2-naposhoz képest 3-napos tenyésztetben nagyobb mennyiségű sejtmembránhoz lokalizált Cx43 fehérje kevésbé hatékony metabolikus kapcsolatot engedett meg, ami arra utal, hogy a csatornák permeabilitása a 3. napra jelentősen lecsökken, a fúziót közvetlenül megelőző időszakra.



27. ábra. Lucifer sárga festék-transzfer a funkcionális „gap junction” kommunikáció igazolására primer myoblast tenyészetben. Epifluoreszcens (a, c, e, f, h-j) és fázis kontraszt (b, d, g) képek, a metabolikusan kapcsolt sejteket nyílhegyek jelölik. Festék-transzfer ritka 1-napos tenyészetben (a-b). Erőteljes metabolikus kapcsolódás kétnapos myoblastok között (c-d), ami mérséklődött 3-napos tenyészetben (e) és megszűnt konfluens 4-napos tenyészetben (f-g). A nyíl a mikrokapilláris behatolási helyét jelzi. Ritka kapcsolódás myotubulusok és szomszédos myoblastok (h-i) és korai myotubulusok (j) között 5-napos tenyészetekben. Méretvonal az (a) ábrán; a, b: 15 μm ; c, d: 8 μm ; e-g: 10 μm ; h-j: 25 μm .



28. ábra. Kaszkádkék festék-transzfer, differenciálódó primer myoblast tenyészetben. A kapcsolt/injektált sejtek számának hányadosa (a transzfer hatékonysága) szignifikáns csúcsot mutat 2-napos tenyészetben (** $p < 0,01$; * $p < 0,05$) a megelőző és azt követő időpontokhoz képest.

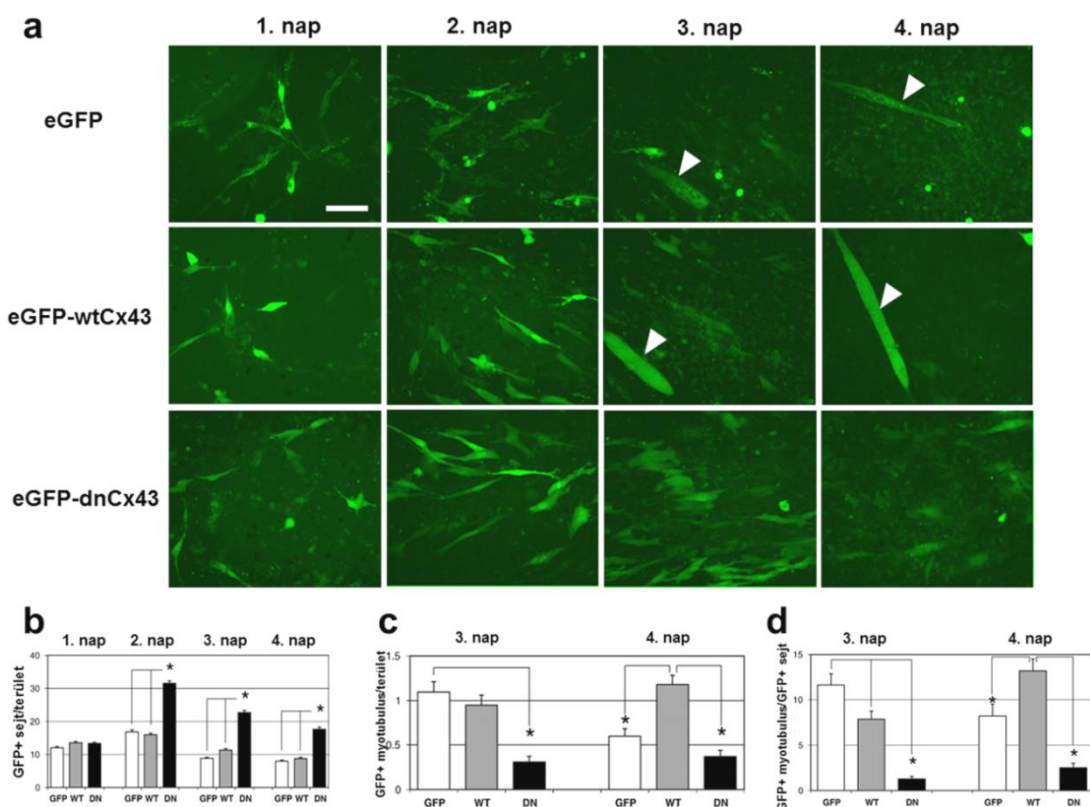
Cx43 génmanipuláció hatása primer myoblast tenyészet differenciálódására

Fedőlemezen tenyésztett 2 napos myoblast kultúrákat zöld fluoreszcens fehérjét is kifejező pIRES2-eGFP vektorral önmagában (GFP), illetve vad típusú Cx43 gént hordozó vektorral (wtCx43), vagy C-terminális csonkolt, domináns negatív Cx43 csatornákat létrehozó vektorral (dnCx43) transzfektáltak. Először a transzekció egyenletességét 12 párhuzamos egynapos GFP tenyészetben egyenként 21 látótérben vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy átlagosan a sejtek 14,6% (min:11,2%, max 17,4%)

fejezte ki a zöld fluoreszkáló fehérjét. Hasonló hatékonyságú volt a másik két konstrukció beépülése is.

A módosított Cx43 expresszió hatása a sejtszámra és a myotubulus képződésre

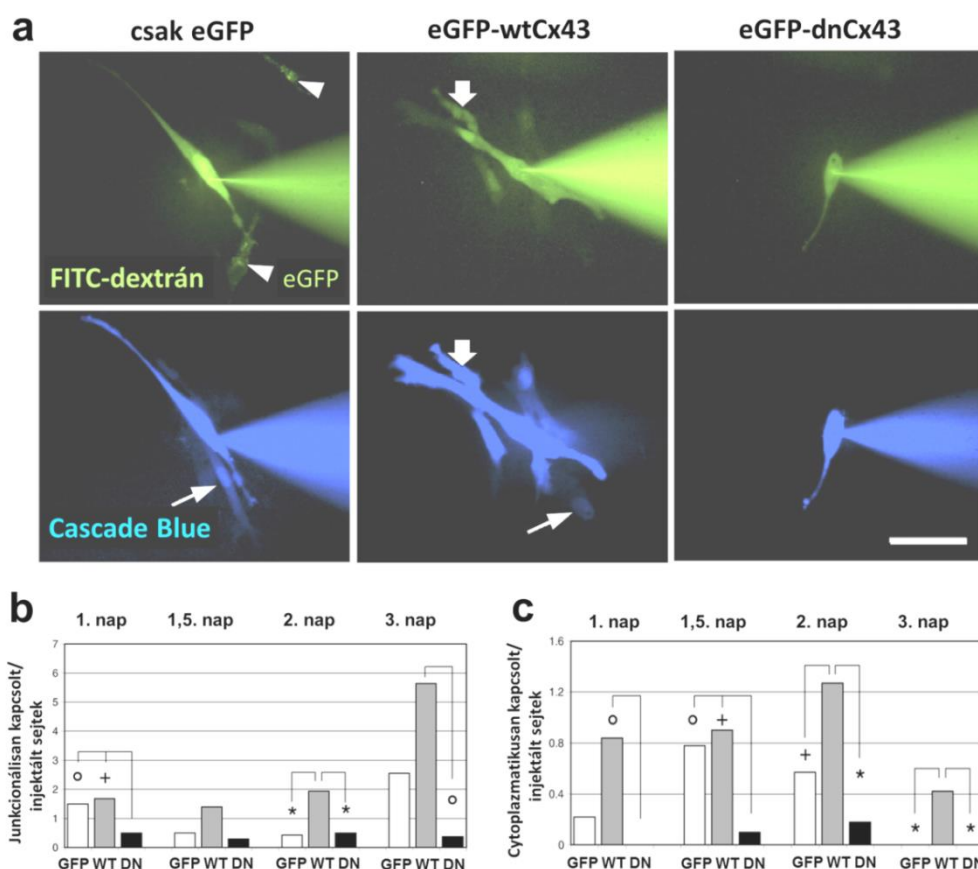
A wtCx43 (WT) génkonstrukció a funkcionáló csatornák felülregulációját, míg a dnCx43 (DN) konstrukció azok számának csökkenését eredményezte. A myoblast differenciáció 3-6. napjai között (1-4 nappal a transzfekció után) minden konstrukcióval 4 párhuzamos tenyészet 6-10 látóterét tanulmányoztuk (**29. ábra**). A GFP pozitív sejtek száma 1 nappal a transzfekció után nem különbözött jelentősen egymástól az eltérő konstrukciót hordozó tenyészetekben (**29a-b. ábra**). Kétnapos transzfektált tenyészetekben a fluoreszkáló sejtek száma GFP és a WT kultúrákban mérsékelten, míg a DN kultúrákban szignifikánsan emelkedett. A tenyésztési napok előrehaladtával mindegyik konstrukcióban hasonló mértékben csökkent a transzfektált sejtek aránya, így a szignifikáns különbség a DN tenyészetek javára fennmaradt.



29. ábra. Myoblast tenyészetek differenciálódása zöld fluoreszcens fehérjével jelzett génkonstrukciókkal történő transzfekció után. Egy nap után a transzfektált sejtek száma nem különbözött a csoportok között (a, b). Két nap után a gátolt csatornafunkciók a dnCx43 (DN) csoportban a transzfektált myoblastok számának szignifikáns (* $p < 0,05$) emelkedéséhez vezettek a másik két csoporthoz képest. Három nap után a myotubulusokban foglalt transzfektált fluoreszkáló sejtek száma a wtCx43 (WT) csoportban volt szignifikánsan magasabb, mint a DN csoportban (c, d), ami 4 nap után már mind a DN, mind a csak eGFP transzfektált csoport értékeit is szignifikánsan meghaladta. Méretvonal: 50 μ m.

Három nappal a transzfekció után szignifikánsan nagyobb számban képződött myotubulus mind a GFP, mind a WT tenyészetekben, a DN tenyészetekhez képest (**29c. ábra**). Különösen szembeötlő volt ez a különbség, ha a myotubulusokban foglalt GFP+ sejtek számát az összes GFP+ sejtszámhoz hasonlítottuk (**29d. ábra**). Vagyis a több GFP+ myoblast és a szignifikánsan alacsonyabb számú GFP+ myotubulus, a fokozott proliferációt és gátolt differenciálódást jelezte a DN tenyészetekben. Négy nappal a WT transzfekció után, a myotubulusok GFP+ sejtszáma szignifikánsan meghaladta nemcsak a DN csoportét, de a csak GFP-t kifejező tenyészetekét is.

Módosított Cx43 expresszió hatása a myoblastok közötti metabolikus kapcsolatokra
Kettős festék mikroinjektálását követően vizsgáltuk a connexin csatornák által közvetített jukcionális (kaszádkék), illetve a sejtfúzióhoz kapcsolt citoplazmatikus (FITC-dextrán) festéktranszfer gyakoriságát Cx43 génmanipulált myoblast tenyészetek differenciálódása



30. ábra. Funkcionális festék-transzfer differenciálódó myoblastokban a Cx43 csatornák genetikai módosítása után. Konfluens 3-napos tenyészetekben, 1 nappal a transzfekció után injektált, csak GFP transzfektált myoblastból FITC-dextrán nem (nyílhegyek – GFP fluoreszcencia), csak kaszkádkék festék jutott át legalább egy szomszédos sejtbe (jukcionális kapcsolat, nyíl), míg a wtCx43 transzfektált myoblastból, mind FITC-dextrán (citoplazmatikus kapcsolat, vastag nyíl), mind kaszkádkék átjutott szomszédos sejtekbe. A dnCx43 transzfektált sejtbe jutott kettős festék nem jelent meg egyetlen szomszédos sejtben sem. A jukcionális és citoplazmatikus kapcsolatok gyakoriságának eltéréseit a b és c ábrák foglalják össze. * $p < 0,0025$; + $p < 0,01$; ° $p < 0,025$. Méretvonal: 30 μ m.

során (**30. ábra**). A Közel 20 GFP+ sejt mikroinjektálását végeztük el minden csoport minden vizsgált időpontjában. Egy nappal a génmanipuláció után (3 napos tenyészet) a csak GFP transzfektált sejtek 72%-a (13/18) mutatott kapcsolódást, ebből 16% volt a fúzió kezdetét jelző citoplazmatikus kapcsolat. A WT csoportban 90%-os (17/19) gyakoriságú kapcsolódásból 37% (7/19) volt citoplazmatikus. A kapcsolódási gyakoriság a DN csoportban szignifikánsan a legalacsonyabb 36% volt (5/14) (GFP vs dnCx43, $p < 0,005$; wtCx43 vs dnCx43 $p < 0,002$), amely mind junkcionálisnak bizonyult.

Másfél nappal a transzfekció után arányaiban tovább nőtt a citoplazmatikus kapcsolódás. A GFP csoportban 50%-ra (7/14), a WT csoportban 90%-ra (9/10), míg a DN csoportban alig ért el 10%-ot. Két nappal a transzfekció után ezek a tendenciák továbbra is fennmaradtak a csoportok között. Három nappal a transzfekció után a GFP csoportban minden kapcsolódás (44%, 8/18) junkcionális volt, a WT csoportban a 86% (12/14) összes kapcsolatból 22% volt junkcionális, míg a DN csoportban az összes kapcsolódás (25%, 4/16) junkcionális volt, fúzióra utaló jelek nélkül. A WT csoportban mind a junkcionális, mind a citoplazmatikus kapcsolatok mindvégig szignifikánsan meghaladták a DN csoportban mért értékeket (**30b-c. ábra**). A morfológiai megfigyeléseket alátámasztva ez a WT csoportban korai differenciálódást és intenzív sejtfúziót bizonyította. Ugyanakkor a kommunikációs csatornák gátlása a DN csoportban a metabolikus kapcsolódás gátlása mellett fokozott proliferációt és retardált myoblast fúziót igazolt.

7.4. Megbeszélés

Funkcionáló Cx43 csatornák mindkét modellben a szatellita sejtekből kiinduló, korai myogenikus elkötelezettséget mutató és proliferáló myoblastok citoplazma, majd egymással érintkező sejtmembrán régióiban szaporodtak fel, végül a myoblast fúziót követően gyorsan eltűntek. Sorbarendeződött prefúziós myoblastokban Cx43 csatornák, valamint a $p21^{waf1}$ és $p27^{kip1}$ ciklin-függő kináz inhibitorok szignifikáns és szinkron felülregulációja, a proliferációs marker Ki67 fehérje eltűnése mellett, a direkt sejt-sejt kommunikáció szerepére utalt a myoblastok sejtciklus szabályozásában és a fúziójuk szinkronizálásában. Ezt igazolta a génmanipulációval indukált fokozott Cx43 kifejeződés és metabolikus kommunikáció hatására kialakult korai, ill. a genetikailag gátolt csatornák okozta késleltetett myotubulus képződés is.

A myogenezis során több munkacsoport megfigyelte a connexin csatornákat, a sejt-sejt kommunikációt és a connexinek drasztikus csökkenését myoblast fúzió után (288, 290,

292, 300), de nem definiálták a sejtek proliferációs állapotát és nem tisztázták a fúzió körüli folyamatok dinamikáját (295, 314). Legtöbbsen sejtvonalakat és nem primer tenyészeteket használtak és nem vizsgálták mennyiben felelnek meg az *in vitro* és *in vivo* viszonyok egymásnak (294, 296, 297, 315). Mi a korai izodifferenciálódás folyamatában fiziológiailag releváns stádiumokat határoztunk meg és azonos állatfajban vizsgálva igazoltuk, hogy a szatellitasejtek hasonló myogenikus program mentén és ütemben differenciálódnak szinciciális myotubulusokká primer tenyészetben, mint myotoxikus hatásra bekövetkező *in vivo* regeneráció során.

Az izomregeneráció kezdetén a szatellitasejtek aktiválását a károsodott rostokból felszabaduló növekedés faktorok, a myoblast proliferációt szérumban mitogének indukálják, például az FGF2 a p42/p44 MAP kináz útvonal aktiválásával (316-318). Kommunikációs csatornákat nyugvó szatellita sejteken nem, csak elkötelezett myoblastokban tudtunk igazolni. A szabadon álló myoblastok sejthátárán kimutatott Cx43 valószínűleg a teljes csatornákkal azonos módon szabályozott félcsatornákat jelölte (77).

A myotoxikus izomregenerációs modellben a korábbi közleményekkel megegyezően a tigriskígyó méreg notexin, A2-es típusú foszfolipáz aktivitásával szelektív myonekrózist okozott, amit intenzív gyulladásos reakció és gyors izomregeneráció követett (303, 310, 311). A macrophagok szolubilis faktorai alapvetően fontosak a myoblast proliferáció, kemotaxis és differenciálódás folyamataiban (319-321). Ezzel összhangban a myoblast invázió és sorbarendeződés mértéke kísérletünkben arányos volt a macrophag infiltrációval, ami az izomrostok kötőszövetes vázának megtartottsága mellett biztosította a hatékony regenerációt a súlyos szövetkárosodás ellenére.

A térben és időben magasan szervezett szinciciális sejtfúzióhoz a myoblastok összehangolt kilépése szükséges a sejtciklusból, amit többek között a ciklin-függő kináz gátló p21^{waf1} és p27^{kip1} fehérjék szabályoznak (322, 323). A myoblast túlélésében és sejtciklus kontrolljában alapvető szerepe van a p21^{waf1} MyoD függő, vagy attól független aktiválásának (307, 323). Másrészt a fokozott Cx43 kifejeződés emeli a p27^{kip1} fehérje szintjét, gátolja a G1-S fázis átmenetet, így a sejtciklust tumorsejt vonalakban (120, 121). Regenerációs kísérletünkben a Cx43 felülregulációja együtt járt a p21^{waf1} és p27^{kip1} szintek egységes emelkedésével sorbarendeződött prefúziós myoblastokban miközben a proliferációs marker Ki67 szintje drasztikusan csökkent. A p21^{waf1} szint Cx43 csatornákon keresztüli felülregulációját szomszédos sejtekben (324) tovább erősítette azt a feltevésünket, hogy a kommunikációs csatornák, közvetlenül, vagy közvetve szerepet

játszanak az érintkező myoblastok sejtciklus gátlásának szinkronizálásában, a hatékony sejtfúziót támogatva (300).

A Cx43 expresszió és a myoblastok pre-fúziós sorbarendeződésének dinamikája mindkét kísérleti rendszerben megegyezett, a fúzió korai jeleit, myotubulusok képződését 3 nap után figyeltük meg. A csak szimpla csatorna-átjárható festékekkel végzett funkcionális tesztek a fúzió környékén félrevezető eredményre vezethetnek. Így, például Araya és mtsai (2005) (314) erős korrelációt talált a Cx43 expresszió, a csatornafunkciók és a fúzió között. Azonban megfigyeléseink arra utaltak, hogy a fúzió környékén regisztrált erőteljes festéktranszfer részben a citoplazmatikus kapcsolódás, vagyis a kezdeti fúzió eredménye, ezért kettősfesték mikroinjektálással a két eseményt szétválasztottuk. A csatornapermeábilis festékek átjutása szomszédos sejtekbe a fúzió előtt a funkcionális kapcsolatokat, míg a csatorna-impremeábilis FITC-dextrán átjutása elsősorban a sejtfúziót (citoplazmatikus kapcsolat) jelezte. A Cx43 csatornák hasonló dinamikájú permeabilitást mutattak a mindkét csatorna-átjárható festék mikroinjektálásakor (129).

A funkcionális myoblast kapcsolódás hatékonysága szignifikánsan jobb volt a myoblast sorbarendeződése előtt, amikor a Cx43 frakció nagyrésze ugyan citoplazmatikus volt, de festék az injektált sejtől 2-5 sejtávolságban is megjelent; mint sorbarendeződés után, amikor a Cx43 membrán frakció bár megkétszereződött, de csak 1-2 sejt távolságban észleltünk festéktranszfert. Tehát, sorbarendeződött 3 napos myoblastokban kétszer annyi Cx43 csatorna csak felannyi metabolikus kapcsolatot közvetített, mint a korábbi 2 napos tenyészetben, vagyis utóbbi esetben a kommunikáció négyszer hatékonyabb volt. Fúzió-kompetens myoblastokban az intenzív csatornafunkciókat követő sejtciklus gátlás támogatja a Cx43 csatornák szerepét a sejtciklus szinkronizálásában a nagyléptékű sejtfúzióhoz.

Hatféle connexinből csak Cx43 izotípust igazoltunk patkány izomban mind *in vivo*, mind sejtenyészetben. Faj és fejlődési stádiumhoz kötötten azonban egyéb izotípusokat is kimutattak, így Cx36, Cx42 és 45 izotípusokat csirke myotom és/vagy dermomyotom összelvényekben (325), egér embrióban Cx43 (326), Cx39 (327) és Cx40 (289) izotípusokat, valamint Cx43 és Cx45 izotípusokat regenerálódó egér myoblastokban (314). Azonban *in vivo* differenciálódó egérizomban is csak a Cx43 genetikai ablációja játszott kritikus szerepet (314), hasonlóan a manipulált L6 patkány myoblast (294), ill. a C2C12 egerből származó (288) myogenikus sejtvonalakhoz.

Modelljeinkben kettős immunjelöléssel igazoltuk a tanulmányozott sejtek myogenikus természetét, ami mások munkáiból gyakran hiányzott (288, 295, 296), pedig hasonló

morfológiájú mesenchymális sejtek, így stromális fibroblastok, vagy endothel sejtek is mutathatnak Cx43 kifejeződést (328, 329).

A myoblastok genomjába épült C-terminális trunkált dnCx43 konstrukció intracelluláris vándorlásában gátolt csatornafehérjét eredményez, ami ha be is beépül connexon hexamerekbe szignifikánsan gátolja azok funkcióját (313). A transzfekció hatékonysága minden konstrukcióval hasonló volt, így a funkcionális különbségek jellemzőnek tekinthetők az adott csoportra. A wtCx43 csoport fokozott festéktranszfert mutatott korábbi myoblast fúzió és myotubulus képzés mellett, mint a csak GFP-t kifejező kontroll tenyészetek. Ezzel szemben a dnCx43 csoport myoblastjai tovább proliferáltak, korlátozott festéktranszfert mutattak, minimális, vagy hiányzó myoblast fúzió mellett, mind a csak GFP-t kifejező, mind a wtCx43 csoporthoz képest. Ezek a megfigyelések alátámasztják a Cx43 csatornák kritikus szerepét a korai izomdifferenciálódás szabályozásában, az *in vivo* eredményekkel összhangban. A kommunikációs csatornák blokkolását követő gátolt, vagy késleltetett myoblast fúzió (295-297, 314), valószínűleg a fúzió-kompetens posztmitotikus myoblastok hiányával magyarázható a szinkronizálatlan sejtciklus kontroll miatt. Ezt támogatja, hogy a sejtciklus inhibitor p21^{waf1} aktiválására képes korai myogenikus faktor MyoD szintje is jelentősen csökken a Cx43 csatornák genetikai gátlásának hatására (306, 314).

Az izomdifferenciálódás Cx43 csatornákon történő szabályozásának lehetséges molekuláris mechanizmusai között a cAMP és a Ca²⁺ szintek szabályozása és közvetítése szerepelhet. Mind a teljes csatornák, mind a félcsatornák közvetíthetnek intracelluláris Ca²⁺ hullámokat (10, 77), melyek a myoblastok migrációját, végdifferenciációját és fúzióját is meghatározzák (312, 330, 331). Az intracelluláris Ca²⁺ szint döntően befolyásolja a sejt migrációt közvetítő actin filamentumok depolimerizációját (332). Bár harántcsíkolt izomban nem tisztázott, idegi prekurzorokban és vasculáris simaizomban, a kommunikációs csatornák intracelluláris Ca²⁺-hullámok közvetítésével, például a II-es típusú kalcium/kalmodulin-függő protein kinázt aktiválva, részt vesznek a sejt vándorlás szabályozásában (333, 334). A korai myoblast differenciálódás során a Cx43 csatorna funkciót támogató cAMP szintje is átmenetileg megemelkedik (335-338). Tartósan magas cAMP szint azonban gátolja a fúziót (339), ami a cAMP és Cx43 csatorna promotor retinolsavval történő kezeléssel is elérhető (340, 341). Ugyanakkor a myoblast fúzióhoz elengedhetetlen PKC aktiválás és emelkedett intracelluláris Ca²⁺ szint (342-344), zárja a Cx43 csatornákat (345). A sorbarendeződött myoblastok csökkent metabolikus kapcsolata feltehetően a fúzió kezdeti jeleként is értékelhető.

Összegezve, a haráncsíkt izomrostok fejlődése mononukleáris progenitor myoblastokból egy összetett többlépcsős folyamat, amely nagyszámú sejt összehangolt együttműködését igényli. A koordinált sejtmembrán fúzióhoz számos ciklusban keletkezett myoblastok összehangolt vándorlása, sorbarendeződése és sejtciklus kontrollja szükséges, amiben a connexin csatornák zajló metabolikus kommunikáció fontos szerepet játszik.

7.5. Összefoglalás – Az eredmények újdonságtartalma

Patkány *in vivo* és *in vitro* izomdifferenciálódási modellekben igazoltuk, hogy:

- a Cx43 csatornák progresszíven képződnek a korai, proliferáló myogenikus sejtekből kiindulva a myoblastok prefúziós sorbarendeződéséig, majd gyorsan eltűnnek a myoblast fúziót követően;
- indukált izomregeneráció során myoblastokban a funkcionáló Cx43 csatornák progresszív felülregulációját a p21^{waf1} és p27^{kip1} ciklin-függő kináz inhibitor pozitív sejtfrakció szignifikáns és szinkron emelkedése kíséri a proliferációs Ki67 pozitív myoblast frakció rovására; és
- a génmanipulációval felülregulált Cx43 csatornák korai sejtfúziót és emelkedett számú myotubulust eredményeznek, míg a genetikailag gátolt csatornák fokozott myoblast proliferációt és késleltetett myotubulus képződést okoznak.

Eredményeink igazolják a Cx43 kommunikációs csatornák szerepét prefúziós, sorbarendeződött myoblastok sejtciklus kontrolljának összehangolásában, ami a hatékony szinciciális fúzió és myotubulus képződés alapfeltétele. Megfigyeléseink felvetik annak a lehetőségét is, hogy intakt stromális váz mellett a Cx43 kommunikációs csatornák farmakológiai felülregulálásával az izomkárosodást követő regeneráció felgyorsítható, ill. támogatható. A Cx43 csatornák szerepe a myoblast vándorlás összehangolásában és a myoblast fúzió közvetlen indukálásában sem zárható ki.

8. Connexin 43 expresszió és csatornafunkciók óriássejtes csonttumorban

8.1. Bevezetés

A connexinek, különösen a Cx43 izotípusú membrán csatornák, fontos szerepet játszanak a csontfejlődésben az osteoblast proliferáció és érés, valamint az osteocyták mechanikus és hormonális ingerekre adott adaptációs válaszainak szabályozásában (179, 346, 347). A Cx43 fehérjét kódoló GJA1 gén misszenz mutációi az autoszomális dominánsan öröklődő oculodentodigitális dysplasia (ODDD) szindrómát okozzák, mely szisztémás csontfejlődési rendellenességekkel is jár (87). Egér modellekben, mind a GJA1 gén ablációja, mind a chondro-osteogenicus sejtekben indukált ODDD-szerű mutációk, késői csontosodáshoz és a csontok hypomineralizációjához vezetnek, osteoblast diszfunkció, redukált osteoprotegerin termelés és fokozott osteoclastogenezis révén (346). Az óriássejtes csonttumor (“giant cell tumor of bone”, GCTB) egy benignusnak tartott, de lokálisan agresszív osteolitikus lézió, ahol a kóros osteoclastogenezist elsősorban a neoplasztikus, osteoblast eredetű stromasejtek szabályozzák (348-350). Ezért izolált neoplasztikus GCTB stromasejtekben tanulmányoztuk Cx43 fehérje expresszióját és a connexin csatornák működését, valamint, primer és recurrens óriássejtes csonttumorkban vizsgáltuk a Cx43 expresszió és a kliniko-radiológiai tumor stádium, valamint a progressziómentes túlélés lehetséges összefüggéseit (351).

A GCTB gazdaságilag fejlett nyugati országokban a csonttumorkok ~5%-át, míg dél-ázsiai országokban akár 20%-át is adhatja (348, 352). Elsősorban fiatal felnőttek (20-45 évesek) csöves csontjainak epi-metaphyseális régiójában okoz progresszív csontdestrukciót (353, 354). A daganat sebészeti ellátásának fejlődése, mely a daganat kikaparásával kombinált fenol majd metil-metakrilát gyanta alkalmazását, ill. kriosebészeti beavatkozással kombinált metakrilát műgyanta kezelést jelent, ellenére a GCTB recidivák gyakorisága, még mindig 8-27% (355). A GCTB 10%-ban malignusan transzformálódhat, 1-4%-ban áttétet képezhet elsősorban a tüdőben, melyet egyesek benignus implantátumnak tartanak (356-358).

A GCTB osteoclast típusú óriássejtekből és mononukleáris sejtekből áll. Utóbbiak fő komponensei az osteoclast prekursor monocyta/histiocyta sejtek és a osteoblast típusú stromasejtek (349). Kromoszóma instabilitás, klonális telomer asszociációk és a sejtproliferációt szabályozó H3F3A gén gyakori driver mutációi alapján a stromasejtek jelentik a neoplasztikus sejtípust (359-362). A stromasejtek döntően, a kanonikus NF- κ B („nuclear factor-kappa B”) ligand (RANKL), macrophag kolónia-stimuláló faktor (M-

CSF) (RANKL/M-CSF) útvonalon serkentik a patológiás osteolízist (350, 363), mivel osteoprotegerin termelésük, mely normálisan korlátozza az osteoclastogenezist, károsodott (364). A neoplasztikus stromasejteknek specifikus markere nincs, de kifejeznek osteoblast markereket, így I-es típusú kollagént, osteocalcint, osteopontint és alkalikus foszfatazt és egy részükben kimutathatók mesenchimális őssejt markerek is, így CD73, CD105 és CD166 (365). Bár a daganat progressziója kapcsolatot mutathat a patológiai grade-el, klinikai stádiummal, tumor mérettel, valamint molekuláris markerek kifejeződésével, ideértve a VEGF-et (ér-endotheliális növekedési faktor) (366, 367), az MMP-9-et (matrix metalloproteináz -9) (368), a p63 fehérjét (369, 370), az epidermális növekedési faktor receptort (EGFR) (371), a humán telomeráz reverz transzkriptázt (hTERT) (372), a RUNX2 fehérjét ("runt-kapcsolt transzkripció faktor 2) (373), és a proliferációs marker Ki67 fehérjét (374), a GCTB recidíva készségének előrejelzése bizonytalan.

Ebben a munkában az EuroBonet, EU FP6-os konzorcium keretében 89 primer és 34 rekurrens GCTB esetben vizsgáltuk a Cx43 fehérjeszint és a tumor progresszió, valamint betegségmentes túlélés ("progression free survival", PFS) viszonyát. Továbbá primer GCTB stromasejt tenyészetekben, valamint kontroll csontvelői stromasejtekben és reaktív fibroblastokban hasonlítottuk össze a Cx43 csatornák szubcelluláris lokalizációját, metabolikus kommunikációját és a Cx43 fehérje foszforilációs állapotát.

8.2. Anyag és Módszer

Szövetminták és szöveti multiblokk (TMA) készítés. 123 betegből 1994 és 2005 között a Rizzoli Ortopédiai Intézetben (Bolonya, Olaszország) sebészileg etávolított 131 GCTB archivált szövetmintáit használtuk. 89 betegből primer (72.4%) 34 betegből recidív (27.6%) daganatot távolítottak el. A 70 nő (56.9%) átlag életkora 53 év, a férfiaké 32.46 év volt (medián: 30.00; min-max: 5-76, interkvartilis: 22-38). A Campanacci-szerinti radiológiai grade meghatározás (375), mely jó egyezést mutatott az Enneking által kidolgozott klinikai stádiumbeosztással (376), szerint 39 eset volt grade 1/látens (31.7%), 33 eset grade 2/aktív (26.8%) és 51 eset volt grade 3/aggresszív (41.5%) GCTB. A 123 nem azonos betegből származó minta klinikai adatait az **6. táblázat** foglalja össze. A progressziómentes túlélés (PFS) átlaga 67.35 hónap (medián: 72, min.-max: 0-157).

A GCTB donor blokkok osteoclast-gazdag területeiből duplikálva kivett 2 mm átmérőjű szövethengerekből készített TMA metszeteket vizsgáltunk.

Primer stromasejtek izolálása és tenyésztése. A friss GCTB szövetek és normál csontvelők a Semmelweis Egyetem Ortopédiai Klinikájáról származtak. Kiindulva 7 GCTB mintából 2 férfi és 2 nő daganatából sikerült neoplasztikus stromasejteket, valamint 3 egészséges kontroll csontvelőből stromasejteket tenyészteni újszülött borjúsérummal kiegészített α -MEM médiumban, kollagenáz I-el, deoxyribonukleázzal és hyaluronidázzal történő emésztéses izolálás után (351). Néhány passzálást követően a monocyták (hemopoetikus sejtek) apoptózissal elpusztultak, a GCTB óriássejtek pedig a tenyésztő edényhez tapadtak, így az élő sejtek a felülúszóban csak stromasejtek voltak. A humán dermális fibroblastokat (HDFa) Dulbecco-szerint módosított Eagle-féle médiumban (DMEM) tenyésztettük.

6. táblázat. A vizsgált óriássejtes csonttumorok klinikai adatai

Progresszió típusa	Klinikai lefolyás	Betegek száma (%) alcsoportonként	Lokalizáció
- Áttéti daganattal él	- Csont metasztázis	1 (0.8)	
	- Tüdő metasztázis	3 (2.4)	
- Folyamatosan betegségmentes	- Primer tumor	69 (56.1)	
- Recidiv tumor betegségmentes klinikai lefolyással	- Recidiv tumor, folyamatosan betegségmentes	24 (19.5)	
- A tumormal kapcsolatos halál	- Első recidiva; komplikáció a műtét napján	1 (0.8)	sacrum
	- Primer tumor; majd malignus sarcoma, utána 3 egymást követő tüdő áttét	1 (0.8)	proximális humerus (jobb oldali)
	- Első recidiva; majd újabb recidiva, malignus sarcoma, majd ennek helyi recidivája	1 (0.8)	sacrum
	- Primer tumor; majd recidiva, majd malignus sarcoma, végül 2 egymást követő recidiva	1 (0.8)	sacrum
	- Primer tumor; majd malignus sarcoma és tüdő áttét	1 (0.8)	humerus (bal oldali)
	- Első recidiva; majd 2 egymást követő recidiva, majd malignus sarcoma, majd ennek recidivája	1 (0.8)	femur (jobb oldali)
- Halál más okból	- Primer tumor; majd recidiva, majd „stroke” okozta halál	1 (0.8)	
- Lokális recidiva, vagy áttét a betegség során	- Egy recidiva a követésig	12 (9.8)	
	- Két recidiva a követésig (4 primer tumor; egy első recidiva és egy 3. recidiva)	6 (4.9)	
	- Primer tumor, majd egy tüdő áttét, utána egy helyi recidiva a követésig	1 (0.8)	
- Összesen		123	

Fluoreszcens *in situ* hibridizáció (FISH). A GCTB stromasejtek neoplasztikus természetét numerikus kromoszóma eltéréseik és telometikus hibáik kimutatásával igazoltuk. Centromerikus α szatellita próbákat kombináltunk az X (világoskék), a 3-as (piros), a 4-es (zöld) és a 6-os (piros+zöld=sárga) kromoszómák számának meghatározására, valamint 11-es kromoszóma centromerikus (piros) és 11p subtelomerikus (zöld) régióit felismerő próbát használtunk (mind Vysis-Abott, Des Plaines, IL) (361).

Az immunreakciók értékelése. Az alkalmazott #3512 antitest a Cx43 fehérje Ser369, Ser372 és Ser373 aminosavakat magában foglaló régióját ismeri fel (*PhosphocytePlus* adatbázis, www.phosphosite.org). A reakciókat digitális metszetek osteoclast-gazdag területein vizsgáltuk. A Cx43 és CD163 DAB reakciókat egy 9-osztatú empirikus skálán legalább 2 független szakértő értékelte a pozitív mononukleáris sejtek gyakorisága alapján. 0: < 2%; +1: 3-5%; +2: 6-10%; +3: 11-20%; +4: 21-30%; +5: 31-40%; +6: 41-50%; +7: 51-60% and +8: >60 % pozitív sejt. Az immunfluoreszcens jeleket szemikvantitatív képanalízissel HistoQuant programmal értékeltük. A Cx43 és CD163 (vagy α -SMA) jelek mérését külön csatornákon, kolokalizációjukat a mononukleáris sejtfrakcióban egy harmadik csatornán mértük. A Cx43 immunfluoreszcens reakció intracelluláris megoszlását sejtenyészetekben Image J 1.48 software-rel végeztük.

Western immunoblot és defoszforiláció. A tenyésztett sejtekből foszfatáz, ill. proteináz inhibitor alkalmazása mellett fehérjét izoláltunk, majd 2-merkaptóetanolt tartalmazó (BioRad, Philadelphia, PA) 5x-ös Laemmli mintapufferrel felvettük és 95 °C-ra melegítettük (351). Defoszforilációhoz marha intestinális alkalikus foszfatáz enzimet (Sigma, P0114) használtunk. Minden mintából azonos mennyiségű, 20 μ g fehérjét vittünk fel 10 %-os SDS-PAGE gélre, majd futtatás után fehérjéket Immobilion-P nitrocellulóz membránra (Millipore) blottoltuk. A membránokat Cx43 antitesttel (1:500, #3512), ill. kontrollként β -actin (1:2000; #4970) antitesttel, majd peroxidáz anti-nyúl immunglobulinokkal (1:1000) kezeltük (mind Cell Signaling). Az immunjeleket kemilumineszcenciával, Super Signal West Pico ECL reagenssel (Pierce, Rockford, IL) hívtuk elő, majd denzitometriásan Kodak Image Station 4000 MM (Kodak, Rochester, NY) Molecular Imaging Software 4.1 és Image J 1.48 programokkal értékeltük.

RNS izolálás, cDNS szintézis és kvantitatív RT-PCR módszer. Tenyésztett sejtekből teljes RNS izolálást végeztünk Qiagen kit-el (West Sussex, UK), majd RNáz-mentes

DNázal (Qiagen) történő kezelés után az RNS koncentrációt meghatároztuk (351). Egy μg RNS-t írtunk át kétszálú cDNS-sé reverz transzkripcióval kittel (Applied Biosystems, Foster City, CA). A Cx43 és β -actin mRNS koncentrációt „forward” és „reverse” primerekkel (7. táblázat) és ZEN Double-Quenched FAM próbákkal TaqMan valósídejű PCR módszerrel StepOne Plus PCR berendezéssel (Applied Biosystem) határoztuk meg. Amplifikáció után a párhuzamos mérések adatait StepOne Plus Software v2.0 segítségével értékeltük.

Festéktranszfer mérése áramlási citometriával. Donor sejteket (2×10^5) szimultán jelöltünk $9 \mu\text{M}$ DiI (1,1'-dioctadecil-3,3,3'-tetra-metilin-dodicarboianin) és $0,5 \mu\text{M}$ Calcein AM (Calcein-acetoximetilészter) fluoreszcens festékekkel, majd inkubáltunk 37°C -on 30 percig $5\% \text{ CO}_2$ mellett (377). A kettősen jelölt sejteket centrifugálás, majd mosás után ugyanolyan jelöletlen sejtekkel hoztuk össze 1:10 arányban, majd FCS-el kiegészített α -MEM médiumban 37°C -on 5 órán át inkubáltuk. Végül a szimplán calceinnel jelzett (zöld) recipiens sejtek és a kettősen jelölt donor sejtek arányát mértük kétcsatornás áramlási citometriával (Gallios, Beckman Coulter, Carlsbad, CA), ami a connexin csatornákon történő direkt sejt-sejt kommunikáció mértékét jelezte.

7. táblázat. A Cx43 mRNS meghatározás PCR primer és próba szekvenciái

Gén	Primer/Próba	Szekvencia (5'-3')
GJA1	„Forward”	GTACTGACAGCCACACCTTC
	Reverz	ACTTGGCGTGACTTCACTAC
	Próba	/56-FAM/AGGCAACAT/ZEN/GGGTGACTGGAGC/3IABkFQ/
β -actin	„Forward”	CCTTGACATGCCGGAG
	Reverz	ACAGAGCCTCGCCTTTG
	Próba	/56-FAM/TCATCCATG/ZEN/GTGAGCTGGCGG/3IABkFQ/

Statisztikai analízis. A független értékelők eredményeinek összehasonlításához Spearman-rank tesztet és az „inter-rater” Cohen’s kappa (κ) tesztet alkalmaztuk. A Cx43 fehérjeszintek és a kliniko-radiológiai stádium (látens<aktív<aggresszív) összefüggéseit a non-parametrikus Johnkeer-Terpstra tesztel vizsgáltuk, majd a csoportok közötti párosított összevetésre a Mann-Whitney U („post-hoc”) tesztet alkalmaztuk Bonferroni vagy Holm-Hochberg korrekcióval. A Cx43 szintek viszonyát a GCTB recidiva készségével ugyancsak Mann-Whitney U tesztel elemeztük.

Univariancia modellben alkalmazott Cox kockázati regresszió analízist és log-rank-tesztet használtunk a Cx43 szintek és a GCTB prognózis/klinikai lefolyás együttes elemzésére. Az eredményeket Kaplan-Meier görbékben ábrázoltuk. A progressziómentes túlélés (PFS) esetén a tumorkimetszés és az azt követő első esemény (recidiva, áttét, malignus transzformáció, ill. halál) között eltelt időt vettük figyelembe (**6. táblázat**), kihagyva az összefüggő (8) eseteket. Cox regresszió multivariancia modellben történő alkalmazásakor az analízist nemre, életkorra, grade-re, lokalizációra (felső végtag, alsó végtag, vagy centrális) és a Rizzoli Intézetben végzett első kezelésre (küret, rezekció/amputáció, vagy radioterápia) korrigáltuk.

Szöveti metszeten a Cx43 pozitív sejtfrakciók, sejtkultúrában a Cx43 intracelluláris kompartmentalizáció, ill. Cx43 mRNA és fehérjeszintek összevetésére a vizsgált csoportok között a független mintákra alkalmazható t-tesztet használtuk.

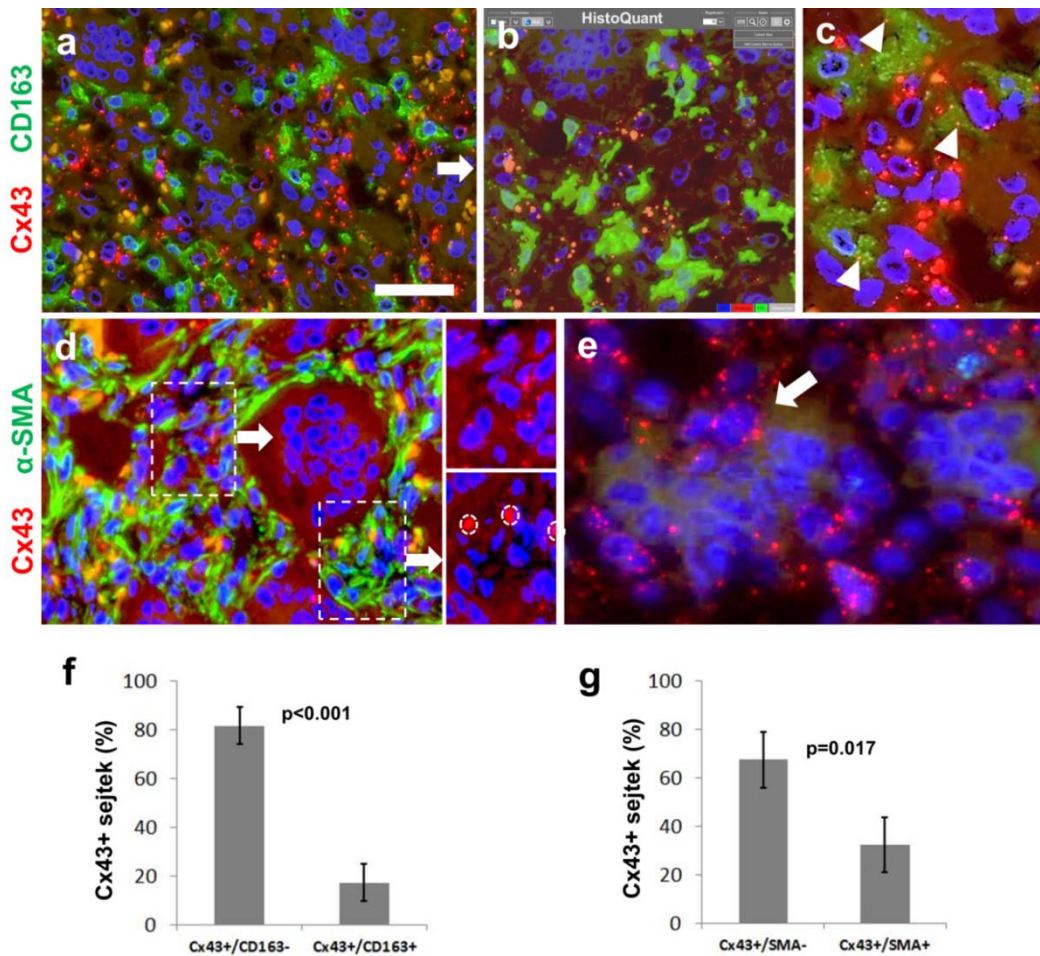
8.3. Eredmények

A Cx43 expresszió klinikopatológiai korrelációi óriássejtes csonttumorban

Kettős immunfluoreszcens jelölések digitális képanalízise igazolta, hogy a Cx43 immunreakció zöme a CD163 negatív neoplasztikus stromasejtekhez (81,7%, SD: $\pm 12.56\%$) és nem a CD163 pozitív monocyta/macrophagokhoz tartozik ($p < 0.001$) (**31a-c. ábra**). Az α -simaizom aktin (α -SMA) pozitív GCTB stromasejtek szignifikánsan kevesebb Cx43 immunjelet adtak (32,6%; SD: $\pm 13.4\%$), mint az α -SMA negatívak ($p = 0.017$) (**31d. ábra**). Cx43 plakkok ritkán voltak kimutathatók osteoclastokon, inkább olyan mononukleáris sejtekhez tartoztak, melyeket az osteoclastok részben “bekebeleztek” (**31e. ábra**). A Cx43 immunoreakció megoszlását a GCTB mononukleáris sejtpopulációi között az **31f-g. ábra** foglalják össze.

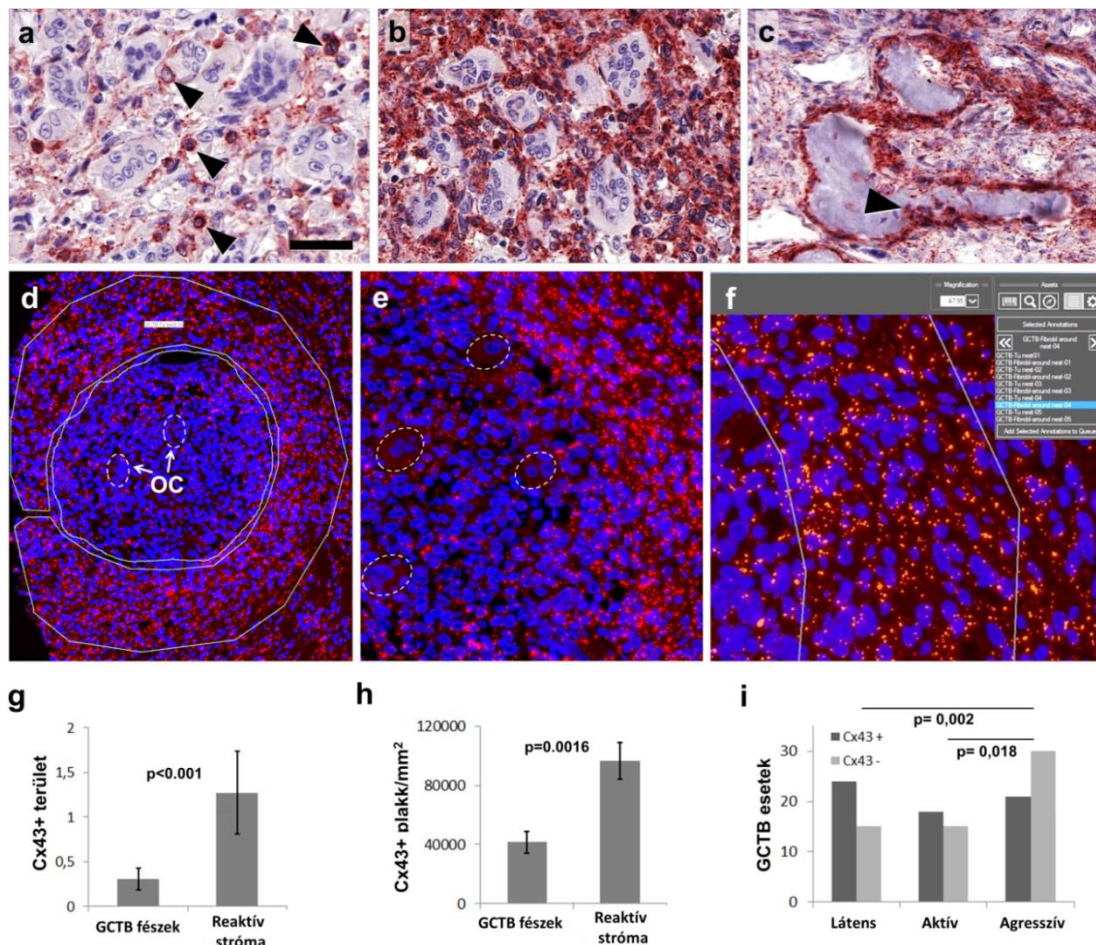
A Cx43 pozitív mononukleáris sejtek százalékos arányát GCTB TMA metszeteken végzett immunperoxidáz reakciók alapján határoztuk meg (**32a-b. ábra**). Az értékelők egymástól független eredményei Spearman-rank tesztel magas korrelációt mutattak ($\rho = 0.805$, $p < 0.001$). Ugyancsak kiváló korreláció adódott Cohen-féle kappa tesztel, a vizsgált populáció alacsony (0-3 értékek, “negatív”), ill. magas (4-8 értékek, “pozitív”) Cx43 expressziós csoportokba történő szétválasztása után ($\kappa = 0.735$, 95% CI 0.612-0.858, $p < 0.001$). A csontgerendákat határoló normál osteoblast sejtréteg szintén erős Cx43 reakciót adott (**32c. ábra**). Szemikvantitatív képanalízis igazolta, hogy az osteoclast-gazdag tumor fészkekben Cx43 fehérje szintje szignifikánsan alacsonyabb volt, mint körülötte a reaktív stromában (**32d-f. ábra**). Ez vonatkozott mind a Cx43 pozitív

területek arányára ($p < 0.001$) (32g. ábra), mind a Cx43 plakkok képanalízissel mért számára (32h. ábra) 4 μm vastag metszet 1 mm^2 -es területére vonatkoztatva ($p = 0.0016$).



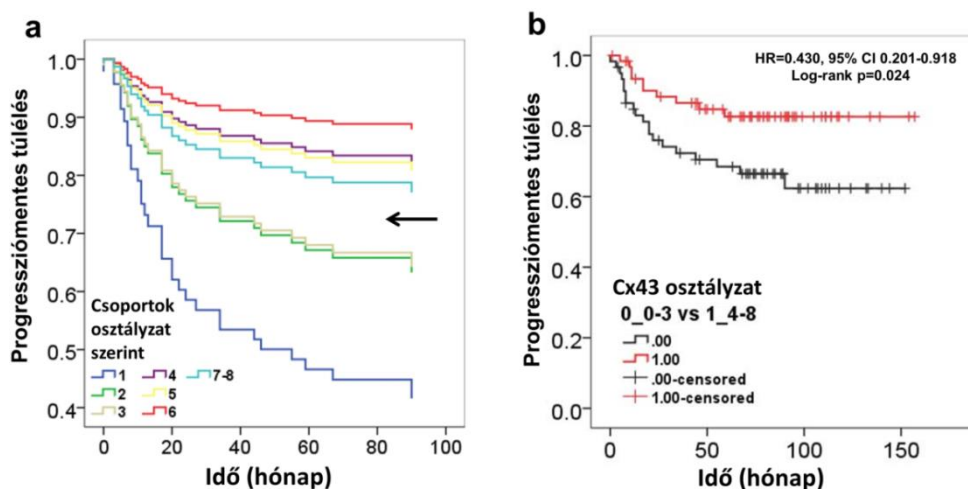
31. ábra. Cx43 (piros; a-e) CD163 (zöld; a-c) és α -simaizom aktin (α -SMA, zöld; d) fehérjék kombinált immunfluoreszens kimutatása óriássejtes csonttumorban. Cx43 és CD163 reakciók ritán kollokalizálnak a mononukleáris sejtfrakcióban (a). HistoQuant automatizált képanalízissel a Cx43 (sárga) és CD163 (zöld) csatornák mellett (b) egy 3. csatornán az első két csatorna jeleinek átfedését vizsgáltuk (nyílhegyek) (c). Cx43 jelek (piros) gyakoribbak a mérsékleten α -SMA pozitív (felső betéti kép), mint az erősen α -SMA pozitív sejtekben (d; alsó betéti kép: a vörösvérsejtek nonspecifikus jelei bekarikázva). Cx43 immunjelek az osteoclastok körül elsősorban mononukleáris sejtekhez tartoznak (nyíl) (e). A diagrammok összegzik a mononukleáris sejtfrakciók Cx43 expresszióját (f és g). Kék sejtmag festés (Hoescht). Skála az (a) ábrán; a, b, d: 30 μm ; c, e: 15 μm .

Egy negatív trendtől eltekintve ($U_{\text{MW}}=1277$, $Z=-1.363$, $p=0.173$) nem volt szignifikáns összefüggés a Cx43 immunreakció és a GCTB recidivák megjelenésének gyakorisága között. Azonban a Cx43 expresszió inverz korrelációt mutatott a daganat klinikoradiológiai tumor stádiumával. Az összefüggés szignifikáns volt a látens és agresszív csoportok között ($p=0.002$) Bonferroni korrekció után is ($p < 0.0167$), másrészt ugyanilyen összefüggében, valamint az aktív és agresszív csoportok között is ($p=0.018$) a kevésbé szigorú ($p < 0.025$) Holm-Hochberg korrekció után (32i. ábra)



32. ábra. A Cx43 fehérje szintjének meghatározása immunperoxidáz (a-c) és immunfluoreszcens (d-e) módszerrel óriássejtes csonttumorok osteoclast-gazdag régióiban. Példák mérsékelt (a; 3+) és magas (b; 8+) Cx43 kifejeződést mutató tumorokra. Erős Cx43 reakció normál osteoblast sejtekben és a csontgerendák osteocytáiban (nyílhegy) (c). Egy tumorfészek és körülötte a reaktív stroma külön kijelölve automatizált Cx43 (piros) meghatározáshoz (d; OC-osteoclast). A (d) ábra erősebb nagyításán az osteoclastok bekarikázva (e). Digitális képanalízissel kiemelt Cx43 (sárga) plakkok (f). Mind a Cx43 pozitív terület (g) mind a Cx43 pozitív plakkok száma (h) szignifikánsan alacsonyabb a tumorfészkekben ($p < 0.01$). A Cx43 szintek szignifikánsan alacsonyabbak az agresszív mint az aktív, illetve az agresszív mint a látens kliniko-radiológiai tumor stádiumokban (i). Méretvonal az (a) ábrán; a, b, c: 30 μm ; d: 80 μm ; e: 30 μm ; f: 15 μm .

A Cox-féle regresszió analízis univariancia modellben a kedvezőtlen daganatprognózis legnagyobb kockázatát mutatta a Cx43 expresszió 4-es és 3-as értéket kapott csoportjai között (1-es vs 3-as: HR=0.505, 95% CI 0.064-3.967; * $p=0.516$; 2-es vs 4-es: HR=0.226, 95% CI 0.025-2.030; * $p=0.184$). Ez a határ a vizsgált esetszámot is a medián körül választotta szét $N_{\text{érték } 1-3}=60$ (48.8%), $N_{\text{érték } 4-8}=63$ (51.2%), ezért ezt választottuk eseteink Cx43 negatív (1-3-ig osztályzatot elér esetek), ill. Cx43 pozitív (4-8-ig osztályzatot elért esetek) csoportokba sorolásához (**33a. ábra**). Ez alapján a Cx43 expresszió szignifikáns pozitív korrelációt mutatott a progressziómentes túléléssel (HR=0.430, 95% CI 0.201-0.918; $p=0.029$). Mindezt megerősítette a Log-rank teszt is ($\chi^2=5.073$, $df=1$, log-rank



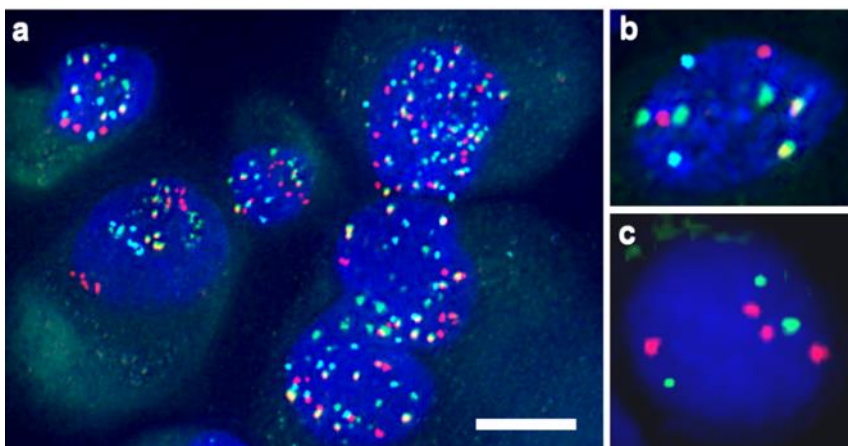
33. ábra. Cx43 expresszió és a GCTB progressziómentes túlélésének (PFS) viszonya Kaplan-Meier görbéken ábrázolva. A PFS értékek csökkenésének fokozott kockázata a 4-es és 3-as Cx43 szintet mutató csoportok között mutatkozott (nyíl), ami a betegszámot a medián közelében választotta szét ($N_{\text{osztályzat}4-8}=63$ (51.2%) $N_{\text{osztályzat}1-3}=60$ (48.8%)) (a). Mind a Cox-regresszió analízis, mind a Log-rank teszt szignifikáns progresszió-mentes túlélési különbséget igazolt a két összesített csoport között (b).

p=0.024) és az eredményt Kaplan-Meier görbéken is ábrázoltuk (33b. ábra). Multivariancia modellben alkalmazott Cox regressziós analízis, az univariancia analízisnél is jobb progressziómentes túlélést jelzett a magasabb Cx43 expressziójú daganatok csoportjában (HR=0.411, 95% CI 0.187-0.903; p=0.027). A CD163 pozitív mononukleáris sejtfrakciók aránya inverz, de nem-szignifikáns tendet mutatott a GCTB progressziómentes túlélésével (log-rank p=0.167).

Connexin 43 expresszió primer GCTB stromasejt tenyészetben

A tumorokból izolált primer stromasejtek neoplasztikus természetét FISH próbákkal kimutatott egyedi sejteket érintő aneuszomiák és változatos poliszómiák igazolták (34. ábra).

A GCTB stromasejtek sejtkultúrában jelentős méretbeli és alakbeli heterogenitást mutattak (35a. ábra), bennük a Cx43 immunreakció elsősorban a sejtek endoplazmás retikulum-Golgi régióiban halmozódott (35a-c. ábrák). Immunofluoreszens Cx43 reakciók képanalízise igazolta, hogy szignifikánsan több membránkötött Cx43 jel mutatható ki HDFa fibroblastokban ($p<0,01$) és csontvelői stromasejtekben ($p<0,05$), mint neoplasztikus GCTB stromasejtekben (35d-h. ábrák). Kvantitatív RT-PCR módszerrel ugyancsak csökkent Cx43 mRNS szinteket mértünk neoplasztikus GCTB stromasejtekben a kontroll sejtekhez képest ($p<0.01$) (35i. ábra). Ezt a különbséget fehérje szinten is igazoltuk (35j-k. ábrák). Ráadásul a Cx43 fehérje Western blot



34. ábra. FISH módszerrel igazolt számszerű és telomerikus kromoszóma eltérések óriássejtes csonttumorból izolált primer neoplasztikus strómasejtekben. Centromerikus 3-as (piros), 4-es (zöld), 6-os (sárga) és az X (világos kék) kromoszóma jelek változatos poliszómiát igazolnak (a). A 4-es kromoszóma triszómiája egy a 3-as, 6-os és X kromoszómákra diszómiás sejtben (b), ill. a 11-es kromoszóma szubtelomerikus vesztese és tertaszómia egy másik sejtben (c). Skála az (a) ábrán; a:5 μm ; b és c:2.5 μm .

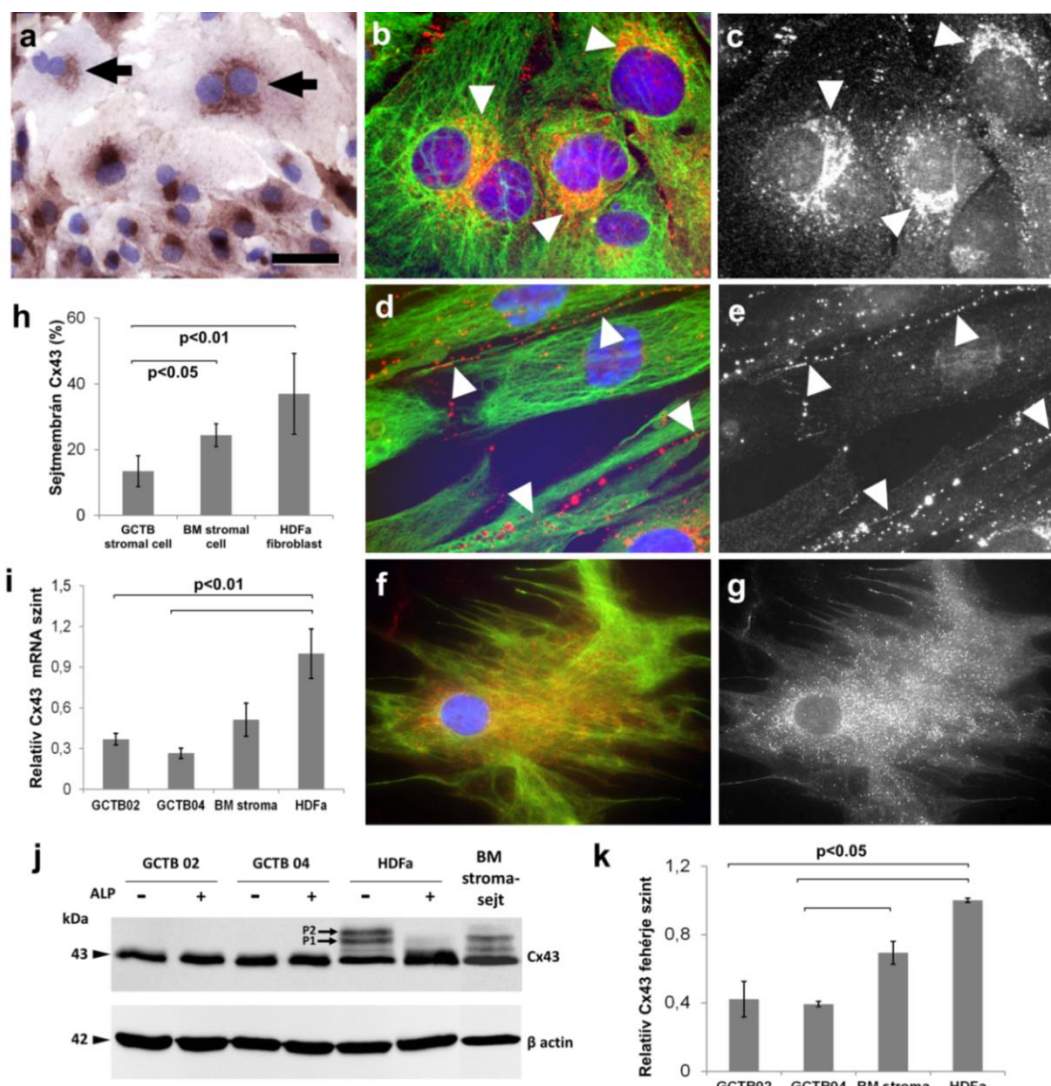
analízise mind HDFa fibroblastokban, mind csontvelői stromasejtekben két alkalikus foszfatáz enzim emésztésre érzékeny extra sávot igazolt, melyek GCTB stromasejt extraktumokból hiányoztak.

A connexin direkt sejt-sejt kommunikáció igazolása festék transzfer módszerrel

A direkt sejt-sejt kommunikáció igazolására egy flow citometriás festék transzfer módszert alkalmaztunk, melyben Dil (piros) és calcein (zöld) floreszcens festékekkel kettősen jelölt sejteket jelöletlen, azonos típusú sejtekkel tenyésztettünk 5 órán át (**36a-b. ábra**). A vízzoldékony calcein jelöletlen recipiens sejtekbe törő átjutásának (szimpla zölden fluoreszkáló sejtek) mértékét mértük flow citometriával, ami a sejtmembrán connexin csatornák mennyiségének és működésének indikátoraként szolgált. A mért festék transzfer 5-7x nagyobb volt ($p < 0.001$) HDFa fibroblastokban és csontvelői stromasejtekben a neoplasztikus GCTB stromasejt tenyészetben mérthez képest (**36c-e. ábra**).

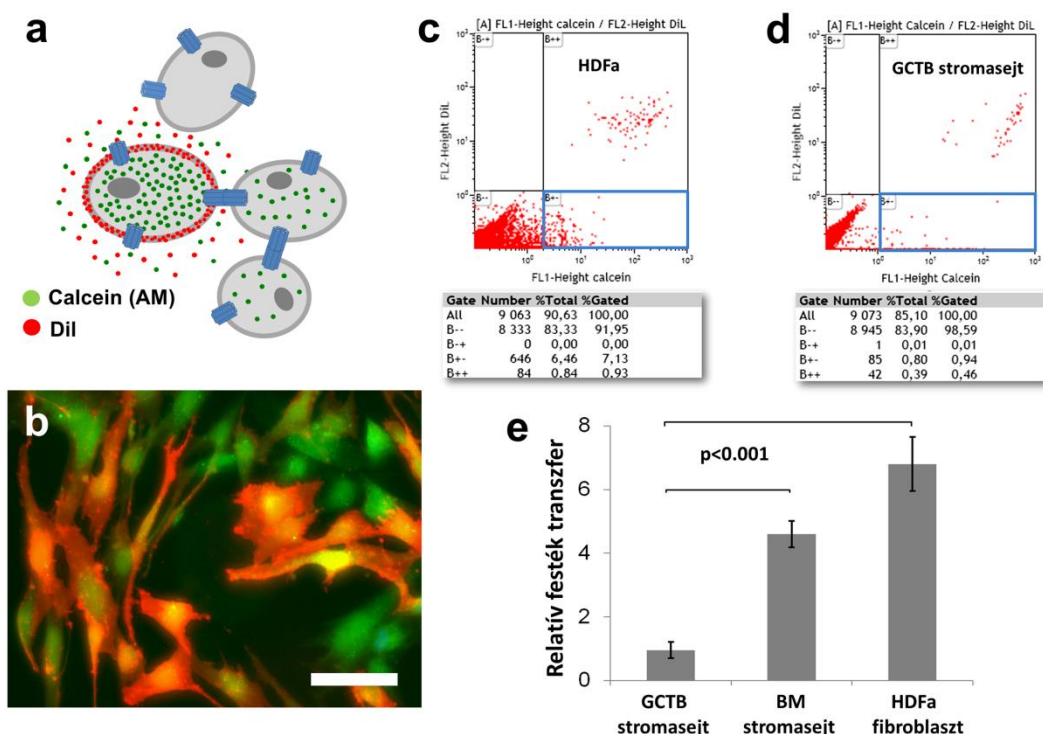
8.4. Megbeszélés

A Cx43 kommunikációs csatornák fontos szerepet játszanak a csontfejlődés szabályozásában. Egér modellben, a GJA1 gén mutációk és a Cx43 membrán csatornák következményes károsodása kóros osteolízissel jár (346). Nagyszámú óriássejtes csonttumorban, ahol a vezető tünet a patológias osteolízis, igazoltuk, hogy a csökkent Cx43 expresszió szignifikáns összefüggést mutat a betegség rosszabb progressziómentes túlélésével és a tumor előrehaladott kliniko-radiológiai stádiumával.



35. ábra. Cx43 expresszió tenyésztett GCTB primer stromasejtekben, primer csontvelői stromasejtekben (BM), ill. HDFa fibroblastokban. Immunoperoxidáz Cx43 reakció a gyakran kétmagvú neoplasztikus stromasejtek paranukleáris régiójában (nyilak) (a). Immunfluoreszcenciával szignifikánsan kevesebb Cx43 (piros) igazolható a GCTB stromasejtekben, mint a kontroll sejtekben (b-g), amit digitális mennyiségileg is meghatároztunk (h). GCTB stromasejtekben a Cx43 fehérje az endoplazmás retikulum-Golgi régióban koncentráliódik (nyílhegyek; b és c, azonos terület), míg HDFa fibroblastokban a sejtmembránban (d és e, azonos terület). Csontvelői stromasejtekben a Cx43 pozitív plakkok sejtsejtek között (f és g, azonos terület). Vimentin (zöld) reakció a sejtek alakját (b, d, f), míg azonos területek fekete-fehér ábrái (c, e and g) a Cx43 reakció szubcelluláris lokalizációját emelik ki. Cx43 mRNS és fehérje kimutatása RT-PCR (i), ill. Western blot módszerrel (j-k). Utóbbi csak a kontroll sejtekben igazolt alkalikus foszfatáz emésztésre érzékeny sávokat (P1 és P2). A diagrammok három független mérés átlagát és $\pm$ standard szórás (SD) értékeit mutatják. Kék magfestés hematoxylinnel (a), ill. Hoescht-el (b, d és f). Skála az (a) ábrán; a: 20 μ m; b, c, d, e: 10 μ m; f, g: 15 μ m.

GCTB primer stromasejt tenyészetben, kontroll fibroblastokhoz és csontvelői stromasejtekhez képest kimutattuk a Cx43 expresszió, a csatorna sejtmembrán transzportja és a csatornafunkciók szignifikáns csökkenését, valamint a Cx43 fehérje reaktív sejtekre jellemző foszforilációjának hiányát. Eredményeink szerint a connexin sejt-sejt kommunikáció zavara a neoplasztikus stromasejtekben hozzájárulhat a GCTB agresszív fenotípusához és kedvezőtlenebb klinikai lefolyásához.



36. ábra. A potenciális direkt sejt-sejt kommunikáció mérése áramlási citometrás festék transfer módszerrel. A módszer elve (a). Jelöletlen sejtek és kettősen jelölt (narancssárga) sejtek 10:1 arányban összekeverve (a-b). A zöld calceint (Ms: 622 Da) a sejtbe jutva észterázok vízőldékonnyá alakítják, így a szomszédos sejtekbe a „gap junction” csatornákon juthat át. A lipofil DiI (piros) a donorsejtek membránjában reked (b). A csak calceinnel jelölt (zöld) sejtek áramlási citometriával mért aránya (B+-, jobb alsó bekeretezett négyzetek) a sejtek közötti festék-transzfert jelzi, amely szignifikánsan nagyobb a kontroll sejtekben (c), mint GCTB stromasejtekben ($p<0.001$) (d). A diagram 3 esetben 3 független mérés átlagát és $\pm$ standard szórás értékeit összegzi (e). Méretvonal b: 20 μ m.

A Cx43 csatornák alapvető szerepet játszanak a csontfejlődésben és újraképzésében („remodelling”), a csontképző sejtek metabolikus hálózatba szervezésével és túlélési, anabolikus szignálok közvetítésével (178, 378). Fontosak az osteoblast proliferáció és differenciálódás, valamint szolubilis faktorokra és mechanikus ingerekre adott válaszok szabályozásában, illetve tápanyagok közvetítésében osteoblast és osteocyta sejthálózatokban és között (379). Ráadásul a csontvelői stromasejtek Cx43 csatornái részt vesznek a hemopoetikus őssejtek nyugvó állapotának fenntartásában és citoablációt követően az őssejtek transz-stromális migrációjának és a megfelelő őssejt “niche”-be vándorlásának szabályozásában is (135, 380, 381). Tehát, a csontképző és csontvelői sejthálózatok Cx43 csatornái támogatják a sejtfunkciók koordinálását mindkét, feltehetően egymással is metabolikusan kapcsolt, kompartmentben.

A Cx43 csatornák képződése és az általuk közvetített metabolikus szignálok módosítják az osteoblastok génexpresszióját (382). Egér modellben az indukált GJA1 gén abláció, illetve ODDD-szerű pont mutációk osteopeniás fenotípussal járnak, az osteoblastok kóros érése, a csökkent sejtek közötti szignáltovábbítás és osteoprotegerin termelés miatt

kialakuló fokozott osteoclastogenezis következtében (346). Mindez arra utal, hogy a GJA1 gén szimpla nukleinsav cseréje miatt módosult/károsodott Cx43 fehérje gátolja a csatornák funkcióját. A csökkent számú sejtmembrán csatorna, amit a neoplasztikus osteoblast típusú stromasejtekben megfigyeltünk, hasonló hatású lehet. Vagyis a connexin csatorákon közvetített regulációs szignálok jelentős hiánya óriássejtes csonttumorban is hozzájárulhat a neoplasztikus stromasejtek diszfunkciójához az osteoclastogenezis kontrolljában. A csökkenő Cx43 szintek és sejtmembrán csatornák szignifikáns kapcsolata a daganat agresszív fenotípusával és rosszabb progressziómentes túlélésével is ezt a nézetet támogatja. Ennek közvetlen bizonyítására a pro- és anti-osteoclastogenikus (RANKL, ill. osteoprotegerin) növekedési faktorok szintjét kívánjuk mérni Cx43 génmanipulált GCTB stromasejtekben.

Csontképző sejtekben a Cx43 „gap junction” csatornák mellett a szabad félcsatornák szerepe is felvetődött. Az anti-osteolytikus biszfoszfonátok, az osteoclast aktivitás gátlásán túl, a Cx43 félcsatornákon hatva az osteoblastok és osteocyták apoptózisát is képesek gátolni (353, 383). Így a Cx43 expressziót és sejtmembrán transzportot elősegítő szerek (pl. retinolsav), a primer szabályozás helyreállítása mellett, jó eséllyel a biszfoszfonátok anti-osteoclastogenikus hatását is támogatják GCTB terápia során.

Primer sejttenyészetben GCTB stromasejtek neoplasztikus természetét FISH próbák kombinálásával, poliszómiák és egyedi sejteket érintő aneuploidia kimutatásával igazoltuk (361). A GCTB stromasejtekhez megfelelő „normál” kontroll sejtek kiválasztásának nehézségei miatt erre a célra HDFa fibroblastokat és primeren izolált normál csontvelői stromasejteket is használtunk. A tenyésztett GCTB stromasejtekben a Cx43 fehérje elsősorban az endoplazmás retikulum-Golgi régióban koncentrálódott, a sejtmembránok alig jelölődtek, amit a Cx43 fehérje foszforilációjának elmaradása is kísért. A kontroll sejtekben azonosított alkalikus foszfatáz érzékeny sávok az antitestünk által felismert három szerin (Ser369, Ser372, vagy Ser373) közül kettő foszforilált állapotát jelezték. A Cx43 foszforilációja a fehérje C-terminális szakaszán, a posztranszlációs szabályozás része, így befolyásolja a csatornák képződését, szállítását, permeabilitását és metabolizmusát (67, 70). Ismert, hogy a Ser369 és a Ser373 Akt általi foszforilációja fokozza a Cx43 és a 14-3-3 fehérjék interakcióját, ami támogatja a csatornafehérje szállítását, majd a sejtmembránba jutva annak stabilizálását (384, 385). A PKA (protein kináz-A) foszforiláció ugyanitt fokozza a csatornák összeszerelődését és a direkt sejt-sejt kommunikációt (386, 387). Tehát a Cx43 fehérje hiányos foszforilációja GCTB stromasejtekben közrejátszhat a csatornák csökkent membrán transzportjában és a

korlátozott sejt-sejt kommunikációban. Mivel a GJA1 génmutációkat még malignus daganatokban sem írtak le, valószínű, hogy poszt-transzlációs szabályozási defektus állhat az elmaradt foszforiláció hátterében.

Cx43 csatornák minden csontképző sejtben így osteoblastokban, osteocytákban és osteoclastokban is kimutathatók (346). A CD163 fehérje egy anti-inflammatorikus hemoglobin „scavenger” receptor monocyta/macrophagokon, amit az osteoclast típusú óriássejtek nem termelnek (388). Óriássejtes csonttumorban szignifikánsan több Cx43 fehérjét igazoltunk neoplasztikus stromasejteken, mint a CD163 pozitív monocyta sejteken. Ezzel összhangban a Cx43 csatornák szerepe közismert a mesenchymális őse- és progenitor sejtekben és a belőlük differenciálódó osteoblastokban, csontvelői stromasejteken és stromális fibroblastokban (135, 178, 389). Monocyták és macrophagok ennél korlátozottabban használnak Cx43 csatornákat, kivéve masszív gyulladásos folyamatokban és szövetregeneráció során (390). Mivel a CD163 pozitív mononukleáris sejtfrakció nem mutatott szignifikáns korrelációt a progresziómentes túléléssel, ezért a GCTB prognózisát elsősorban a CD163 negatív stromasejt frakció Cx43 szintje határozza meg. Az erős Cx43 reakció az ép csontszövet osteoblastjaiban és a csontgerendák osteocytáiban támogatja e két sejtípus közvetlen metabolikus kooperációjának lehetőségét és az immunreakció pozitív kontrolljaként is szolgált (178). Osteoclastok közvetlen közelében Cx43 reakció elsősorban ott jelent meg, ahol mononukleáris sejt csatlakozott az óriássejthez. Ezért valószínű, hogy itt a Cx43 plakkok többsége az osteoclastokhoz fuzionáló monocyta sejtekhez tartozik, de a csatornának szerepe lehet a sejtfüzióban is, amit alátámaszt az óriássejtek multinuklearitásának mérséklődése Cx43 csatornák gátlására (391).

Primer csonttumorokban, ideértve a GCTB-t, gyakran megfigyeltek α -SMA pozitív sejteket (392). Az α -SMA megjelenése stromasejteken azok myofibroblast-szerű, migrációs fenotípus szerinti differenciálódásával magyarázható. A GCTB stromasejteken belül az α -SMA pozitív sejtek Cx43 fehérje szintje szignifikánsan alacsonyabb volt, mint az α -SMA negatív tumorsejteken. Ez összhangban van azzal, hogy a Cx43 expresszió csökken myofibroblastos differenciáció során (266, 393, 394). Kezdetben a Cx43 csatornák fontosak ebben a folyamatban, hiszen fibroblastokban az ODDD-szerű Cx43 mutációk jelentősen gátolják az α -SMA termelést (395). Másrészt a Cx43 csatornák részt vesznek a fibroblast-myofibroblast differenciálódást indukáló TGF- β szignálok közvetítésében is (396). Azonban a myofibroblastos differenciáció előrehaladtával a Cx43 expresszió szignifikánsan csökken.

8.5. Összefoglalás – Az eredmények újdonságtartalma

- Elsőként tanulmányoztuk a csontfejlődésben és adaptációban alapvető szerepet játszó connexin 43 expresszióját és csatorna áteresztő képességét óriássejtes csonttumorban.
- Tumoros szöveti metszeteken megállapítottuk, hogy a Cx43 fehérjét döntően a neoplastikus stromasejtek és csak kismértékben a monocyta/macrophagok, ill. osteoclastok termelik.
- Szignifikánsan alacsonyabb Cx43 kifejeződést igazoltunk a tumorfészkekben a környező reaktív stromához képest, illetve simaizom-aktin negatív neoplasztikus stromasejtekben a myofibroblast irányú differenciálódást mutató simaizom aktin pozitív stromasejtekhez képest.
- Nagyszámú GCTB csonttumorban igazoltuk, hogy a Cx43 expresszió csökkenése szignifikánsan összefügg a daganat agresszívebb fenotípusával és rosszabb progressziómentes túlélésével.
- A neoplasztikus GCTB stromasejtek tenyésztésében a kontroll stromális sejtekhez képest megállapítottuk a Cx43 fehérje hiányos foszforilációját és csökkent mértékű sejtmembrán transzportját.
- Tenyésztett primer neoplasztikus stromasejtekben festék-transzfer módszerrel igazoltuk a szignifikánsan csökkent metabolikus kommunikációt a reaktív stromasejtekhez képest.

Eredményeink alapján a csökkent Cx43 expresszió és a deregulált membráncsatornák a neoplasztikus GCTB stromasejtekben hozzájárulnak az osteoclastogenezis kontrolljának károsodásához, így a fokozott osteoclastogenezishez és ezzel arányos mértékben a GCTB klinikai progressziójához és kedvezőtlenebb kimeneteléhez. Ezek alapján a Cx43 csatornafunkciók normalizálása a GCTB stromasejtek osteoclastogenikus kontroll funkciójának támogatása mellett az osteoclast gátló és a Cx43 csatornák közvetítésével működő bisfoszfonát (alendronát) kezelés hatékonyságát is javíthatja.

9. Connexin expresszió normál emlőszövetben és emlőcarcinomában

9.1. Bevezetés

A mammográfiás szűrés (397), korai diagnózis és célzott terápiás lehetőségek ellenére az emlőrák még ma is az egyik leggyakoribb daganat okozta halálok a nők körében a gazdaságilag fejlett országokban (398). 2012-ben világszerte a második leggyakrabban diagnosztizált daganat (1,67 millió) volt (399), míg ekkor hazánkban 7915 esetet regisztráltak.

A molekuláris szubtipizálás és az erre alapozott terápia szükségessé teszi az emlőrákok diagnosztikus szűrését legalább a hormon receptorok (HR: ösztrogén - ER és progeszteron - PR), a 2-es típusú epidermális növekedési faktor receptor (HER2/Neu/c-ErbB2) fokozott expresszió/génamplifikáció, valamint a Ki67 pozitív proliferációs tumorsejt frakció meghatározása céljából (400-402). Azonban a körültekintő diagnosztika ellenére is csak a kiválasztott estek alig több mint ~50 %-a reagál például anti-HER2 biológiai terápiára (403). Ezért, az emlőrákok további molekulális osztályozása szükséges a betegek egyéni profiljához jobban illeszthető, személyre szabott terápiája támogatásához, illetve a terápia rezisztencia okainak feltárása érdekében.

Az emlőmirigy normális működéséhez a sejtek szabályozott közvetlen interakciói szükségesek. Az adherens (E-cadherin) és „tight junction” fehérjék (claudinok) lehetséges szerepét a normál emlőmirigy működésében, valamint az abnormális kifejeződésük összefüggéseit az emlőcarcinomák kialakulásával és prognózisával már behatóan vizsgálták (404, 405). A connexinek előfordulásáról normál emlőszövetben, illetve emlőrákban ellentmondó megfigyelések születtek. Ennek legfőbb oka az archivált szöveteken működő antitestek hiánya és a kisméretű connexin plakkok ($<1\ \mu\text{m}$) $\sim 5\ \mu\text{m}$ vastag metszetekben történő optikai leképezésének és megbízható mennyiségi analízisének nehézsége. Eddig, emberi emlőmirigyekben Cx43 és Cx26 kifejeződését igazolták (406-409), míg egérben a Cx30 és Cx32 szerepét bizonyították az emlőmirigy fejlődésében és tejelválasztásban (410).

A carcinogenezist aberráns connexin expresszió és csatorna funkciók kísérik (411). A connexinek tumor stádiumfüggő expressziót mutathatnak és egyes izotípusok egymással ellentétes szerepét is leírták az emlőcarcinoma progressziója során (117). A connexinek szintje általában csökken malignus transzformáció kapcsán, de metasztatikus diapedezis során a tumorsejtek és endothel sejtek interakcióit is támogathatják (412). Míg korai emlőrákban a Cx43 és a Cx26 tumorgátló szerepét írták le (413, 414), ezek az izotípusok

és a Cx32 az emlőrákok áttéti kolonizációját is segíthetik a nyirokcsomókban (414-417). Továbbá, az utóbbi időben figyelték meg a Cx46 izotípus szerepét az ER pozitív MCF-7 emlőcarcinoma sejtek hipoxia adaptációjában (418). Azonban eddig nem találtak összefüggést a connexinek kifejeződése és az emlőrák prognózisa között (419). Nagyléptékű tanulmányok, melyek a connexin izotípusok mRNS és fehérje szintű kifejeződése és az emlőcarcinomák progressziójának és prognózisának viszonyát vizsgálták, szintén nem születtek. Ezért, emlőcarcinomákban nyilvánosan hozzáférhető mRNS expressziós adatbázisok elemzésével nagy beteganyagon teszteltük a connexin izotípusok kifejeződésének összefüggéseit az emlőcarcinoma klinikai viselkedésével, az eredményeket pedig fehérje szinten szövetmintákon validáltuk.

A neoadjuváns kemoterápia/primer szisztémás terápiára (PST) adott válasz megítélésére elterjedt klasszifikációk elsősorban az axillában visszamaradt tumor mennyiségét vizsgálják (NSABP, Miller-Payne, Sataloff, EWGBSP, CPS EG) (420-424) (**8. táblázat**). Az utóbbi időben bevezetett CPS EG rendszer pedig a klinikai és patológiai kiterjedtséget, a magi grade-et, valamint a hormonreceptor státuszt is (425, 426). Azonban, nem rendelkezünk olyan biológiai markerekkel, melyek alkalmasak a neoadjuváns terápiára adott válasz előrejelzésére. Ezért ugyancsak vizsgáltuk a connexin izotípusok, a daganatproliferáció és a terápiás klasszifikációk összefüggéseit a klinikopatológiai paraméterekkel (stádium, ER, PR és HER2 státus) és a betegség prognózisával neoadjuváns kemoterápia kapcsán.

9.2. Anyag és Módszer

Hazai beteganyag. Az *in silico* mRNS expressziós adatok validálásához a Budai MÁV kórház anyagából (1999-2002) gyűjtött 127 emlődaganatos beteg archivált szövetmintáinak duplikátumaiból készült TMA metszeteket használtuk. Parciális vagy totális mastectomiát követően 50 beteg (39,7%) nem kapott további kezelést, 16 beteg (12,6%) kizárólag sugárkezelésben, 12 beteg (9,4%) csak kemoterápiában (taxán és antraciklin), 40 beteg sugár és kemoterápiában is részesült, míg 9 betegnél nem volt információnk a követő terápiáról. Részletes betegadatokat a **9. táblázat** foglalja össze.

Külföldi beteganyag. A neoadjuvánsan kezelt 96 emlődaganatos beteg formalin-fixált, paraffinba ágyazott 1998-2009 közötti szövetmintáinak duplikátumaiból készült TMA metszetek a Zürich-i Egyetem Oktató Kórházának Sebészeti Patológiai Intézetéből

8. táblázat. Neoadjuváns terápia hatékonyságát értékelő leggyakoribb klasszifikációs rendszerek

Klasszifikáció		Patológiai válasz a neoadjuváns kezelésre			
¹ NSABP	pCR	Szövettanilag nincs kimutatható tumorsejt			
	pINV	Szövettanilag van kimutatható tumor			
Miller-Payne	Primer tumor (Grade-G)				
	1	A malignus sejtek változnak, de számuk nem csökken			
	2	A tumorsejtek számának mérsékelt csökkenése (<30%),			
	3	A tumorsejtek közepes fokú (30-90%-os) csökkenése,			
	4	A tumorsejtek nagy része (>90%) eltűnt,			
	5	Nincs invazív tumor csak <i>in situ</i> tumor, ill. stroma van			
	Nyirokcsomó (N) válasz				
	1	Nyirokcsomó negatív			
	2	Nyirokcsomó pozitív és nincs terápiás hatás			
	3	Nyirokcsomó pozitív és van részleges terápiás hatás			
	4	A nyirokcsomó a kezelés hatására negatívvá vált			
Sataloff	Primer tumor (T)				
	A	Teljes, vagy közel teljes terápis hatás			
	B	Több mint 50%-os terápiás hatás, de nem teljes			
	C	Kevesebb, mint 50%-os hatás			
	D	Nincs terápiás hatás			
	Nyirokcsomó (N)				
	A	Van terápiás hatás, áttét nem mutatható ki			
	B	Nincs áttét, vagy terápiás hatás			
	C	Van terápiás hatás, de áttét kimutatható			
	D	Áttét kimutatható, nincs terápiás hatás			
² EWGBSP	Primer tumor (TR)				
	1	Teljes patológiai regresszió			
	a	Nincs reziduális carcinoma			
	b	Nincs reziduális invazív carcinoma, de van DCIS			
	2	Részleges terápiás válasz			
	a	Minimális (<10%) reziduális (invazív) daganat			
	b	Van vála10-50% reziduális (invazív) daganattal			
	c	Van válasz, de >50% reziduális (invazív) daganattal			
	3	Nincs regresszióra utaló jel			
	Nyirokcsomók (NR)				
	1	Nincs áttét, regressziós jelek sem láthatók			
	2	Nincs áttét, de regressziós jelek láthatók			
	3	Áttét a regresszió jeleivel			
	4	Áttét, regressziós jelek nélkül			
Pontozás:0-6		Klinikai stage	Patológiai stage	Tumor marker	
³ CPS EG			I; IIA=0	0; I=0	ER negative=1
			IIB, IIIA=1	IIA/B; IIIA/B=1	G3 ⁴ =1
			IIIB, IIIC=2	IIIC=2	

¹NSABP: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project²EWGBSP: European Working Group for Breast Screening Pathology;³CPS EG: Clinical Pathological Stage combined with Estrogen receptor status and Grade by M.D. Anderson Center (MDACC), ⁴G3:grade 3

9. táblázat. Az mRNS és fehérje szintű connexin expressziós vizsgálatokban tesztelt emlőcarcinomák klinikopatológiai jellemzői

	<i>In silico</i> adatbázisok		TMA minták		
			Adjuvánsan kezelt	Neoadjuvánsan kezelt	
Beteganyag	Affymetrix	Illumina		PST előtt	PST után
Betegszám (n)	1809	1988	127	96	
Életkor (év ± SD)	57 ± 13	61,8 (median)	59 ± 12	52 (median)	
Követési idő (év, hó ± SD)	123 ± 82	86,4 (median)	101 ± 40	2-10 év	
Relapszus/Halál (n %)	690 (38,1%)	643 (32,3%)	42 (33,1%)	18 (18,8%)	
Grade 1	198 (10,9%)	170 (8,6%)	41 (32,3%)	1 (1%)	
Grade 2	534 (29,5%)	775 (39%)	41 (32,3%)	42 (44%)	
Grade 3	312 (17,2%)	954 (48%)	44 (34,6%)	38 (40%)	
nincs adat	745 (41,2%)	89 (4,4%)	1 (0,8%)	15 (15%)	
IDC	0	0	88 (69,3%)	75 (78%)	
ILC	0	0	13 (10,2%)	18 (19%)	
Egyéb	0	0	14 (11,0%)	3 (3,2%)	
Ismeretlen	1809	1988	12 (9,4%)	0	
ER pozitív	968 (53,5%)	1517 (96,3%)	89 (70,1%)	68 (71%)	59 (62%)
Luminális A	969 (53,6%)	825 (41,5%)	70 (56%)	NA	NA
Luminális B	536 (29,6%)	668 (33,6%)	19 (15,2%)	NA	NA
ER negatív	578 (31,9%)	471 (23,7%)	36 (28,3%)	25 (26%)	16 (17%)
HER2 pozitív	295 (16,3%)	242 (12,1%)	15 (12%)	28 (29%)	18 (19%)
TNBC	230 (12,7%)	331 (16,7)	21 (16,8%)	NA	NA
Ismeretlen	0	0	2 (1,6%)	3 (3%)	21 (21%)

TMA: szöveti multiblokk; SD: standard hiba; IDC: invazív ductalis carcinoma; ILC: invazív lobularis carcinoma; ER: ösztrogén receptor; TNBC: tripla negatív emlő carcinoma csoport, PST: primer szisztémás terápia

(Svájc) származtak. Kemoterápiaként a betegek docetaxánt (75mg/m^2), epirubicint (90mg/m^2), cyclophosphamidot (500mg/m^2), doxorubicint (50mg/m^2), vinorelbint (30mg/m^2), fluorouracilt (500mg) és trastuzumabot (250mg/m^2) kaptak. A preoperatív kemoterápiás információnk 73 betegnél volt, 24-en Docetaxán/epirubicint, 23-an epirubicin/cyclophosphamid/fluorouracilt, 7-en docetaxán/trastuzumabot, míg 5-en vinorelbin/trastuzumabot kaptak 2-6 ciklusban. Preoperatív core biopsziák és hozzájuk tartozó posztoperatív szövet 64 esetben volt. Core biopszia műtéti anyag nélkül 17 esetben, míg kemoterápia utáni műtéti anyag core biopszia nélkül 15 esetben volt. A vizsgált mintákból 75 eset (78%) invazív ductalis, 18 (19%) invazív lobularis, 2 (2%) metaplasticus és 1 eset kissejtes carcinoma volt. A betegek átlag életkora 54 év (30-74

év) volt. A tumorok differenciáltsági foka, 81 esetben volt megállapítható: 38 (40%) grade 3-as, 42 eset (44%) grade 2-es és egy grade 1-es eset. Műtési információnk 8 betegnél nem volt, mastectomiában 60 beteg (62%), segmentectomiában 28 beteg (29%) részesült, míg multifokális tumora 15 betegnek (16%) volt. A reziduális tumor mennyiségét százalékos arányban adtuk meg (422). Az ER/PgR és HER2 pozitív tumorok aránya átlagos volt. A klinikai, patológiai és proliferációs adatokat a **10. táblázat** tartalmazza.

10. táblázat. Neoadjuváns kemoterápiával kezelt emlőcarcinomák klinikai, patológiai és proliferációs jellemzői

n=96	Kemoterápia előtt		Kemoterápia után	
Tumor méret	1,5-13 cm		0,3-14 cm	
	cT1	1 (1%)	ypT0	6 (6%)
	a		ypT1	20 (21%)
	b		a	2
	c	1	b	11
	cT2	25 (26%)	c	7
	cT3	22 (23%)	ypT2	31 (32%)
	cT4	41 (43%)	ypT3	24 (25%)
	b	19	ypT4	7 (7%)
	d	22	b	6
	na: 7 (7%)		d	1
			nincs műtét	8 (9%)
Nyirokcsomó státusz	cN0	10 (11%)	pN0	25 (26%)
	cN1	62 (64%)	pN1	27 (28%)
	cN2		pN2	12 (12%)
	cN3	3 (3%)	pN3	14 (15%)
			nincs műtét	8 (9%)
Ki67 státusz	0	2 (2%)	0	22 (28%)
	1 (0-1%)	12 (15%)	1	21 (27%)
	2 (1-5%)	19 (23%)	2	11 (14%)
	3 (6-10%)	13 (16%)	3	3 (4%)
	4 (11-15%)	6 (7%)	4	1 (1%)
	5 (16-20%)	4 (5%)	5	6 (8%)
	6 (21-33%)	2 (2%)	6	1 (1%)
	7 (34-50%)	4 (5%)	7	2 (3%)
	8 (51-66%)	1 (1%)	8	0 (0%)
	9 (67-80%)	3 (4%)	9	3 (4%)
	10 (81-100%)	1 (1%)	10	2 (3%)
	na	14 (17%)	na	7 (9%)
	Σ	64+17 (100%)	Σ	64+15 (100%)

na: nincs pontos adat

Szöveti receptor vizsgálatok. Az emlőcarcinoma immunhisztokémiai tipizálásához (ER, klón: 6F11, 1:200; PR, klón: NCL-PGR-312 1:600/ vagy: 1A6, 1-200; HER2, klón: CB11, 1:400/ vagy Herceptest, Dako; Ki67, klón: Mib1, 1:100) Ventana Benchmark

immunfestő automatát használtunk (Roche, Mannheim, Németország) (427). A HER2 génamplifikációt és CEP17 próbát is alkalmazó FISH módszerrel teszteltük (428).

A reakciók értékelése digitális metszeteken. Az immunreakciókat digitális metszeteken két független szakértő értékelte (VZS és TI, ill., KT és TI) a TMA modul szoftver alkalmazásával (427, 428). A connexin pozitív tumorsejtek arányát 4-fokozatú skálán (0: <5%, 1: 5-20%, 2: 21-60%, 3: >60%) adtuk meg. Mind a sejtmembrán, mind a citoplazma festődést értékeltük. Belső kontrollként a stroma és a normál emlőhám szolgált. A Ki67 reakciót 10-es skálán értékeltük, 0: negatív, 1: 0-1%, 2: 2-5%, 3: 6-10%, 4: 11-15%, 5: 16-20%, 6: 21-33%, 7: 34-50%, 8: 51-66%, 9: 67-80%, 10: 81-100% pozitív tumorsejt.

A neoadjuváns terápiára adott regressziós válasz meghatározása. Primer szisztémás kezelésre adott válasz (nincs, *in situ* vagy invazív) alapján 89 esetet tudtunk a leginkább elterjedt klasszifikációs rendszerekben osztályozni. Besorolás: NSABP (pCR 5, pINV 84), Miller-Payne (G1 10, G2 20, G3 40, G4 14 és G5 5), Sataloff T (TA 20, TB 30, TC 29 és TD 10), EWGBSP (TR1a 4, TR1b 1, TR2a 14, TR2b 31, TR2c 29 és TR3 10). A CPS EG pontrendszert, mely a hormon receptor státuszt és a tumor differenciáltságát is vizsgálja 55 esetben tudtuk használni (0=0, 1=2, 2=19, 3=17, 4=12, 5=5 és 6=0).

Adatbázis elemzés és statisztikai értékelés. A connexin mRNS expresszió *in silico* elemzését nyilvánosan elérhető „online” adatbázisokból 1809 (Affymetrix, HGU 133A és HGU133+2 platformok), ill. 1899 (Illumina, HT-12v3 platform) emlőrákos beteg túlélési adataival összefüggésben végeztük (429, 430). Az mRNS génexpressziós adatokat R statisztikai környezetben (2.10.1, R Foundation, Bécs, Ausztria) vizsgáltuk (431). A kategorikus változók értékeléséhez chi-négyzet tesztet végeztünk. Sperman-Rank tesztet használtunk a connexinek és a hagyományos prognosztikus markerek eredményeinek összevetéséhez. A prognosztikus eredményeket Kaplan-Meier görbéken ábrázoltuk a kockázati arány (HR) és log-rank teszt p értékeinek feltüntetésével. Teljes túlélési (OS), betegségmentes túlélési (DFS) és távoli áttétmentes túlélési (DMFS) adatokat elemztünk. Több marker prognosztikus értékének összehasonlításához Cox regresszió analízist alkalmaztunk multivariancia modellben 95%-os konfidencia intervallummal.

9.3. Eredmények

A connexin mRNS expresszió összefüggései az emlőrák prognózisával

Affymetrix adatbázis

A connexin mRNA expresszió *in silico* analízissel nyert prognosztikus összefüggéseit a **11. táblázat** összegzi. Szignifikánsan jobb RFS-t találtunk: emelkedett (> median) Cx32 mRNA szint mellett az egész beteganyagban; valamint emelkedett Cx43 mRNA szint mellett a SEER prevalenciájú csoportban (**37a. ábra**), ER pozitív tumorokban, a luminalis A csoportban, az ER és nyirokcsomó pozitív daganatokban (**37b. ábra**) és az ER pozitív endokrin terápiában részesült betegeknél (**37c. ábra**). A magasabb Cx43 mRNA expresszió szignifikánsan rosszabb RFS-t csupán az ER negatív csoportban mutatott (**37d. ábra**). Emelkedett Cx46 mRNA szint szignifikánsan jobb RFS-el járt az egész beteganyagban (**37e. ábra**), valamint az ER és nyirokcsomó kettős pozitív grade 3-as daganatokban (**37f. ábra**). Emelkedett Cx43 mRNA szint szignifikánsan jobb DMFS-hez társult az egész beteganyagban, a nyirokcsomó negatív betegekben, az ER pozitív endokrin terápiában részesült betegekben (**37g. ábra**) és a grade 2-es tumorokban (**37h. ábra**). Ezzel szemben az OS és a Cx43 mRNA expresszió az ER negatív esetekben inverz korrelációt mutatott (**37i. ábra**).

Illumina adatbázis

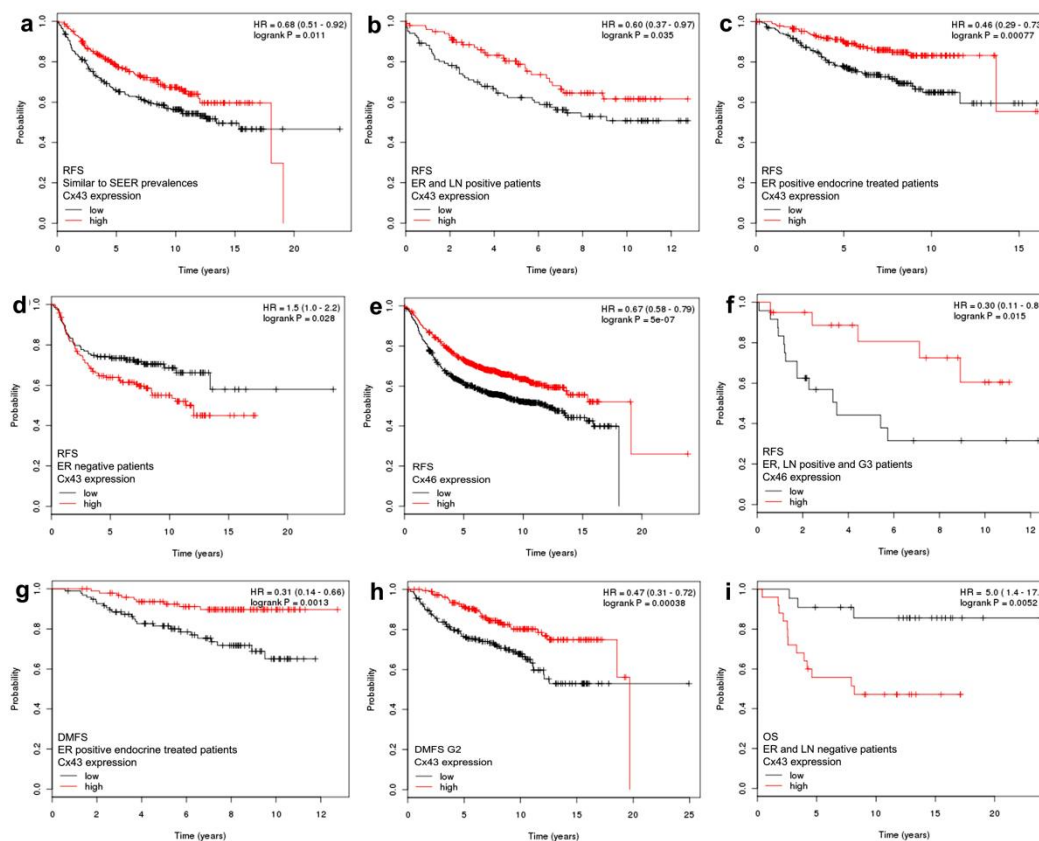
Cx26 és Cx30 mRNA expressziós adatokat csak az Illumina adatbázis tartalmazott. Azon kívül, hogy az emelkedett Cx26 mRNA expresszió csökkent OS-el járt luminalis B daganatokban, más szignifikáns összefüggést a Cx26 az emlőrák prognózisával nem mutatott. Míg a magasabb Cx30 mRNA szint rosszabb OS-el járt az egész beteganyagban, az ER pozitív csoportban, a luminalis A és B altípusokban (**38a. ábra**), valamint az ER pozitív endokrin terápiában részesült betegcsoportban (**38b. ábra**); addig kedvezőbb túléléssel járt az ER negatív, HER2 pozitív, illetve a tripla negatív tumorokban (**38c. ábra**).

Az Illumina platform Cx43, Cx46 és Cx32 mRNA expresszióra vonatkozó prognosztikus adatai (OS) jól korreláltak az Affymetrix platform DFS-re és OS-re vonatkozó eredményeivel. Így, az emelkedett Cx43 expresszió kedvezőbb túléléssel járt a teljes beteganyagban (**38d. ábra**), az ER pozitív csoportban, a luminalis A alcsoportban és az ER pozitív endokrin terápiában részesült betegcsoportban (**38e. ábra**); míg kedvezőtlenebb OS-el járt ER negatív tumorokban (**38f. ábra**) és a tripla negatív esetekben. A Cx46 expresszió ugyancsak kedvezőbb prognózissal járt a teljes beteganyagban (**38g. ábra**), a luminalis A alcsoportban, ER negatív daganatokban (**38h. ábra**), a HER2 pozitív betegekben (**38i. ábra**), valamint a kemoterápiával kezelt esetek-

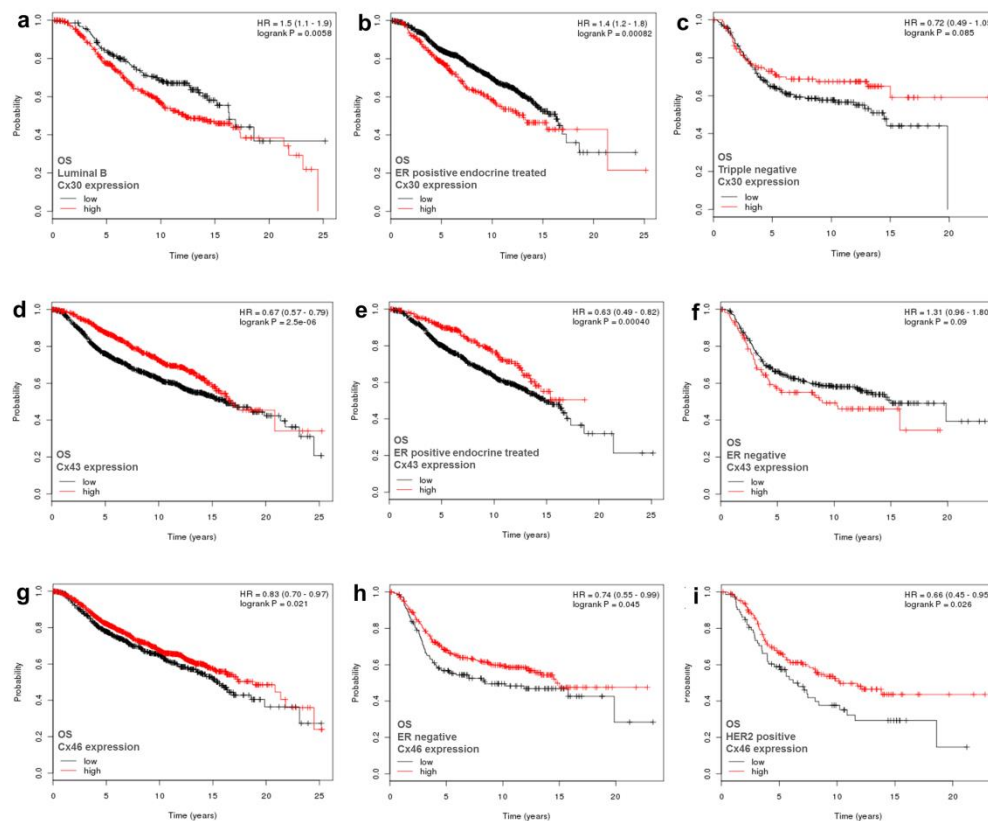
11. táblázat. Connexin mRNS expresszió prognosztikus korrelációi 1809 (Affymetrix), illetve 1899 (Illumina) emlőcarcinoma *in silico* analízise alapján

Connexin izotípus	Szignifikáns prognosztikus összefüggés		Házárd funkció	95% Konfidencia intervallum	Log-rank p szignifikancia
	Pozitív	Negatív			
GJA1 (Cx43)	Egész beteganyag (I)		0,67	0,57-0,79	2,5e-06
	Egész beteganyag (A/M)		0,63	0,47-0,85	0,002
	SEER prevalencia (A)		0,68	0,51-0,92	0,011
	ER pozitív (A)		0,79	0,63-0,99	0,036
	ER pozitív (I)		0,68	0,56-0,83	9,3e-05
	Luminalis A (I)		0,70	0,52-0,93	0,015
	G2 tumorok (A/M)		0,47	0,31-0,72	0,00038
	ER és LN pozitív (A)		0,63	0,41-0,98	0,039
	Endokrin kezelt (A)		0,46	0,29-0,73	0,00077
	Endokrin kezelt (A/M)		0,31	0,14-0,66	0,0013
	Endokrin kezelt (I)		0,63	0,49-0,84	0,0004
		ER negatív (A)	1,5	1,00-2,20	0,028
		ER és LN negatív (A/OS)	5,0	1,40-17,6	0,0052
		ER negatív (I)	1,31	0,96-1,18	0,09 (trend)
GJA3 (Cx46)	Egész beteganyag (A)		0,67	0,58-0,79	5,00E-7
	Egész beteganyag (I)		0,83	0,70-0,97	0,021
	Luminalis A (I)		0,72	0,53-0,98	0,036
	ER negatív (I)		0,74	0,55-0,99	0,045
	HER2 pozitív (I)		0,66	0,45-0,95	0,026
	Kemoterápia (I)		0,73	0,55-0,98	0,035
GJB1 (Cx32)	Egész beteganyag (A)		0,63	0,54-0,73	2,4e-09
	Egész beteganyag (I)		0,81	0,70-0,95	0,0095
	ER pozitív (I)		0,82	0,68-0,99	0,043
	Luminalis B (I)		0,77	0,60-0,98	0,034
	Endokrin kezelt (I)		0,81	0,66-1,00	0,046
GJB2 (Cx26)		Luminalis B (I)	1,40	1,10-1,80	0,012
		Egész beteganyag (I)	1,20	1,00-1,40	0,058 (trend)
GJB6 (Cx30)		Egész beteganyag (I)	1,20	1,10-1,50	0,0088
		ER pozitív (I)	1,40	1,10-1,70	0,0012
		Luminalis A (I)	1,50	1,10-2,10	0,0088
		Luminalis B (I)	1,50	1,10-1,90	0,0058
		Endokrin kezelt	1,40	1,20-1,80	0,00082
	HER2 pozitív		0,73	0,50-1,06	0,1 (trend)
	Tripla negatív		0,72	0,49-1,05	0,085 (trend)

A: Affymetrix platform, relapszus mentes túlélés (RFS), ha külön nincs jelölve; távoli áttétmentes túlélés (DMFS) M-mel jelölve, ill. teljes túlélés (OS); I: Illumina platform, OS adatok.



37. ábra. Emelkedett (>median) Cx43 (a-d, g-i) és Cx46 (e-f) mRNS expresszió szignifikáns prognosztikus összefüggéseinek Kaplan-Meier görbéi 1809 emlőrákban Affymetrix adatbázis alapján.

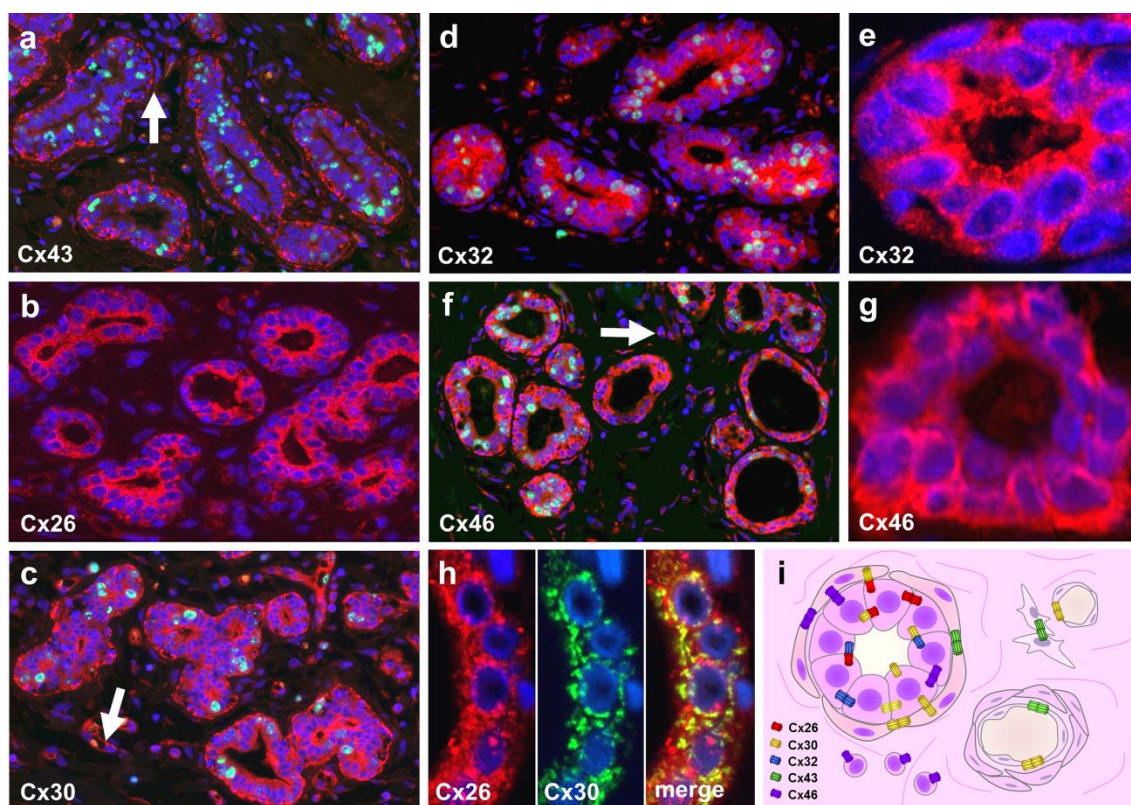


38. ábra. Emelkedett (>median) Cx30 (a-c), Cx43 (d-f) és Cx46 (g-i) mRNS expresszió szignifikáns prognosztikus összefüggéseinek Kaplan-Meier görbéi 1899 emlőrákban Illumina adatbázis alapján.

ben. A magasabb Cx32 mRNS expresszió kedvezőbb túléléssel járt az egész beteganyagban, az ER pozitív esetekben, különösen a luminalis B alcsoportban és az ER pozitív endokrin terápiában részesült betegekben.

Connexin fehérje izotípusok kifejeződése normál, pre-menopauzális emlőszövetben

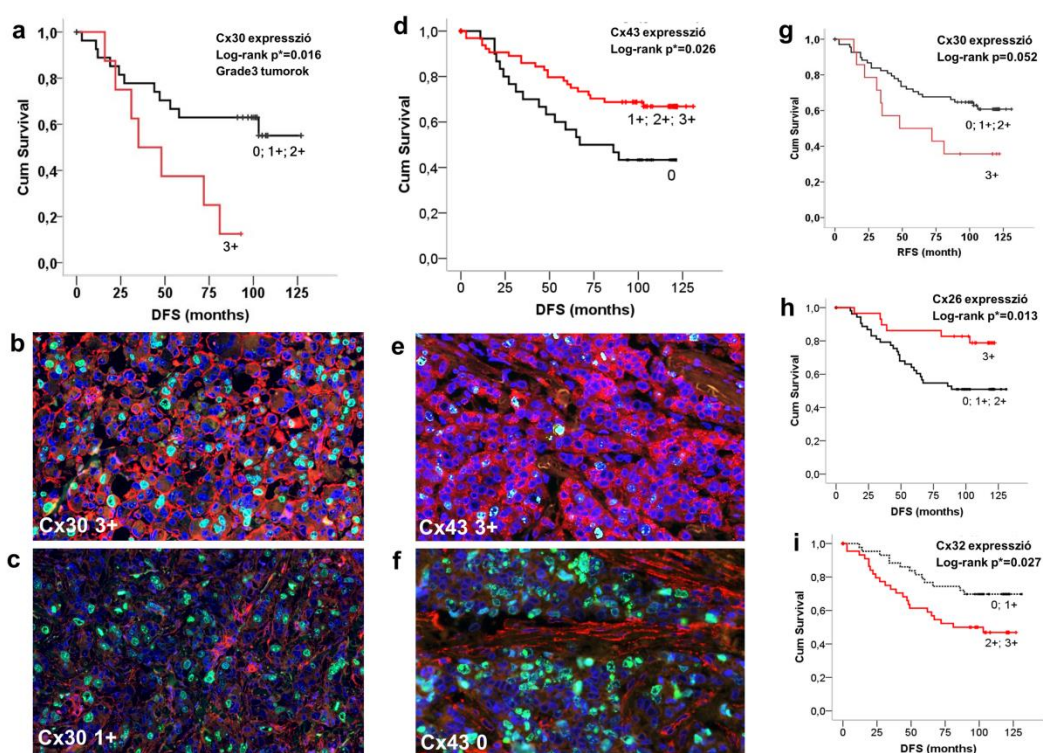
Normál emlőmirigyben a connexinek a sejtmembránban és részben a citoplazmában lokalizálódtak. Az eddig ismertekkel megegyezően a Cx43 fehérjét a myoepithel, stroma és endothel sejtekben mutattuk ki (39a. ábra), míg a Cx26 fehérjét a luminalis hámsejtekben (39b. ábra). Emellett, emberi emlőszövetben elsőként mutattunk ki Cx30 fehérjét, ami a myoepithel sejtekben és a luminalis sejtek lumen felőli oldalán mutatkozott (39c. ábra), Cx32 fehérjét a luminalis hámsejtekben (39d-e. ábra), valamint Cx46 fehérjét mind a myoepithelialis mind a luminalis sejtekben (39f-g. ábra). Megfigyeléseinket az 39i. ábra összegzi.



39. ábra. Connexin fehérje izotípusok (Alexa-546, piros) és Ki67 proliferációs marker (Alexa-488, zöld) kimutatása menopauza előtti nők normál emlőszövetében. Pontszerű Cx43 reakció a myoepithel sejtekben és a környező stromasejteken (nyíl) (a); Cx26 (b) és Cx32 (d-e) fehérje főleg a luminalis sejtekben; Cx30 a myoepithel sejtekben, a luminalis sejtek apikális oldalán és az ér endothelben látszik (nyíl) (c), míg Cx46 fehérje mind a myoepithelialis, mind a luminalis sejtekben és néhány gyulladásos sejtben is (nyíl, f-g). Erős nagyításnál a Cx32 főleg a luminalis sejtek (e), a Cx46 pedig főleg a bazális sejtek (g) citoplazmájában és a membrán régiójában dúsult. Cx26 (piros) és Cx30 (zöld) együttes kifejeződése (sárga) luminalis sejtek citoplazma és membrán régióiban (h). Sejtmag-festés, Hoescht (kék). A vázlatos rajz (i) a lehetséges homo- és heterocellularis/típusos Cx26 (piros), Cx30 (sárga), Cx32 (kék), Cx43 (zöld) és Cx46 (lila) csatornákat mutatja normál emlőben.

Connexin fehérjeszintek a hagyományos prognosztikus faktorok összefüggései

A connexinek prognosztikus értékét log-rank teszttel (p), míg a hagyományos markerekkel való összevetésben Spearman-rank tesztet (ρ) vizsgáltuk. Az mRNS expressziós eredményekhez hasonlóan szignifikáns összefüggést találtunk az emelkedett (3+) Cx30 fehérje expresszió és a csökkent RFS között grade 3-as tumorokban ($p=0,016$) (40a-c. ábra) és hasonló, közel szignifikáns tend látszott a teljes beteganyagban ($p=0,052$) (40g. ábra). Magasabb Cx30 kifejeződés (3+) pozitív összefüggést mutatott a mitotikus index-szel (MI) ($\rho=0,29$). Hasonlóan a Cx43 mRNS expressziós eredményekhez, a Cx43 fehérje kifejeződése (1-3+) szignifikánsan jobb RFS-sel járt az egész beteganyagban ($p=0,026$) (40d-f. ábra) és a grade 2-es tumorokban ($p=0,032$). A Cx43 kifejeződés ugyancsak pozitív összefüggést mutatott a HR státusszal ($\rho=0,23$) és negatív korrelációt a tumor grade-del ($\rho=-0,22$). A Cx46 kifejeződése negatív összefüggést mutatott a tumor grade-del ($\rho=-0,2$), de csak pozitív tendenciát a betegség prognózisával.



40. ábra. Connexin fehérje izotípusok immunfluoreszcens kimutatása (piros) a Ki67 (zöld) fehérje mellett invazív emlőrákokban (b, c, e, f) és a connexin fehérje szintek szignifikáns prognosztikus összefüggéseinek Kaplan-Meier görbéi (a, d, g, h, i).

Az *in situ* Cx26 és Cx32 fehérjeszintek ellentmondó prognosztikus eredményeket adtak az mRNS szintű összefüggésekhez képest. Magas Cx26 expresszió (3+) szignifikánsan jobb RFS-t mutatott az egész beteganyagban ($p=0,013$) (40h. ábra), az ER pozitív ($p=0,007$) és a luminalis A alcsoportban ($p=0,017$). A Cx26 expresszió és az NPI között negatív összefüggést találtunk ($\rho=-0,25$). Közepes és erős Cx32 fehérje szint (2-3+)

negatív összefüggést mutatott az RFS-sel az egész beteganyagban ($p=0,033$) és a luminalis B-HER2 pozitív csoportban ($p=0,025$), valamint pozitív összefüggést a tumor grade-del ($p=0,34$), a nekrozis jelenlétével ($p=0,19$), az NPI-vel ($p=0,28$), a MI-vel ($p=0,27$) és a Ki67 expresszióval ($p=0,21$), illetve negatív összefüggést a HR státusszal ($p=0,3$).

Connexin fehérje szintek önálló prognosztikus értéke

A tradicionális prognosztikus faktorok közül az NPI>4, MI>25 és Ki67 expresszió >50% (7-es osztályzat) statisztikailag rosszabb RFS-el ($p_{NPI}=0,011$, $p_{MI}=0,002$, $p_{Ki67}=0,001$), míg a HR pozitivitás kedvezőbb RFS-sel járt ($p=0,002$) a vizsgált beteganyagban.

Cox multivariancia analízisben Cx26, Cx30 és Cx43 prognosztikus értékét tudtuk összevetni a nekrozissal, érinvázióval, MI-vel, Ki67 expresszióval és a HR státusszal, a Cx32 expressziót pedig az érinvázióval (12. táblázat).

12. táblázat. Connexinek fehérje szintű analízisének prognosztikus értéke primer emlőcarcinomákban Cox regressziós multivariancia analízissel

Paraméter	p-érték	HR	95% CI	
			Alsó	Felső
Cx43 (0_123)	0,027	0,470	0,241	0,916
Érinvázio	0,371	0,718	0,348	1,483
Nekrozis	0,643	1,184	0,579	2,419
Cx43 (012_3)	0,048	0,518	0,271	0,993
Érinvázio	0,474	0,766	0,369	1,589
Mitotikus index	0,329	1,386	0,719	2,671
Cx26 (012_3)	0,022	0,354	0,146	0,863
Érinvázio	0,047	0,404	0,165	0,987
Hormon receptor	0,007	0,368	0,179	0,759
Cx26 (012_3)	0,015	0,329	0,134	0,809
Érinvázio	0,073	0,443	0,182	1,079
Nekrozis	0,395	1,402	0,643	3,058
Ki67	0,009	5,384	1,535	18,881
Cx26 (012_3)	0,019	0,314	0,119	0,829
Érinvázio	0,091	0,462	0,189	1,130
Cx30 (012_3)	0,016	4,209	1,309	13,539
Mitotikus index	0,885	0,856	0,130	7,102
Nekrozis	0,178	2,153	0,706	6,569
Cx32 (01_23)	0,032	2,103	1,064	4,155
Érinvázio	0,319	0,670	0,305	1,471

HR: Kockázati funkció; CI: Konfidencia intervallum
0123: pontozási kategóriák, ahol _ a küszöbérték

Primer emlőcarcinomákban a >50% Cx26 expresszió (3+), illetve a >5% Cx43 expresszió (1-3+) szignifikánsan erősebb, független prognosztikus faktornak bizonyult, mint a nekrozis és az érinvázio. A 3+ Cx26 expresszió közel olyan jó prognosztikus faktor volt, mint a HR státusz és a Ki67 index, míg az erős Cx43 pozitivitás (>50%, 3+) közel olyan prognosztikus faktornak bizonyult, mint a MI. Az erős Cx30 pozitivitás (>50%, 3+) a grade 3-as tumorokban jobb, független negatív prognosztikus faktornak

bizonyult, mint az MI vagy a nekrozis, míg az alacsony Cx32 pozitivitás (<20%, 0-1+) jobb prognosztikus faktor volt az érinváziónál.

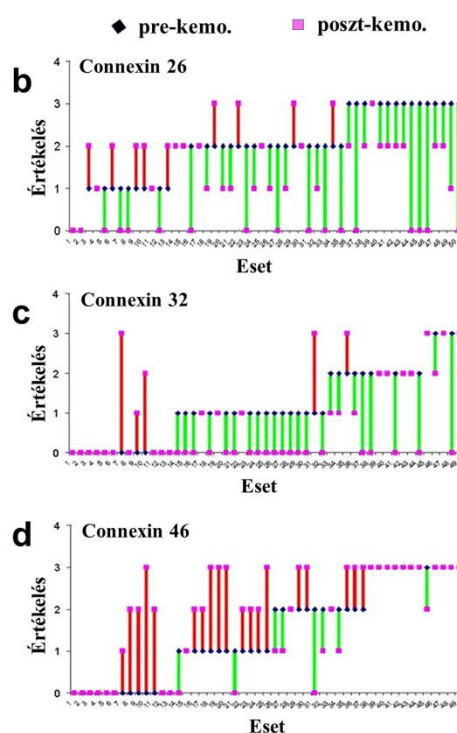
Neoadjuvánsan kezelt emlőcarcinomák

Connexin fehérje izotípusok kifejeződésének változása neoadjuváns terápiára

A connexin fehérje szintek változását kemoterápia után a **41. ábra** foglalja össze, míg a **42. ábrán** ennek megfelelő connexin immunfluoreszcens reakciók láthatók. A teljes beteganyagban a kezelés hatására mind a Cx26-ot kifejező tumorok száma, mind az egyes tumorokban a Cx26 pozitív tumorsejtek száma csökkent. A negatív esetek száma 3%-ról 25%-ra emelkedett ($p < 0,001$), míg az erősen Cx26 pozitív (3+) esetek száma

a	Kemoterápia előtt (n=81)	Kemoterápia után (n=79)	p-érték
Connexin 26			
0	2 (3%)	20 (25%)	$p < 0,001$
1+	17 (21%)	17 (22%)	nsz
2+	24 (30%)	24 (31%)	nsz
3+	26 (32%)	8 (10%)	$p < 0,006$
né	12 (14%)	10 (12%)	
Connexin 32			
0	15 (19%)	39 (49%)	$p < 0,004$
1+	28 (35%)	13 (17%)	$p < 0,043$
2+	17 (21%)	11 (14%)	nsz
3+	7 (8%)	7 (9%)	nsz
né	14 (17%)	9 (11%)	
Connexin 43			
0	42 (51%)	44 (56%)	nsz
1+	9 (11%)	16 (20%)	nsz
2+	8 (10%)	7 (9%)	nsz
3+	11 (14%)	4 (5%)	nsz
né	11 (14%)	8 (10%)	
Connexin 46			
0	18 (22%)	19 (24%)	nsz
1+	19 (23%)	9 (11%)	nsz
2+	16 (20%)	12 (15%)	nsz
3+	16 (20%)	27 (35%)	nsz
né	12 (15%)	12 (15%)	

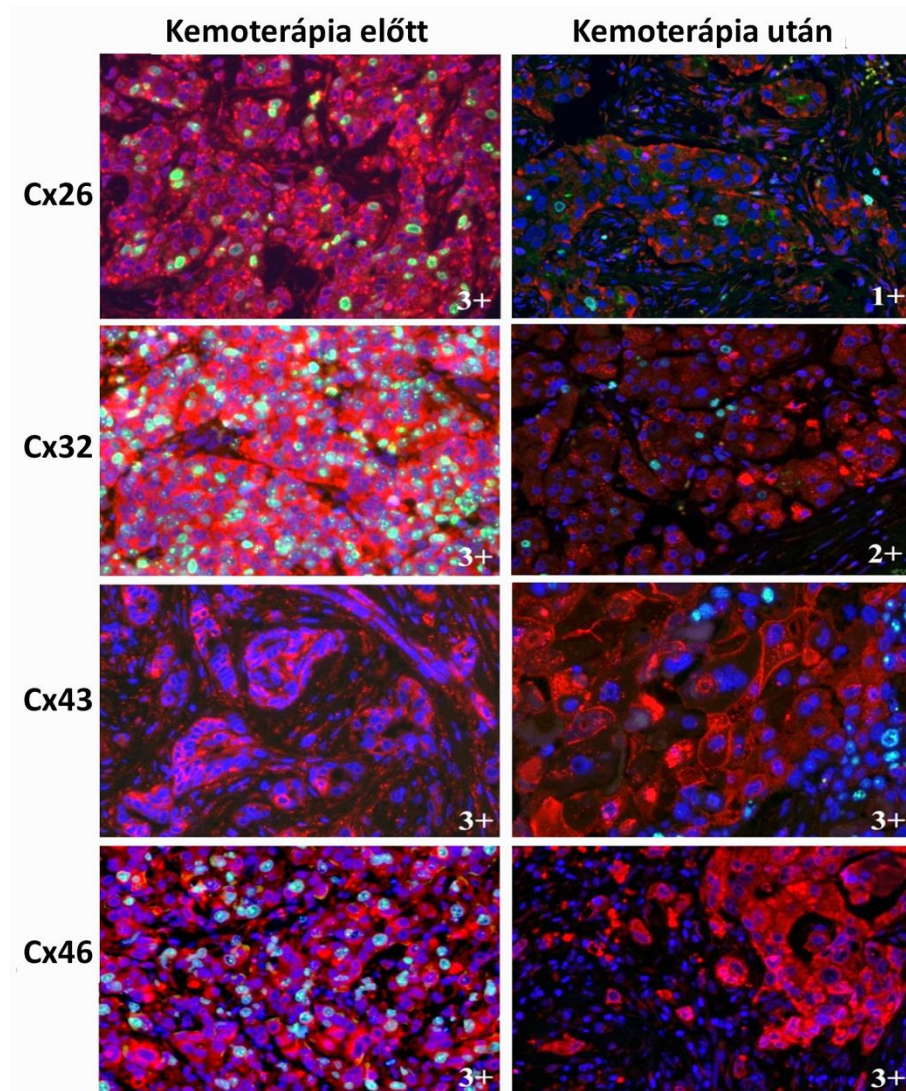
né: nem értékelhető; nsz: nem szignifikáns



41. ábra. Connexin fehérje izotípusok kifejeződése emlőrákban neoadjuváns kemoterápia előtt (pre-kemo) és után (poszt-kemo). Összefoglaló táblázat a szignifikancia értékekkel (a). A Cx26 (b) és a Cx32 (c) szintje jelentősen csökkent (zöld vonal), a Cx46 (d) szintje általában emelkedett (piros vonal), míg a Cx43 szintje mutatta a legkisebb változást kemoterápia hatására. A csak lila négyzet: nincs változás

32%-ról 10%-ra csökkent ($p < 0,006$). A Cx32 expresszió hasonló változást mutatott, a negatív esetek száma 10%-ról 49%-ra nőtt ($p < 0,004$), míg a gyengén pozitív (1+) tumorok száma 35%-ról 17%-ra csökkent ($p < 0,043$). Adjuváns kemoterápiára a Cx43, illetve a Cx46 pozitív esetek száma szignifikánsan nem változott, bár az erősen Cx46 pozitív (3+) tumorok száma emelkedő tendenciát mutatott. A 64 párosított esetből

értékelhető 50 (Cx43-nál 51) esetben ugyancsak a teljes beteganyaghoz hasonló változásokat figyeltünk meg (41b-d. ábrák).



42. ábra. Connexin izotípusok immunfluoreszcens kimutatása (piros) a proliferációs marker Ki67 fehérje (zöld) mellett (a sejtmag kék) invazív ductális emlőrákban neoadjuváns terápia előtt és után. A pontszerű sejtmembrán és citoplazma Cx26 (1. sor) és Cx32 (2. sor) jelölés és a proliferáló (zöld) sejtek száma jelentősen csökkent kemoterápia hatására az eredetileg 3+ tumorokban, míg a Cx43 (3. sor) és Cx46 (4. sor) szintje a 3+ esetekben jelentősen nem változott. Ki67 reakció nem volt a terápia előtti Cx43 és terápia utáni Cx46 mintákon.

Connexinek fehérje szintek és klinikopatológiai paraméterek összefüggései neoadjuvánsan kezelt esetekben

Kemoterápia utáni alacsony (0-ás osztályzat, <5%) Cx26 szint a betegek szignifikánsan jobb túlélésével járt (log-rank $p=0,011$), mint a magasabb (1-3+, >5%) Cx26 szintek. A Cx26 szintek nem mutatattak más szignifikáns kapcsolatot egyéb klinikopatológiai paraméterekkel. A Cx32 expresszió szignifikáns pozitív korrelációt mutatott a HER2 státusszal kemoterápia előtt ($p=0,31$) és negatív összefüggést a patológiai tumor mérettel

(pT) ($\rho=-0,29$). A Cx32 szintje és a Ki67 index között ugyancsak pozitív korreláció volt ($\rho=0,46$) kemoterápia után.

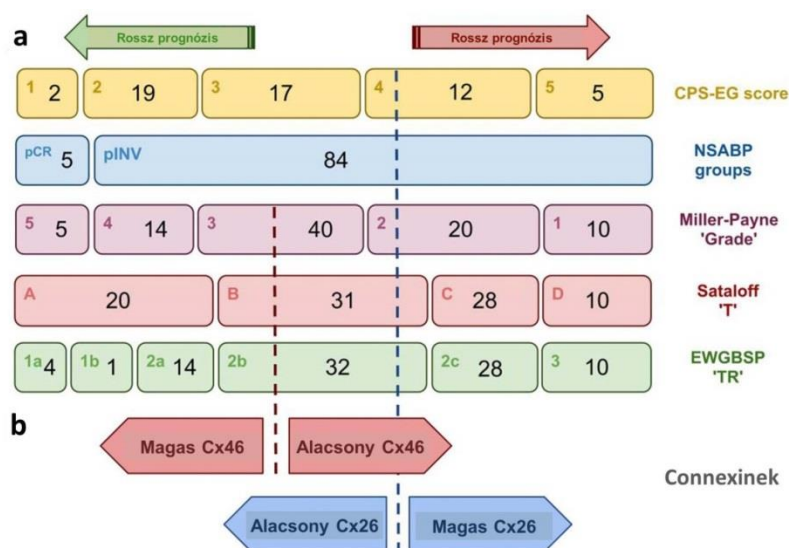
A Cx43 fehérjeszint kezelés előtt pozitív összefüggést adott a kemoterápia előtti és utáni ER és PR szinttel és a klinikai tumor mérettel (cT) ($\rho=0,29-0,36$) és negatív összefüggést a szisztémás terápia előtti HER2 státusszal ($\rho=-0,27$). A Cx46 szint mind kezelés előtt és után pozitív statisztikai korrelációt adott a nyirokcsomó státusszal (pN) ($\rho=0,39$ és $0,32$). A kemoterápia előtti és utáni ER és Ki67 index, valamint a kezelés előtti PR és Ki67 index között negatív összefüggés volt ($\rho=-0,35- -0,46$; ill. $\rho=-0,45, -0,52$). Továbbá, a kemoterápiát követő Ki67 index és HER2 szint, valamint a kezelés előtti és utáni proliferációs index között pozitív összefüggést találtunk ($\rho=0,26$; ill. $\rho=0,46$).

Neoadjuváns kezelésre adott terápiás válasz összefüggése a túléléssel

Az ötféle klasszifikációs rendszer szerint besoroltuk eseteinkben a túléléssel csak a CPS EG rendszer mutatott összefüggést, így az 1, illetve 2 ponttal minősített esetek szignifikánsan jobb túlélést mutattak a magasabb pontszámot (3-5) elérőknél (log-rank $p=0,015$).

A klasszifikációs rendszerek átfedése neoadjuvánsan kezelt beteganyagunkban

A klasszifikációs rendszerek alcsoportjai közötti átfedéseket a vizsgált beteganyagban a **43. ábra** összesíti. A rendszerek kétoldali határoló csoportjaiba, amelyek terápiára



43. ábra. A kezelt daganatok besorolása a klasszifikációs rendszerekbe a terápia hatékonysága szerint (a) és a Cx26 és Cx46 szintek prognosztikus jelentősége (b). A bizonytalanabb köztes kategóriákban, így az NSABP pINV, Miller-Payne G 2-3, Sataloff TB, EWGBSP TR2 és a CPS EG 2-4-ben (a), a magas Cx46, illetve alacsony Cx26 szintek korreláltak a jó prognózissal (b).

különösen jól, ill. nem vagy alig reagáltak, így az EWGBSP TR1a-b-be ill. TR3-ba; a CPS EG 1-be ill. 5-be; a Sataloff TA-ba ill. TD-be, valamint a Miller-Payne G1-be ill. G5-be, jó átfedéssel nagyjából azonos esetek tartoztak. Eseteink többsége a közbenső átmeneti kategóriákba (EWGBSP TR2a-c, CPS EG 2-4, Sataloff TB-C, Miller-Payne G2-4) esett. A bináris NSABP rendszerben, amely a reziduális tumor hiányát (pCR) illetve jelenlétét (pINV) pontozza, 5 eset a pCR kategóriába, míg 84 a pINV csoportba sorolódott.

Connexin fehérje szintek prognosztikus értéke a neoadjuvációs klasszifikációs rendszerekben

A klasszifikációs rendszerek szerint osztályozott tumorok normál eloszlást mutattak, így a connexinek prognosztikus jelentőségét a köztes csoportokban elemezni tudtuk.

A kemoterápia előtt magasabb (>20%, 2+ és 3+) Cx46 fehérje szintű tumorok túlélése szignifikánsan jobb volt az EWGBSP TR2b ($p=0,006$), a Sataloff TB ($p=0,005$) és a Miller-Payne G3 ($p=0,002$) alcsoportban, mint az alacsonyabb (<20%, 0 és 1+) Cx46 szinttel rendelkezőké. Kemoterápia után hasonlóan, a magasabb (>20%) Cx46 szint az EWGBSP TR2b és a Sataloff TB alcsoportokban járt szignifikánsan jobb túléléssel ($p=0,029$). A Miller-Payne G3 alcsoportban a >5% Cx46 expresszió (1-3+) járt kedvezőbb túléléssel, mint az ennél alacsonyabb ($p=0,012$). A >20% Cx46 expresszió (2+ és 3+) ugyancsak jobb túlélést jelentett, mint az ez alatti Cx46 szintek.

Kemoterápia után a <5%-os Cx26 (0) szint szignifikánsan jobb túléléssel járt az NSABP pINV alcsoportban, mint a magasabb (>5 %, 1-3+) Cx26 szintek ($p=0,013$). A Cx26 közel szignifikáns, ugyancsak negatív tendenciát mutatott a túléléssel az EWGBSP TR2b ($p=0,08$), Sataloff TB ($p=0,092$), Miller-Payne ($p=0,053$) és CPS EG 4 ($p=0,06$) alcsoportokban.

9.4. Megbeszélés

Az emlőcarcinomák heterogenitása és terápia rezisztenciája miatt, a hozzáférhető prognosztikus és prediktív markerek mellett, a betegség további molekuláris alapú osztályozására van szükség (432, 433). A connexin dereguláció szerepét az emlőrák kialakulásában, progressziójában és áttétképzésében eddig kevesen tanulmányozták (414, 415, 434). Bár a Cx43 expresszió pozitív korrelációját az ER, PR, ill. negatív kapcsolatát a Ki67 státusszal megfigyelték, a betegség kimenetelében a connexinek szerepét nem

igazolták (419). Kimutatták, hogy Cx43 re-expressziója érzékenyítheti a daganatsejteket a kemoterápiára (435), azonban a connexin kifejeződés és a terápiás válasz összefüggéseit sem kutatták részletesen. Vizsgálatainkban, transzkripciós adatbázisok eredményeivel validálva kimutattuk 5 connexin fehérje izotípus, köztük a már leírt GJA1/Cx43 és GJB2/Cx26 expresszióját normál emlőszövetben és a GJB1/Cx32 izotípusát emlőcarcinomában (413, 418, 436-438). Továbbá, elsőként igazoltuk a GJA3/Cx46, GJA6/Cx30 és GJB1/Cx32 fehérjék kifejeződését normál emberi emlőszövetben, valamint a GJA5/Cx30 izotípust emlőcarcinomában.

Normál emlőmirigyben a sejtmembránhoz kötött connexinek funkcionáló csatornáknak felelnek meg, amelyek akár heterotípusos, heterocellularis csatornákat is létrehozhatnak azonos alosztályba tartozó izotípusokon, így GJA-n vagy GJB-n belül (184, 439). Elméletileg a myoepithelialis Cx43 (GJA1) heterocellularis csatornát alakíthat ki Cx46 (GJA6) fehérjével, de a szintén myoepithelen és a luminalis sejtek között is igazolt Cx30 (GJB6) proteinnel nem. Továbbá a Cx26 (GJB2) és Cx32 (GJB1) létrehozhat homo- és hetrotípusos/heteromer csatornákat a luminalis sejtek között (440) és heterocellularis kapcsolatot a myoepithelialis Cx30-al (441, 442). A connexinek komplex és differenciált szabályozása az emlőmirigy működésének finomhangolását teszi lehetővé a sejtosztódás, -differenciáció, regresszió és tejelválasztás során (414).

Az egyenként közel 2000 minta elemzésén alapuló Affymetrix és Illumina platformok connexin expressziós adatai jó egyezést mutattak egymással. A mRNS eredményekkel egyezően az emelkedett Cx43 fehérje szint szignifikánsan jobb túléléssel járt az adjuvánsan kezelt emlőrákokban, illetve, jobb független prognosztikus markernek bizonyult az érinváziónál és a nekrozisnál. Ezzel szemben az emelkedett Cx30 mRNS és fehérje szint csökkent túléléssel társult, illetve, erősebb prognosztikus markernek bizonyult a mitotikus indexnél és a nekrozisnál. A többi connexin mRNS szinten észlelt prognosztikus értéke fehérje szinten az adjuvánsan kezelt daganatokban vagy eltűnt (Cx46), vagy részben ellentmondó volt (Cx26 és Cx32).

A connexin expresszió szabályozásával kapcsolatos legtöbb adat a Cx43-ra vonatkozik (35), ami vizsgálatainkban mRNS és fehérje szinten is a kedvező prognózis markere volt. Génexpressziós adatelemzésünk megerősítette, hogy ER pozitív primer emlőrákokban a Cx43 expresszióinak tumorgátló (443), míg ER negatív esetekben tumorprotektív szerepe lehet (417). A 17 β ösztadiol az ER α aktiválásával támogatja mind az emlőhám proliferációját (444), mind a Cx43 expressziót és csatorna funkciókat, a connexin csatornák azonban a sejtciklus kontrolljában is részt vehetnek (445). A Cx43 expresszió

így hozzájárulhat az ER pozitív emlőcarcinomák differenciáltabb fenotípusához és kedvezőbb túléléséhez (446). ER negatív daganatokban a Cx43 expressziót más jelutak szabályozhaták, így például a Wnt-1 és/vagy a Ras-Raf-MAPK aktiváció (35), ami mitogén jelutakat is aktiválva differenciálatlanabb fenotípushoz és a rosszabb prognózishoz vezet (447). Így az előrehaladott ER negatív eseteinkben a connexinek is részt vehetnek az áttétképzésben, a daganatsejtek diapedezisében és kolonizációjában, egyezően mások megfigyeléseivel (126, 416, 417, 448, 449). A Cx30 mRNS expresszió ellentétes prognosztikus összefüggéseket mutatott, mint a Cx43. ER pozitív esetekben az emelkedett Cx30 szint kedvezőtlenebb túléléssel járt, míg HER2 pozitív és tripla negatív daganatokban erős tendenciát mutatott a jobb túléléssel.

Az emelkedett Cx46 mRNS szintekhez kedvezőbb túlélés társult adjuvánsan kezelt ER pozitív esetekben, ami megmaradt az ER negatív tumoroknál is. Ez a megfigyelés a Cx43 és Cx46 mRNS ellentétes szabályozására utal ebben az alcsoportban, támogatva mások korábbi adatait, mely szerint a tumor promotor TPA (450) vagy a MAPK/ERK (451) jelút aktiválására a Cx43 szint csökken, míg a Cx46 szint emelkedik. A connexinek differenciált hormonális szabályozása alapja lehet kondicionális tumorszupresszor, vagy promotor hatásuknak. Így nőgyógyászati tumorokban a phorbol észter elősegíti a Cx26 re-expressziót, a PR aktiválása pedig csökkenti a Cx26 kifejeződését, míg a Cx43-ét fokozza (436, 452, 453). A 17β ösztadiol támogatja a Cx43 termelést és csatonafunkciókat (445), de csökkenti a Cx26 és Cx32 kifejeződését és aktivitását (454). A connexinek citoplazmatikus megjelenése felveti a malignus daganatokban már igazolt csatorna független funkciójukat is (449, 455). A connexinek mRNS és fehérje szintű kifejeződésében, valamint a connexin expresszió és az emlőrák prognózisa között olyan izotípusoknál találtunk szoros összefüggést amelyek a normál emlőmirigyben vagy a myoepithelben (Cx43), vagy a myoepithelben és a luminalis hámsejtekben egyaránt megjelentek (Cx30 és Cx46). Ezzel szemben, a normál emlőmirigyben csak a luminalis hámsejtekre korlátozott izotípusok (Cx26 és Cx32) prognosztikus összefüggései ellentmondóak voltak. Tehát a myoepithelben megjelenő connexinek szabályozása, legalábbis emlődaganatokban következetesebb, mint a kizárólag a luminalis hámra jellemző izotípusoké. Fontos megfigyelésünk, hogy a differenciált connexin kifejeződés a prognosztikus csoportok további stratifikációját endegte meg. Így Cx43 expresszió a grade 2-es tumorokat szignifikánsan eltérő RFS-el, míg a Cx30 expresszió a grade 3-as tumorokat szignifikánsan eltérő OS-el járó alcsoportokra osztotta. A connexinek prognosztikus értékét alátámasztja a Cx43 fehérje szint pozitív korrelációja az ER

státusszal és negatív viszonya a tumor grade-el, ill. a Cx30 fehérje szint pozitív korrelációja a mitotikus index-szel.

A transzkripciós adatbázisok elemzése alapján az emelkedett Cx26 mRNS szint rosszabb túléléssel járt, ami egyezett a neoadjuvánsan kezelt emlődaganatokban fehérje szinten megfigyeletekkel. Adjuvánsan kezelt emlőrákokban azonban az emelkedett Cx26 fehérje szint mellett volt kedvezőbb a betegségmentes túlélés. Mások megfigyelései is arra utalnak, hogy a Cx26 képződés szabályozása komplex, dinamikus, sejttípus, differenciáltság és stádium függő lehet. Míg pancreas- és prostata carcinomában például az emelkedett Cx26 expresszió támogatta a carcinogenezist (456, 457), addig primer gyomor- és colorectalis daganatokban a csökkent Cx26 kifejeződés kedvezőtlen túléléssel járt (458, 459). A Cx32 fehérje szintek negatív prognosztikus szerepe a két beteganyag között megegyezett, azonban mRNS szinten Cx32 expresszió a jobb túléléshez társult. Az inkonzisztens eredményekhez a beteganyagok eltérő összetétele is hozzájárulhat. A transzkripciós adatbázisokban a daganatok zöme grade 2-es és grade 3-as volt, míg a hazai adjuvánsan kezelt 127 esetünk, azonos arányban foglalt magába mindhárom grade-ből daganatokat.

A jelentős egyezés a két független mRNS platform prognosztikus eredményei között és az alkalmazott connexin specifikus antitestek Western-blot módszerrel igazolt specificitása alátámasztja, hogy az mRNS és fehérje szintű prognosztikus eltérések nem módszertani eredetűek. Transzkripciós faktorok és epigenetikai folyamatok mellett feltételezhető, hogy a poszt-transzkripciós szabályozás jelentősebben befolyásolja a Cx26 és Cx32 termelést, mint a többi vizsgált izotípus esetében (43).

A neoadjuváns kemoterápia helyileg előrehaladott és primer operábilis emlőrákok egyik standard kezelési módja (420-423, 426). Neoadjuvánsan kezelt emlőrákokban a kemoterápia előtti és utáni Cx46 expresszió, illetve a kemoterápia utáni Cx26 expresszió a klasszifikációs rendszerek köztes kategóriáiban, így a Miller-Payne G2-3-ban, a Sataloff TB-ben, az EWGBSP TR2b-ben, illetve a CPS EG 4-ben, releváns prognosztikus alcsoportokat különített el **(8. ábra)**. Ráadásul kemoterápia előtt a Cx46 fehérje szint volt az egyetlen vizsgált paraméter, amely korrelált a teljes túléléssel. E megfigyelés jelentőségét növeli, hogy mások vizsgálataiban is előfordult, hogy a tradicionális biomarkerek, mint a PR, HER2, grade vagy a tumorméret nem feltétlenül korreláltak a prognózissal sem kemoterápia előtt sem azután (460).

A connexinek carcinogenezisben és áttétképzésben betöltött szerepe ellentmondásos és kontextus függő. Számos korábbi tanulmány megállapította, hogy egyes biomarkerek

szintje megváltozik a primer szisztémás terápia hatására (461, 462). Vizsgálatunkban a neoadjuváns kemoterápiára csökkent Cx26 és Cx32, valamint az emelkedett Cx46 szintek a terápia hatékonyságát jelezték. Megerősítettük a Cx43 kifejeződés pozitív kapcsolatát a HR ill. negatív kapcsolatát a HER2 státusszal (419) és ugyancsak negatív kapcsolatot találtunk a Cx46 és Ki67 szintek között.

9.5. Összefoglalás – Az eredmények újdonságtartalma

- A normál emberi emlőmirigyben a Cx26 és Cx43 izotípusokon kívül elsőként mutattunk ki Cx30, Cx32 és Cx46 izotípusokat, specifikus sejttípusokhoz rendelve.
- Cx43 csatornák a myoepithel sejtekben, Cx26 és Cx32 csatornák a luminalis hámsejtekben, Cx30 csatornák a myoepithel sejtekben és a luminalis sejtek apikális régiójában, míg Cx46 csatornák mind a myoepithel, mind a luminalis sejtekben előfordultak.
- Egyezően az mRNS expressziós adatbázisok eredményeivel, primer emlőcarcinomában a Cx26, Cx32, Cx43 és C46 fehérjén kívül elsőként igazoltunk Cx30 izotípust.
- Összhangban több ezer emlőcarcinomás beteg mRNS expressziós adatbázisokból *in silico* nyert eredményeivel, adjuvánsan kezelt emlőrákokban a Cx43 és Cx30 fehérje expressziója önálló pozitív, illetve negatív prognosztikus faktornak bizonyult.
- Az emelkedett Cx43 mRNS szint jobb túléléssel járt az ER pozitív, luminalis A, valamint grade 2-es emlőrákokban és rosszabb túléléssel társult ER negatív tumorokban.
- Az emelkedett Cx30 mRNS szint rosszabb túléléssel járt az ER pozitív és luminalis A, illetve luminalis B tumorokban és jobb túléléssel társult az ER negatív, HER2 pozitív és tripla negatív tumorokban.
- A neoadjuváns kemoterápiára csökkent Cx26 és Cx32, valamint az emelkedett Cx46 szintek a terápia hatékonyságát jelezték.
- Neoadjuváns terápia során a csökkent Cx26 fehérje szint, ill. az emelkedett Cx46 szint kedvezőbb prognózisú alcsoportokat választott ki a poszt-terápiás klasszifikációk köztes, prognosztikusan nehezen megítélhető csoportjaiban, ahol a kemoterápia előtti Cx46 expresszió bizonyult az egyetlen független prognosztikus faktornak.

Eredményeink rámutatnak a connexinek complex, egymást kiegészítő szabályozására a normál emlőmirigyben, az emlő carcinogenezisében és az emlőrák progressziója során. A differenciált connexin kifejeződés az ismert diagnosztikus emlőcarcinoma alcsoportok további prognosztikus stratifikációját teszi lehetővé. Így Cx43 expresszió a grade 2-es tumorokat szignifikánsan eltérő relapszusmentes túléléssel (RFS), míg a Cx30 expresszió a grade 3-as tumorokat szignifikánsan eltérő teljes túléléssel (OS) járó alcsoportokra osztotta. Eredményeink összességében a Cx43 és Cx46 tumorszupresszor szerepét, míg a Cx26 és Cx32 tumorprotektív szerepét támogatják primer kezelt emlőrákokban. A connexin izotípusok expressziójának meghatározása emlődaganatokban, klinikailag is releváns kiegészítő információkkal szolgál az emlőcarcinoma patobiológiai viselkedésének, valamint a primer szisztémás terápia hatékonyságának előrejelzésében.

10. A tézisek rövid összefoglalása, az eredeti megfigyelések hasznosítása

A connexin („gap junction”) kommunikációs csatornákon <1,8 kDa méretű metabolitok és szabályozó molekulák közvetlenül közlekedhetnek kapcsolódó sejtek citoplazmái között. Szerepüket igazolták a morfogenezis, sejtdifferenciáció és proliferáció szabályozásában, valamint a kompartmentális szövetfunkciók összehangolásában. Ultrastrukturális és immunmorfológiai módszerekkel, állatkísérletekkel, sejt-, génmanipulációs és festék-transzfer tesztekkel, valamint klinikai végpont-analízisekkel vizsgáltuk a connexin csatornákat csontvelőben, az immunrendszerben, regenerációs folyamatokban és daganatokban. Normál, regenerálódó és leukémiás csontvelőben kimutattuk a Cx43 csatornákat csontvelői stromasejteken, megakaryocytákon, adipocytákon, osteoblastokon, valamint stromális és hemopoetikus sejtek között. Elsőként bizonyítottuk a kétirányú heterocelluláris metabolikus kapcsolatot a stroma-hemopoetikus sejthely preferálásával és a Cx43 csatorna szerepét a vérképzés korai szakaszában, nagymértékű progenitor sejtigény kapcsán. Elsőként mutattunk ki connexineket nyirokszervekben és bizonyítottuk a Cx43 típusú csatorna felülregulációját antigén-inger hatására a csíracentrumok formálódó follikuláris dendritikus sejt (FDC) hálózatán és B-sejteken. Igazoltuk a metabolikus kommunikációt FDC-FDC és FDC-B-sejtek között és a csatorna gátlásával kritikus szerepüket e sejtek túlélésében. Lézer-ablációt követően igazoltuk, hogy a regenerálódó cornea hám erőteljes proliferáció és migráció mellett jelentős Cx26, Cx43 expressziót mutatva megtartja képességét a metabolikus kommunikációra. Indukált izomregenerációban a Cx43 csatorna és a p21^{waf1}/p27^{kip1} ciklin-függő kináz inhibitor pozitív myoblast frakció szinkron felülregulációja, majd a csatorna eltűnése myotubulusokban szerepüket igazolta a pre-fúziós myoblastok sejtciklusának szinkronizálásában, amit Cx43 génmanipulációs kísérletekkel is alátámasztottunk. Óriássejtes csonttumorban bizonyítottuk a Cx43 membráncsatorna deregulációját neoplasztikus stromasejteken, ami szignifikáns összefüggést mutatott a daganat kliniko-radiológiai progressziójával és kedvezőtlenebb kimenetelével. Emberi emlőmirigyben elsőként mutattunk ki Cx30, Cx32 és Cx46 izotípusokat, illetve, primer emlőcarcinomában Cx30 izotípust. Egyezően több ezer emlőcarcinoma mRNS expressziójának *in silico* analízisével a Cx43 és Cx30 fehérjeszintek önálló pozitív, illetve negatív prognosztikus faktornak bizonyultak. Neoadjuvánsan kezelt emlőcarcinomákban a csökkent Cx26 ill. emelkedett Cx46 szint kedvezőbb prognózisú alcsoportokat különített el a köztes poszt-terápiás alcsoportokban. A connexin csatorna feltérképezése segíti a normál sejtfunkciók és szöveti szintű adaptációs válaszok megértését, továbbá klinikailag releváns információkkal szolgálhat a daganatok patobiológiai viselkedésének és kezelésük hatékonyságának előrejelzéséhez.

11. Irodalomjegyzék

1. Nielsen, M. S., L. N. Axelsen, P. L. Sorgen, V. Verma, M. Delmar, and N. H. Holstein-Rathlou. 2012. Gap junctions. *Compr Physiol.* 2:1981-2035.
2. Phelan, P. 2005. Innexins:members of an evolutionarily conserved family of gap-junction proteins. *Biochim Biophys Acta* 1711:225-245.
3. Panchin, Y. V. 2005. Evolution of gap junction proteins--the pannexin alternative. *J Exp Biol.* 208:1415-1419.
4. Penuela, S., R. Bhalla, X. Q. Gong, K. N. Cowan, S. J. Celetti, B. J. Cowan, D. Bai, Q. Shao, and D. W. Laird. 2007. Pannexin 1 and pannexin 3 are glycoproteins that exhibit many distinct characteristics from the connexin family of gap junction proteins. *J Cell Sci* 120:3772-3783.
5. Herve, J. C., and M. Derangeon. 2013. Gap-junction-mediated cell-to-cell communication. *Cell Tissue Res.* 352:21-31.
6. Mese, G., G. Richard, and T. W. White. 2007. Gap junctions:basic structure and function. *J Invest Dermatol.* 127:2516-2524.
7. Neijssen, J., B. Pang, and J. Neefjes. 2007. Gap junction-mediated intercellular communication in the immune system. *Prog Biophys Mol Biol.* 94:207-218.
8. Sohl, G., and K. Willecke. 2004. Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovasc Res.* 62:228-232.
9. Saez, J. C., V. M. Berthoud, M. C. Branes, A. D. Martinez, and E. C. Beyer. 2003. Plasma membrane channels formed by connexins:their regulation and functions. *Physiol Rev.* 83:1359-1400.
10. Kumar, N. M., and N. B. Gilula. 1996. The gap junction communication channel. *Cell* 84:381-388.
11. Bai, D., and A. H. Wang. 2014. Extracellular domains play different roles in gap junction formation and docking compatibility. *Biochem J.* 458:1-10.
12. White, T. W., D. L. Paul, D. A. Goodenough, and R. Bruzzone. 1995. Functional analysis of selective interactions among rodent connexins. *Mol Biol Cell* 6:459-470.
13. Brink, P. R., K. Cronin, K. Banach, E. Peterson, E. M. Westphale, K. H. Seul, S. V. Ramanan, and E. C. Beyer. 1997. Evidence for heteromeric gap junction channels formed from rat connexin43 and human connexin37. *Am J Physiol* 273:C1386-1396.
14. He, D. S., J. X. Jiang, S. M. Taffet, and J. M. Burt. 1999. Formation of heteromeric gap junction channels by connexins 40 and 43 in vascular smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:6495-6500.
15. Gu, H., J. F. Ek-Vitorin, S. M. Taffet, and M. Delmar. 2000. Coexpression of connexins 40 and 43 enhances the pH sensitivity of gap junctions:a model for synergistic interactions among connexins. *Circ Res.* 86:E98-E103.
16. Bouvier, D., G. Spagnol, S. Chenavas, F. Kieken, H. Vitrac, S. Brownell, A. Kellezi, V. Forge, and P. L. Sorgen. 2009. Characterization of the structure and intermolecular interactions between the connexin40 and connexin43 carboxyl-terminal and cytoplasmic loop domains. *J Biol Chem.* 284:34257-34271.
17. Bedner, P., C. Steinhauser, and M. Theis. 2012. Functional redundancy and compensation among members of gap junction protein families? *Biochim Biophys Acta* 1818:1971-1984.
18. Oshima, A. 2014. Structure and closure of connexin gap junction channels. *FEBS Let.* 588:1230-1237.

19. Goldberg, G. S., A. P. Moreno, and P. D. Lampe. 2002. Gap junctions between cells expressing connexin 43 or 32 show inverse permselectivity to adenosine and ATP. *J Biol Chem.* 277:36725-36730.
20. Muller, D. J., G. M. Hand, A. Engel, and G. E. Sosinsky. 2002. Conformational changes in surface structures of isolated connexin 26 gap junctions. *EMBO J.* 21:3598-3607.
21. Beblo, D. A., and R. D. Veenstra. 1997. Monovalent cation permeation through the connexin40 gap junction channel. Cs, Rb, K, Na, Li, TEA, TMA, TBA, and effects of anions Br, Cl, F, acetate, aspartate, glutamate, and NO₃. *J Gen Physiol.* 109:509-522.
22. Suchyna, T. M., J. M. Nitsche, M. Chilton, A. L. Harris, R. D. Veenstra, and B. J. Nicholson. 1999. Different ionic selectivities for connexins 26 and 32 produce rectifying gap junction channels. *Biophys J.* 77:2968-2987.
23. Wang, H. Z., and R. D. Veenstra. 1997. Monovalent ion selectivity sequences of the rat connexin43 gap junction channel. *J Gen Physiol.* 109:491-507.
24. Winterhager, E., N. Pielensticker, J. Freyer, A. Ghanem, J. W. Schrickel, J. S. Kim, R. Behr, R. Grummer, K. Maass, S. Urschel, T. Lewalter, K. Tiemann, M. Simoni, and K. Willecke. 2007. Replacement of connexin43 by connexin26 in transgenic mice leads to dysfunctional reproductive organs and slowed ventricular conduction in the heart. *BMC Dev Biol.* 7:26.
25. Zheng-Fischhofer, Q., A. Ghanem, J. S. Kim, M. Kibschull, G. Schwarz, J. O. Schwab, J. Nagy, E. Winterhager, K. Tiemann, and K. Willecke. 2006. Connexin31 cannot functionally replace connexin43 during cardiac morphogenesis in mice. *J Cell Sci.* 119:693-701.
26. Plum, A., G. Hallas, T. Magin, F. Dombrowski, A. Hagendorff, B. Schumacher, C. Wolpert, J. Kim, W. H. Lamers, M. Evert, P. Meda, O. Traub, and K. Willecke. 2000. Unique and shared functions of different connexins in mice. *Curr Biol.* 10:1083-1091.
27. Frank, M., B. Eiberger, U. Janssen-Bienhold, L. P. de Sevilla Muller, A. Tjarks, J. S. Kim, S. Maschke, R. Dobrowolski, P. Sasse, R. Weiler, B. K. Fleischmann, and K. Willecke. 2010. Neuronal connexin-36 can functionally replace connexin-45 in mouse retina but not in the developing heart. *J Cell Sci.* 123:3605-3615.
28. Hille, B. 1978. Ionic channels in excitable membranes. Current problems and biophysical approaches. *Biophys J* 22:283-294.
29. Ek-Vitorin, J. F., G. Calero, G. E. Morley, W. Coombs, S. M. Taffet, and M. Delmar. 1996. PH regulation of connexin43:molecular analysis of the gating particle. *Biophys J.* 71:1273-1284.
30. Peracchia, C. 2004. Chemical gating of gap junction channels; roles of calcium, pH and calmodulin. *Biochim Biophys Acta* 1662:61-80.
31. Gonzalez, D., J. M. Gomez-Hernandez, and L. C. Barrio. 2007. Molecular basis of voltage dependence of connexin channels:an integrative appraisal. *Prog Biophys Mol Biol.* 94:66-106.
32. Hirst-Jensen, B. J., P. Sahoo, F. Kieken, M. Delmar, and P. L. Sorgen. 2007. Characterization of the pH-dependent interaction between the gap junction protein connexin43 carboxyl terminus and cytoplasmic loop domains. *J Biol Chem.* 282:5801-5813.
33. Verselis, V. K., C. S. Ginter, and T. A. Bargiello. 1994. Opposite voltage gating polarities of two closely related connexins. *Nature* 368:348-351.

34. Morley, G. E., D. Vaidya, F. H. Samie, C. Lo, M. Delmar, and J. Jalife. 1999. Characterization of conduction in the ventricles of normal and heterozygous Cx43 knockout mice using optical mapping. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 10:1361-1375.
35. Oyamada, M., Y. Oyamada, and T. Takamatsu. 2005. Regulation of connexin expression. *Biochim Biophys Acta* 1719:6-23.
36. Koffler, L. D., M. J. Fernstrom, T. E. Akiyama, F. J. Gonzalez, and R. J. Ruch. 2002. Positive regulation of connexin32 transcription by hepatocyte nuclear factor-1alpha. *Arch Biochem Biophys.* 407:160-167.
37. Bondurand, N., M. Girard, V. Pingault, N. Lemort, O. Dubourg, and M. Goossens. 2001. Human Connexin 32, a gap junction protein altered in the X-linked form of Charcot-Marie-Tooth disease, is directly regulated by the transcription factor SOX10. *Hum Mol Genet.* 10:2783-2795.
38. Severs, N. J., A. F. Bruce, E. Dupont, and S. Rothery. 2008. Remodelling of gap junctions and connexin expression in diseased myocardium. *Cardiovasc Res.* 80:9-19.
39. Bruneau, B. G., G. Nemer, J. P. Schmitt, F. Charron, L. Robitaille, S. Caron, D. A. Conner, M. Gessler, M. Nemer, C. E. Seidman, and J. G. Seidman. 2001. A murine model of Holt-Oram syndrome defines roles of the T-box transcription factor Tbx5 in cardiogenesis and disease. *Cell* 106:709-721.
40. Linhares, V. L., N. A. Almeida, D. C. Menezes, D. A. Elliott, D. Lai, E. C. Beyer, A. C. Campos de Carvalho, and M. W. Costa. 2004. Transcriptional regulation of the murine Connexin40 promoter by cardiac factors Nkx2-5, GATA4 and Tbx5. *Cardiovasc Res.* 64:402-411.
41. Bierhuizen, M. F., S. C. van Amersfoort, W. A. Groenewegen, S. Vliex, and H. J. Jongsma. 2000. Characterization of the rat connexin40 promoter:two Sp1/Sp3 binding sites contribute to transcriptional activation. *Cardiovasc Res.* 46:511-522.
42. Koibuchi, N., and M. T. Chin. 2007. CHF1/Hey2 plays a pivotal role in left ventricular maturation through suppression of ectopic atrial gene expression. *Circ Res.* 100:850-855.
43. Vinken, M., E. De Rop, E. Decrock, E. De Vuyst, L. Leybaert, T. Vanhaecke, and V. Rogiers. 2009. Epigenetic regulation of gap junctional intercellular communication:more than a way to keep cells quiet? *Biochim Biophys Acta* 1795:53-61.
44. Ogawa, T., T. Hayashi, S. Kyoizumi, T. Ito, J. E. Trosko, and N. Yorioka. 1999. Up-regulation of gap junctional intercellular communication by hexamethylene bisacetamide in cultured human peritoneal mesothelial cells. *Lab Invest.* 79:1511-1520.
45. Vinken, M., T. Henkens, T. Vanhaecke, P. Papeleu, A. Geerts, E. Van Rossen, J. K. Chipman, P. Meda, and V. Rogiers. 2006. Trichostatin a enhances gap junctional intercellular communication in primary cultures of adult rat hepatocytes. *Toxicol Sci.* 91:484-492.
46. Piechocki, M. P., R. D. Burk, and R. J. Ruch. 1999. Regulation of connexin32 and connexin43 gene expression by DNA methylation in rat liver cells. *Carcinogenesis* 20:401-406.
47. Rash, J. E., K. G. Davidson, N. Kamasawa, T. Yasumura, M. Kamasawa, C. Zhang, R. Michaels, D. Restrepo, O. P. Ottersen, C. O. Olson, and J. I. Nagy. 2005. Ultrastructural localization of connexins (Cx36, Cx43, Cx45), glutamate

- receptors and aquaporin-4 in rodent olfactory mucosa, olfactory nerve and olfactory bulb. *J Neurocytol.* 34:307-341.
48. Kim, H. K., Y. S. Lee, U. Sivaprasad, A. Malhotra, and A. Dutta. 2006. Muscle-specific microRNA miR-206 promotes muscle differentiation. *J Cell Biol.* 174:677-687.
 49. Anderson, C., H. Catoe, and R. Werner. 2006. MIR-206 regulates connexin43 expression during skeletal muscle development. *Nucleic Acids Res.* 34:5863-5871.
 50. Inose, H., H. Ochi, A. Kimura, K. Fujita, R. Xu, S. Sato, M. Iwasaki, S. Sunamura, Y. Takeuchi, S. Fukumoto, K. Saito, T. Nakamura, H. Siomi, H. Ito, Y. Arai, K. Shinomiya, and S. Takeda. 2009. A microRNA regulatory mechanism of osteoblast differentiation. *Proc Natl Acad Sci. U S A* 106:20794-20799.
 51. Beardslee, M. A., J. G. Laing, E. C. Beyer, and J. E. Saffitz. 1998. Rapid turnover of connexin43 in the adult rat heart. *Circ Res.* 83:629-635.
 52. John, S. A., and J. P. Revel. 1991. Connexon integrity is maintained by non-covalent bonds:intramolecular disulfide bonds link the extracellular domains in rat connexin-43. *Biochem Biophys Res Commun.* 178:1312-1318.
 53. Musil, L. S., and D. A. Goodenough. 1993. Multisubunit assembly of an integral plasma membrane channel protein, gap junction connexin43, occurs after exit from the ER. *Cell* 74:1065-1077.
 54. Koval, M., J. E. Harley, E. Hick, and T. H. Steinberg. 1997. Connexin46 is retained as monomers in a trans-Golgi compartment of osteoblastic cells. *J Cell Biol.* 137:847-857.
 55. Vanslyke, J. K., C. C. Naus, and L. S. Musil. 2009. Conformational maturation and post-ER multisubunit assembly of gap junction proteins. *Mol Biol Cell* 20:2451-2463.
 56. Lauf, U., B. N. Giepmans, P. Lopez, S. Braconnot, S. C. Chen, and M. M. Falk. 2002. Dynamic trafficking and delivery of connexons to the plasma membrane and accretion to gap junctions in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:10446-10451.
 57. Gaietta, G., T. J. Deerinck, S. R. Adams, J. Bouwer, O. Tour, D. W. Laird, G. E. Sosinsky, R. Y. Tsien, and M. H. Ellisman. 2002. Multicolor and electron microscopic imaging of connexin trafficking. *Science* 296:503-507.
 58. Lampe, P. D., C. D. Cooper, T. J. King, and J. M. Burt. 2006. Analysis of Connexin43 phosphorylated at S325, S328 and S330 in normoxic and ischemic heart. *J Cell Sci.* 119:3435-3442.
 59. Musil, L. S., and D. A. Goodenough. 1991. Biochemical analysis of connexin43 intracellular transport, phosphorylation, and assembly into gap junctional plaques. *J Cell Biol.* 115:1357-1374.
 60. Jordan, K., R. Chodock, A. R. Hand, and D. W. Laird. 2001. The origin of annular junctions:a mechanism of gap junction internalization. *J Cell Sci.* 114:763-773.
 61. Leithe, E., and E. Rivedal. 2004. Epidermal growth factor regulates ubiquitination, internalization and proteasome-dependent degradation of connexin43. *J Cell Sci.* 117:1211-1220.
 62. Leithe, E., and E. Rivedal. 2004. Ubiquitination and down-regulation of gap junction protein connexin-43 in response to 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate treatment. *J Biol Chem.* 279:50089-50096.

63. Fiorini, C., J. Gilleron, D. Carette, A. Valette, A. Tilloy, S. Chevalier, D. Segretain, and G. Pointis. 2008. Accelerated internalization of junctional membrane proteins (connexin 43, N-cadherin and ZO-1) within endocytic vacuoles:an early event of DDT carcinogenicity. *Biochim Biophys Acta* 1778:56-67.
64. Kjenseth, A., T. Fykerud, E. Rivedal, and E. Leithe. 2010. Regulation of gap junction intercellular communication by the ubiquitin system. *Cell Signal.* 22:1267-1273.
65. Gilleron, J., D. Carette, C. Fiorini, J. Dompierre, E. Macia, J. P. Denizot, D. Segretain, and G. Pointis. 2011. The large GTPase dynamin2:a new player in connexin 43 gap junction endocytosis, recycling and degradation. *Int J Biochem Cell Biol.* 43:1208-1217.
66. Boassa, D., J. L. Solan, A. Papas, P. Thornton, P. D. Lampe, and G. E. Sosinsky. 2010. Trafficking and recycling of the connexin43 gap junction protein during mitosis. *Traffic* 11:1471-1486.
67. Axelsen, L. N., K. Calloe, N. H. Holstein-Rathlou, and M. S. Nielsen. 2013. Managing the complexity of communication:regulation of gap junctions by post-translational modification. *Front Pharmacol.* 4:130.
68. Lampe, P. D., and A. F. Lau. 2004. The effects of connexin phosphorylation on gap junctional communication. *Int J Biochem Cell Biol.* 36:1171-1186.
69. Musil, L. S., B. A. Cunningham, G. M. Edelman, and D. A. Goodenough. 1990. Differential phosphorylation of the gap junction protein connexin43 in junctional communication-competent and -deficient cell lines. *J Cell Biol.* 111:2077-2088.
70. Solan, J. L., and P. D. Lampe. 2014. Specific Cx43 phosphorylation events regulate gap junction turnover in vivo. *FEBS Let.* 588:1423-1429.
71. Lin, R., B. J. Warn-Cramer, W. E. Kurata, and A. F. Lau. 2001. v-Src phosphorylation of connexin 43 on Tyr247 and Tyr265 disrupts gap junctional communication. *J Cell Biol.* 154:815-827.
72. Lampe, P. D., E. M. TenBroek, J. M. Burt, W. E. Kurata, R. G. Johnson, and A. F. Lau. 2000. Phosphorylation of connexin43 on serine368 by protein kinase C regulates gap junctional communication. *J Cell Biol.* 149:1503-1512.
73. Beardslee, M. A., D. L. Lerner, P. N. Tadros, J. G. Laing, E. C. Beyer, K. A. Yamada, A. G. Kleber, R. B. Schuessler, and J. E. Saffitz. 2000. Dephosphorylation and intracellular redistribution of ventricular connexin43 during electrical uncoupling induced by ischemia. *Circ Res.* 87:656-662.
74. Bolon, M. L., T. Peng, G. M. Kidder, and K. Timpl. 2008. Lipopolysaccharide plus hypoxia and reoxygenation synergistically reduce electrical coupling between microvascular endothelial cells by dephosphorylating connexin40. *J Cell Physiol.* 217:350-359.
75. Wang, Z., and K. L. Schey. 2009. Phosphorylation and truncation sites of bovine lens connexin 46 and connexin 50. *Exp Eye Res.* 89:898-904.
76. Locke, D., I. V. Koreen, and A. L. Harris. 2006. Isoelectric points and post-translational modifications of connexin26 and connexin32. *FASEB J.* 20:1221-1223.
77. Goodenough, D. A., and D. L. Paul. 2003. Beyond the gap:functions of unpaired connexon channels. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4:285-294.
78. Laird, D. W. 2010. The gap junction proteome and its relationship to disease. *Trends Cell Biol.* 20:92-101.

79. Guthrie, P. B., J. Knappenberger, M. Segal, M. V. Bennett, A. C. Charles, and S. B. Kater. 1999. ATP released from astrocytes mediates glial calcium waves. *J Neurosci.* 19:520-528.
80. Jorgensen, N. R., Z. Henriksen, O. H. Sorensen, E. F. Eriksen, R. Civitelli, and T. H. Steinberg. 2002. Intercellular calcium signaling occurs between human osteoblasts and osteoclasts and requires activation of osteoclast P2X7 receptors. *J Biol Chem.* 277:7574-7580.
81. Plotkin, L. I., and T. Bellido. 2001. Bisphosphonate-induced, hemichannel-mediated, anti-apoptosis through the Src/ERK pathway: a gap junction-independent action of connexin43. *Cell Commun Adhes.* 8:377-382.
82. Plotkin, L. I., S. C. Manolagas, and T. Bellido. 2002. Transduction of cell survival signals by connexin-43 hemichannels. *J Biol Chem.* 277:8648-8657.
83. Dbouk, H. A., R. M. Mroue, M. E. El-Sabban, and R. S. Talhouk. 2009. Connexins: a myriad of functions extending beyond assembly of gap junction channels. *Cell Commun Signal.* 7:4.
84. Laird, D. W. 2006. Life cycle of connexins in health and disease. *Biochem J.* 394:527-543.
85. Laird, D. W. 2014. Syndromic and non-syndromic disease-linked Cx43 mutations. *FEBS Let.* 588:1339-1348.
86. Dobrowolski, R., and K. Willecke. 2009. Connexin-caused genetic diseases and corresponding mouse models. *Antiox Redox Signal.* 11:283-295.
87. Paznekas, W. A., B. Karczeski, S. Vermeer, R. B. Lowry, M. Delatycki, F. Laurence, P. A. Koivisto, L. Van Maldergem, S. A. Boyadjiev, J. N. Bodurtha, and E. W. Jabs. 2009. GJA1 mutations, variants, and connexin 43 dysfunction as it relates to the oculodentodigital dysplasia phenotype. *Hum Mutat.* 30:724-733.
88. Pfenniger, A., A. Wohlwend, and B. R. Kwak. 2011. Mutations in connexin genes and disease. *Eur J Clin Invest.* 41:103-116.
89. Mackay, D., A. Ionides, Z. Kibar, G. Rouleau, V. Berry, A. Moore, A. Shiels, and S. Bhattacharya. 1999. Connexin46 mutations in autosomal dominant congenital cataract. *Am J Hum Genet.* 64:1357-1364.
90. Shiels, A., D. Mackay, A. Ionides, V. Berry, A. Moore, and S. Bhattacharya. 1998. A missense mutation in the human connexin50 gene (GJA8) underlies autosomal dominant "zonular pulverulent" cataract, on chromosome 1q. *Am J Hum Genet.* 62:526-532.
91. Abrams, C. K., M. Freidin, F. Bukauskas, K. Dobrenis, T. A. Bargiello, V. K. Verselis, M. V. Bennett, L. Chen, and Z. Sahenk. 2003. Pathogenesis of X-linked Charcot-Marie-Tooth disease: differential effects of two mutations in connexin 32. *J Neurosci.* 23:10548-10558.
92. Orthmann-Murphy, J. L., A. D. Enriquez, C. K. Abrams, and S. S. Scherer. 2007. Loss-of-function GJA12/Connexin47 mutations cause Pelizaeus-Merzbacher-like disease. *Mol Cell Neurosci* 34:629-641.
93. Martinez, A. D., R. Acuna, V. Figueroa, J. Maripillan, and B. Nicholson. 2009. Gap-junction channels dysfunction in deafness and hearing loss. *Antiox Redox Signal.* 11:309-322.
94. Dasgupta, C., A. M. Martinez, C. W. Zuppan, M. M. Shah, L. L. Bailey, and W. H. Fletcher. 2001. Identification of connexin43 (alpha1) gap junction gene mutations in patients with hypoplastic left heart syndrome by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Mutat Res.* 479:173-186.

95. Dupont, E., T. Matsushita, R. A. Kaba, C. Vozzi, S. R. Coppen, N. Khan, R. Kaprielian, M. H. Yacoub, and N. J. Severs. 2001. Altered connexin expression in human congestive heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* 33:359-371.
96. Gollob, M. H. 2006. Cardiac connexins as candidate genes for idiopathic atrial fibrillation. *Curr Opin Cardiol.* 21:155-158.
97. Garcia-Dorado, D., A. Rodriguez-Sinovas, and M. Ruiz-Meana. 2004. Gap junction-mediated spread of cell injury and death during myocardial ischemia-reperfusion. *Cardiovasc Res.* 61:386-401.
98. Moolten, F. L., and J. M. Wells. 1990. Curability of tumors bearing herpes thymidine kinase genes transferred by retroviral vectors. *J Natl Cancer Inst.* 82:297-300.
99. Mesnil, M., C. Piccoli, G. Tiraby, K. Willecke, and H. Yamasaki. 1996. Bystander killing of cancer cells by herpes simplex virus thymidine kinase gene is mediated by connexins. *Proc Natl Acad Sci. U S A* 93:1831-1835.
100. Kidder, G. M., and B. C. Vanderhyden. 2010. Bidirectional communication between oocytes and follicle cells:ensuring oocyte developmental competence. *Can J Physiol Pharmacol.* 88:399-413.
101. Simon, A. M., D. A. Goodenough, E. Li, and D. L. Paul. 1997. Female infertility in mice lacking connexin 37. *Nature* 385:525-529.
102. MacKenzie, L. W., and R. E. Garfield. 1985. Hormonal control of gap junctions in the myometrium. *Am J Physiol.* 248:C296-308.
103. Hendrix, E. M., L. Myatt, S. Sellers, P. T. Russell, and W. J. Larsen. 1995. Steroid hormone regulation of rat myometrial gap junction formation:effects on cx43 levels and trafficking. *Biol Reprod.* 52:547-560.
104. Miyoshi, H., M. B. Boyle, L. B. MacKay, and R. E. Garfield. 1996. Voltage-clamp studies of gap junctions between uterine muscle cells during term and preterm labor. *Biophys J.* 71:1324-1334.
105. Bissiere, S., M. Zelikowsky, R. Ponnusamy, N. S. Jacobs, H. T. Blair, and M. S. Fanselow. 2011. Electrical synapses control hippocampal contributions to fear learning and memory. *Science* 331:87-91.
106. Becker, D. L., C. Thrasivoulou, and A. R. Phillips. 2012. Connexins in wound healing; perspectives in diabetic patients. *Biochim Biophys Acta* 1818:2068-2075.
107. Djalilian, A. R., D. McGaughey, S. Patel, E. Y. Seo, C. Yang, J. Cheng, M. Tomic, S. Sinha, A. Ishida-Yamamoto, and J. A. Segre. 2006. Connexin 26 regulates epidermal barrier and wound remodeling and promotes psoriasiform response. *J Clin Invest.* 116:1243-1253.
108. Mori, R., K. T. Power, C. M. Wang, P. Martin, and D. L. Becker. 2006. Acute downregulation of connexin43 at wound sites leads to a reduced inflammatory response, enhanced keratinocyte proliferation and wound fibroblast migration. *J Cell Sci.* 119:5193-5203.
109. Coutinho, P., C. Qiu, S. Frank, C. M. Wang, T. Brown, C. R. Green, and D. L. Becker. 2005. Limiting burn extension by transient inhibition of Connexin43 expression at the site of injury. *Br J Plast Surg.* 58:658-667.
110. Cronin, M., P. N. Anderson, J. E. Cook, C. R. Green, and D. L. Becker. 2008. Blocking connexin43 expression reduces inflammation and improves functional recovery after spinal cord injury. *Mol Cell Neurosci.* 39:152-160.
111. Loewenstein, W. R. 1979. Junctional intercellular communication and the control of growth. *Biochim Biophys Acta* 560:1-65.

112. Naus, C. C., K. Elisevich, D. Zhu, D. J. Belliveau, and R. F. Del Maestro. 1992. In vivo growth of C6 glioma cells transfected with connexin43 cDNA. *Cancer Res.* 52:4208-4213.
113. Mehta, P. P., A. Hotz-Wagenblatt, B. Rose, D. Shalloway, and W. R. Loewenstein. 1991. Incorporation of the gene for a cell-cell channel protein into transformed cells leads to normalization of growth. *J Membr Biol.* 124:207-225.
114. Eghbali, B., J. A. Kessler, L. M. Reid, C. Roy, and D. C. Spray. 1991. Involvement of gap junctions in tumorigenesis:transfection of tumor cells with connexin 32 cDNA retards growth in vivo. *Proc Natl Acad Sci. U S A* 88:10701-10705.
115. Trosko, J. E., and R. J. Ruch. 1998. Cell-cell communication in carcinogenesis. *Front Biosci.* 3:d208-236.
116. Yotti, L. P., C. C. Chang, and J. E. Trosko. 1979. Elimination of metabolic cooperation in Chinese hamster cells by a tumor promoter. *Science* 206:1089-1091.
117. Cronier, L., S. Crespin, P. O. Strale, N. Defamie, and M. Mesnil. 2009. Gap junctions and cancer:new functions for an old story. *Antiox Redox Signal.* 11:323-338.
118. Temme, A., A. Buchmann, H. D. Gabriel, E. Nelles, M. Schwarz, and K. Willecke. 1997. High incidence of spontaneous and chemically induced liver tumors in mice deficient for connexin32. *Curr Biol.* 7:713-716.
119. Avanzo, J. L., M. Mesnil, F. J. Hernandez-Blazquez, Mackowiak, II, C. M. Mori, T. C. da Silva, S. C. Oloris, A. P. Garate, S. M. Massironi, H. Yamasaki, and M. L. Dagli. 2004. Increased susceptibility to urethane-induced lung tumors in mice with decreased expression of connexin43. *Carcinogenesis* 25:1973-1982.
120. Zhang, Y. W., I. Morita, M. Ikeda, K. W. Ma, and S. Murota. 2001. Connexin43 suppresses proliferation of osteosarcoma U2OS cells through post-transcriptional regulation of p27. *Oncogene* 20:4138-4149.
121. Koffler, L., S. Roshong, I. Kyu Park, K. Cesen-Cummings, D. C. Thompson, L. D. Dwyer-Nield, P. Rice, C. Mamay, A. M. Malkinson, and R. J. Ruch. 2000. Growth inhibition in G(1) and altered expression of cyclin D1 and p27(kip-1)after forced connexin expression in lung and liver carcinoma cells. *J Cell Biochem.* 79:347-354.
122. Ableser, M. J., S. Penuela, J. Lee, Q. Shao, and D. W. Laird. 2014. Connexin43 reduces melanoma growth within a keratinocyte microenvironment and during tumorigenesis in vivo. *J Biol Chem.* 289:1592-1603.
123. Stelkovics, E., G. Kiszner, N. Meggyeshazi, I. Korom, E. Varga, I. Nemeth, J. Molnar, I. Marczinovits, and T. Krenacs. 2013. Selective in situ protein expression profiles correlate with distinct phenotypes of basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma of the skin. *Histol Histopathol.* 28:941-954.
124. Zhang, Y. W., M. Kaneda, and I. Morita. 2003. The gap junction-independent tumor-suppressing effect of connexin 43. *J Biol Chem.* 278:44852-44856.
125. Zhang, W., C. Nwagwu, D. M. Le, V. W. Yong, H. Song, and W. T. Couldwell. 2003. Increased invasive capacity of connexin43-overexpressing malignant glioma cells. *J Neurosurg.* 99:1039-1046.
126. Stoletov, K., J. Strnadel, E. Zardouzian, M. Momiyama, F. D. Park, J. A. Kelber, D. P. Pizzo, R. Hoffman, S. R. VandenBerg, and R. L. Klemke. 2013. Role of connexins in metastatic breast cancer and melanoma brain colonization. *J Cell Sci.* 126:904-913.

127. Krenacs, L., T. Krenacs, E. Stelkovics, and M. Raffeld. 2010. Heat-induced antigen retrieval for immunohistochemical reactions in routinely processed paraffin sections. *Methods Mol Biol.* 588:103-119.
128. Zhang, J. T., and B. J. Nicholson. 1989. Sequence and tissue distribution of a second protein of hepatic gap junctions, Cx26, as deduced from its cDNA. *J Cell Biol.* 109:3391-3401.
129. Becker, D. L., W. H. Evans, C. R. Green, and A. Warner. 1995. Functional analysis of amino acid sequences in connexin43 involved in intercellular communication through gap junctions. *J Cell Sci.* 108 (Pt 4):1455-1467.
130. Evans, W. H., S. Ahmad, J. Diez, C. H. George, J. M. Kendall, and P. E. Martin. 1999. Trafficking pathways leading to the formation of gap junctions. *Novartis Found Symp.* 219:44-54; discussion 54-49.
131. Milks, L. C., N. M. Kumar, R. Houghten, N. Unwin, and N. B. Gilula. 1988. Topology of the 32-kd liver gap junction protein determined by site-directed antibody localizations. *EMBO J.* 7:2967-2975.
132. Boitano, S., E. R. Dirksen, and W. H. Evans. 1998. Sequence-specific antibodies to connexins block intercellular calcium signaling through gap junctions. *Cell Calcium* 23:1-9.
133. Yeh, H. I., S. Rothery, E. Dupont, S. R. Coppen, and N. J. Severs. 1998. Individual gap junction plaques contain multiple connexins in arterial endothelium. *Circ Res.* 83:1248-1263.
134. Gourdie, R. G., N. J. Severs, C. R. Green, S. Rothery, P. Germroth, and R. P. Thompson. 1993. The spatial distribution and relative abundance of gap-junctional connexin40 and connexin43 correlate to functional properties of components of the cardiac atrioventricular conduction system. *J Cell Sci.* 105 (Pt 4):985-991.
135. Krenacs, T., and M. Rosendaal. 1998. Connexin43 gap junctions in normal, regenerating, and cultured mouse bone marrow and in human leukemias: their possible involvement in blood formation. *Am J Pathol.* 152:993-1004.
136. Coppen, S. R., R. G. Gourdie, and N. J. Severs. 2001. Connexin45 is the first connexin to be expressed in the central conduction system of the mouse heart. *Exp Clin Cardiol* 6:17-23.
137. Krenacs, T., L. Krenacs, and M. Raffeld. 2010. Multiple antigen immunostaining procedures. *Methods Mol Biol.* 588:281-300.
138. Rosendaal, M., C. R. Green, A. Rahman, and D. Morgan. 1994. Up-regulation of the connexin43+ gap junction network in haemopoietic tissue before the growth of stem cells. *J Cell Sci.* 107 (Pt 1):29-37.
139. Hirokawa, N., and J. Heuser. 1982. The inside and outside of gap-junction membranes visualized by deep etching. *Cell* 30:395-406.
140. Chomczynski, P., and N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162:156-159.
141. Beyer, E. C., D. L. Paul, and D. A. Goodenough. 1987. Connexin43: a protein from rat heart homologous to a gap junction protein from liver. *J Cell Biol.* 105:2621-2629.
142. Stewart, W. W. 1978. Functional connections between cells as revealed by dye-coupling with a highly fluorescent naphthalimide tracer. *Cell* 14:741-759.
143. Lee, S., N. B. Gilula, and A. E. Warner. 1987. Gap junctional communication and compaction during preimplantation stages of mouse development. *Cell* 51:851-860.

144. Delves, P. J., and I. M. Roitt. 2000. The immune system. First of two parts. *N Engl J Med.* 343:37-49.
145. Ema, H., and H. Nakauchi. 2000. Expansion of hematopoietic stem cells in the developing liver of a mouse embryo. *Blood* 95:2284-2288.
146. Metcalf, D. 1989. The molecular control of cell division, differentiation commitment and maturation in haemopoietic cells. *Nature* 339:27-30.
147. Arai, K. I., F. Lee, A. Miyajima, S. Miyatake, N. Arai, and T. Yokota. 1990. Cytokines:coordinators of immune and inflammatory responses. *Annu Rev Biochem.* 59:783-836.
148. Gordon, M. Y., G. P. Riley, S. M. Watt, and M. F. Greaves. 1987. Compartmentalization of a haematopoietic growth factor (GM-CSF) by glycosaminoglycans in the bone marrow microenvironment. *Nature* 326:403-405.
149. Kittler, E. L., H. McGrath, D. Temeles, R. B. Crittenden, V. K. Kister, and P. J. Quesenberry. 1992. Biologic significance of constitutive and subliminal growth factor production by bone marrow stroma. *Blood* 79:3168-3178.
150. Loewenstein, W. R. 1987. The cell-to-cell channel of gap junctions. *Cell* 48:725-726.
151. Rosendaal, M., and T. T. Krenacs. 2000. Regulatory pathways in blood-forming tissue with particular reference to gap junctional communication. *Pathol Oncol Res.* 6:243-249.
152. Rosendaal, M., A. Grogan, and C. R. Green. 1991. Direct cell-cell communication in the blood-forming system. *Tissue Cell* 23:457-470.
153. Rosendaal, M., A. Mayen, A. de Koning, T. Dunina-Barkovskaya, T. Krenacs, and R. Ploemacher. 1997. Does transmembrane communication through gap junctions enable stem cells to overcome stromal inhibition? *Leukemia* 11:1281-1289.
154. Dorshkind, K., L. Green, A. Godwin, and W. H. Fletcher. 1993. Connexin-43-type gap junctions mediate communication between bone marrow stromal cells. *Blood* 82:38-45.
155. Steinberg, T. H. 1998. Gap junction function:the messenger and the message. *Am J Pathol.* 152:851-854.
156. Hulser, D. F., and J. H. Peters. 1972. Contact cooperation in stimulated lymphocytes. II. Electrophysiological investigations on intercellular communication. *Exp Cell Res.* 74:319-326.
157. Kapsenberg, M. L., and W. Leene. 1979. Formation of B type gap junctions between PHA-stimulated rabbit lymphocytes. *Exp Cell Res.* 120:211-222.
158. Levy, J. A., R. M. Weiss, E. R. Dirksen, and M. R. Rosen. 1976. Possible communication between murine macrophages oriented in linear chains in tissue culture. *Exp Cell Res.* 103:375-385.
159. Neumark, T., and D. C. Huynh. 1989. Gap junctions between human T-colony cells. *Acta Morphol Hung.* 37:147-153.
160. Porvaznik, M., and T. J. MacVittie. 1979. Detection of gap junctions between the progeny of a canine macrophage colony-forming cell in vitro. *J Cell Biol.* 82:555-564.
161. Campbell, F. R. 1980. Gap junctions between cells of bone marrow:an ultrastructural study using tannic acid. *Anat Rec.* 196:101-107.
162. Watanabe, Y. 1985. Fine structure of bone marrow stroma. *Nihon Ketsueki Gakkai Zasshi* 48:1688-1700.

163. Yamazaki, K. 1988. Sl/Sld mice have an increased number of gap junctions in their bone marrow stromal cells. *Blood Cells* 13:421-435.
164. Bagdi, E., L. Krenacs, T. Krenacs, K. Miller, and P. G. Isaacson. 2001. Follicular dendritic cells in reactive and neoplastic lymphoid tissues: a reevaluation of staining patterns of CD21, CD23, and CD35 antibodies in paraffin sections after wet heat-induced epitope retrieval. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 9:117-124.
165. Green, C. R., N. S. Peters, R. G. Gourdie, S. Rothery, and N. J. Severs. 1993. Validation of immunohistochemical quantification in confocal scanning laser microscopy: a comparative assessment of gap junction size with confocal and ultrastructural techniques. *J Histochem Cytochem.* 41:1339-1349.
166. Krenacs, T., and M. Rosendaal. 1995. Immunohistological detection of gap junctions in human lymphoid tissue: connexin43 in follicular dendritic and lymphoendothelial cells. *J Histochem Cytochem.* 43:1125-1137.
167. Krenacs, T., E. Bagdi, E. Stelkovics, L. Bereczki, and L. Krenacs. 2005. How we process trephine biopsy specimens: epoxy resin embedded bone marrow biopsies. *J Clin Pathol.* 58: 897-903.
168. Alves, L. A., A. C. Campos de Carvalho, E. O. Cirne Lima, C. M. Rocha e Souza, M. Dardenne, D. C. Spray, and W. Savino. 1995. Functional gap junctions in thymic epithelial cells are formed by connexin 43. *Eur J Immunol.* 25:431-437.
169. Krenacs, T., and M. Rosendaal. 1998. Gap-junction communication pathways in germinal center reactions. *Devel Immunol.* 6:111-118.
170. Krenacs, T., M. van Dartel, E. Lindhout, and M. Rosendaal. 1997. Direct cell/cell communication in the lymphoid germinal center: connexin43 gap junctions functionally couple follicular dendritic cells to each other and to B lymphocytes. *Eur J Immunol.* 27:1489-1497.
171. Warner, A. 1992. Gap junctions in development--a perspective. *Seminars in Cell Biology* 3:81-91.
172. Krenacs T, Z. I., Kiszner G, Rosendaal M. 2013. Gap junctions and connexins in the hematopoietic-immune system: structural considerations. In: *Connexin communication channels: Roles on the immune system and immunopathology*. Evans. H. W., Kwak. B. R. & Oviedo-Orta E., ed. CRC Press, Boca Raton, FL pp15-36.
173. Hurtado, S. P., A. Balduino, E. C. Bodi, M. C. El-Cheikh, A. C. Campos de Carvalho, and R. Borojevic. 2004. Connexin expression and gap-junction-mediated cell interactions in an in vitro model of haemopoietic stroma. *Cell Tissue Res.* 316:65-76.
174. Cancelas, J. A., W. L. Koevoet, A. E. de Koning, A. E. Mayen, E. J. Rombouts, and R. E. Ploemacher. 2000. Connexin-43 gap junctions are involved in multiconnexin-expressing stromal support of hemopoietic progenitors and stem cells. *Blood* 96:498-505.
175. Civitelli, R., E. C. Beyer, P. M. Warlow, A. J. Robertson, S. T. Geist, and T. H. Steinberg. 1993. Connexin43 mediates direct intercellular communication in human osteoblastic cell networks. *J Clin Invest.* 91:1888-1896.
176. Beresford, J. N. 1989. Osteogenic stem cells and the stromal system of bone and marrow. *Clin Orthop Rel Res.* 240:270-280.
177. Jones, S. J., C. Gray, H. Sakamaki, M. Arora, A. Boyde, R. Gourdie, and C. Green. 1993. The incidence and size of gap junctions between the bone cells in rat calvaria. *Anat Embryol. (Berl)* 187:343-352.

178. Civitelli, R. 2008. Cell-cell communication in the osteoblast/osteocyte lineage. *Arch Biochem Biophys.* 473:188-192.
179. Plotkin, L. I., and T. Bellido. 2013. Beyond gap junctions:Connexin43 and bone cell signaling. *Bone* 52:157-166.
180. Tavassoli, M., and W. H. Crosby. 1970. Bone marrow histogenesis:a comparison of fatty and red marrow. *Science* 169:291-293.
181. Rosendaal, M. 1995. Gap junctions in blood forming tissues. *Microsc Res Tech.* 31:396-407.
182. Ploemacher, R. E., A. E. Mayen, A. E. De Koning, T. Krenacs, and M. Rosendaal. 2000. Hematopoiesis:Gap Junction Intercellular Communication is Likely to be Involved in Regulation of Stroma-dependent Proliferation of Hemopoietic Stem Cells. *Hematology (Amst.)* 5:133-147.
183. Bodi, E., S. P. Hurtado, M. A. Carvalho, R. Borojevic, and A. C. Carvalho. 2004. Gap junctions in hematopoietic stroma control proliferation and differentiation of blood cell precursors. *An Acad Bras Cienc.* 76:743-756.
184. Bedekovics, J., A. Kiss, L. Beke, K. Karolyi, and G. Mehes. 2013. Platelet derived growth factor receptor-beta (PDGFRbeta) expression is limited to activated stromal cells in the bone marrow and shows a strong correlation with the grade of myelofibrosis. *Virchows Arch.* 463:57-65.
185. Martyre, M. C. 1995. TGF-beta and megakaryocytes in the pathogenesis of myelofibrosis in myeloproliferative disorders. *Leuk Lymph.* 20:39-44.
186. Butch, A. W., G. H. Chung, J. W. Hoffmann, and M. H. Nahm. 1993. Cytokine expression by germinal center cells. *J Immunol.* 150:39-47.
187. Clark, E. A., and J. A. Ledbetter. 1994. How B and T cells talk to each other. *Nature* 367:425-428.
188. van den Berg, T. K., M. van der Ende, E. A. Dopp, G. Kraal, and C. D. Dijkstra. 1993. Localization of beta 1 integrins and their extracellular ligands in human lymphoid tissues. *Am J Pathol.* 143:1098-1110.
189. Bruzzone, R., T. W. White, and D. A. Goodenough. 1996. The cellular Internet:on-line with connexins. *Bioessays* 18:709-718.
190. Rajnai, H., I. Teleki, G. Kiszner, N. Meggyeshazi, P. Balla, T. Vancsik, G. Muzes, J. Csomor, A. Matolcsy, and T. Krenacs. 2015. Connexin 43 communication channels in follicular dendritic cell development and in follicular lymphomas. *J Immunol Res.* 2015:528098.
191. Cyster, J. G., K. M. Ansel, K. Reif, E. H. Ekland, P. L. Hyman, H. L. Tang, S. A. Luther, and V. N. Ngo. 2000. Follicular stromal cells and lymphocyte homing to follicles. *Immunol Reviews* 176:181-193.
192. Hase, H., Y. Kanno, M. Kojima, K. Hasegawa, D. Sakurai, H. Kojima, N. Tsuchiya, K. Tokunaga, N. Masawa, M. Azuma, K. Okumura, and T. Kobata. 2004. BAFF/BLyS can potentiate B-cell selection with the B-cell coreceptor complex. *Blood.* 103:2257-2265.
193. Heesters, B. A., R. C. Myers, and M. C. Carroll. 2014. Follicular dendritic cells:dynamic antigen libraries. *Nat Rev Immunol.* 14:495-504.
194. Jego, G., R. Bataille, and C. Pellat-Deceunynck. 2001. Interleukin-6 is a growth factor for nonmalignant human plasmablasts. *Blood.* 97:1817-1822.
195. Park, C. S., S. O. Yoon, R. J. Armitage, and Y. S. Choi. 2004. Follicular dendritic cells produce IL-15 that enhances germinal center B cell proliferation in membrane-bound form. *J Immunol.* 173:6676-6683.
196. Batista, F. D., and N. E. Harwood. 2009. The who, how and where of antigen presentation to B cells. *Nat Rev Immunol.* 9:15-27. doi:10.1038/nri2454.

197. Harris, N. L., S. H. Swerdlow, E. S. Jaffe, G. Ott, N. B. Nathwani, D. De Jong, T. Yoshino, and D. Spagnolo. 2008. Follicular Lymphoma. In *WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. S. H. Swerdlow, E. Campo, N. L. Harris, E. S. Jaffe, S. A. Pileri, H. Stein, J. Thiele, and J. w. Vardiman, eds. International Agency for Research on Cancer (IARC), Lyon. 220-226.
198. Parkin, D. M., F. Bray, J. Ferlay, and P. Pisani. 2005. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*. 55:74-108.
199. Klein, U., and R. Dalla-Favera. 2008. Germinal centres:role in B-cell physiology and malignancy. *Nature Reviews. Immunol*. 8:22-33.
200. Shaffer, A. L., A. Rosenwald, and L. M. Staudt. 2002. Lymphoid malignancies:the dark side of B-cell differentiation. *Nat Rev Immunol*. 2:920-932.
201. Federico, M., M. Bellei, L. Marcheselli, S. Luminari, A. Lopez-Guillermo, U. Vitolo, B. Pro, S. Pileri, A. Pulsoni, P. Soubeyran, S. Cortelazzo, G. Martinelli, M. Martelli, L. Rigacci, L. Arcaini, F. Di Raimondo, F. Merli, E. Sabattini, P. McLaughlin, and P. Solal-Celigny. 2009. Follicular lymphoma international prognostic index 2:a new prognostic index for follicular lymphoma developed by the international follicular lymphoma prognostic factor project. *J Clin Oncol*. 27:4555-4562.
202. Labouyrie, E., P. Dubus, A. Groppi, F. X. Mahon, J. Ferrer, M. Parrens, J. Reiffers, A. de Mascarel, and J. P. Merlio. 1999. Expression of neurotrophins and their receptors in human bone marrow. *Am J Pathol*. 154:405-415.
203. Thompson, S. J., G. C. Schattelman, A. M. Gown, and M. Bothwell. 1989. A monoclonal antibody against nerve growth factor receptor. Immunohistochemical analysis of normal and neoplastic human tissue. *Am J Clin Pathol*. 92:415-423.
204. Lee, C. G., B. Das, T. L. Lin, C. Grimes, X. Zhang, T. Lavezzi, L. Huang, J. Cole, L. Yau, and L. Li. 2012. A rare fraction of drug-resistant follicular lymphoma cancer stem cells interacts with follicular dendritic cells to maintain tumorigenic potential. *Brit J Haematol*. 158:79-90.
205. Lwin, T., J. Lin, Y. S. Choi, X. Zhang, L. C. Moscinski, K. L. Wright, E. M. Sotomayor, W. S. Dalton, and J. Tao. 2010. Follicular dendritic cell-dependent drug resistance of non-Hodgkin lymphoma involves cell adhesion-mediated Bim down-regulation through induction of microRNA-181a. *Blood* 116:5228-5236.
206. Mraz, M., C. S. Zent, A. K. Church, D. F. Jelinek, X. Wu, S. Pospisilova, S. M. Ansell, A. J. Novak, N. E. Kay, T. E. Witzig, and G. S. Nowakowski. 2011. Bone marrow stromal cells protect lymphoma B-cells from rituximab-induced apoptosis and targeting integrin alpha-4-beta-1 (VLA-4) with natalizumab can overcome this resistance. *Br J Haematol*. 155:53-64.
207. Yagi, K., K. Yamamoto, S. Umeda, S. Abe, S. Suzuki, I. Onishi, S. Kirimura, M. Fukayama, A. Arai, M. Kitagawa, and M. Kurata. 2013. Expression of multidrug resistance 1 gene in B-cell lymphomas:association with follicular dendritic cells. *Histopathol*. 62:414-420.
208. Lindhout, E., M. L. Mevissen, J. Kwekkeboom, J. M. Tager, and C. de Groot. 1993. Direct evidence that human follicular dendritic cells (FDC) rescue germinal centre B cells from death by apoptosis. *Clin Exp Immunol*. 91:330-336.
209. MacLennan, I. C. 1994. Germinal centers. *Annu Rev Immunol*. 12:117-139.
210. Thorbecke, G. J., A. R. Amin, and V. K. Tsiagbe. 1994. Biology of germinal centers in lymphoid tissue. *FASEB J*. 8:832-840.

211. Koopman, G., R. M. Keehnen, E. Lindhout, W. Newman, Y. Shimizu, G. A. van Seventer, C. de Groot, and S. T. Pals. 1994. Adhesion through the LFA-1 (CD11a/CD18)-ICAM-1 (CD54) and the VLA-4 (CD49d)-VCAM-1 (CD106) pathways prevents apoptosis of germinal center B cells. *J Immunol.* 152:3760-3767.
212. Szakal, A. K., M. H. Kosco, and J. G. Tew. 1989. Microanatomy of lymphoid tissue during humoral immune responses: structure function relationships. *Annu Rev Immunol.* 7:91-109.
213. Jacobson, E. B., L. H. Caporale, and G. J. Thorbecke. 1974. Effect of thymus cell injections on germinal center formation in lymphoid tissues of nude (thymusless) mice. *Cell Immunol.* 13:416-430.
214. Lecanda, F., D. A. Towler, K. Ziambaras, S. L. Cheng, M. Koval, T. H. Steinberg, and R. Civitelli. 1998. Gap junctional communication modulates gene expression in osteoblastic cells. *Mol Biol Cell.* 9:2249-2258.
215. Tanmahasamut, P., and N. Sidell. 2005. Up-regulation of gap junctional intercellular communication and connexin43 expression by retinoic acid in human endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 90:4151-4156. Epub 2005 Apr 4155.
216. van de Pavert, S. A., B. J. Olivier, G. Goverse, M. F. Vondenhoff, M. Greuter, P. Beke, K. Kusser, U. E. Hopken, M. Lipp, K. Niederreither, R. Blomhoff, K. Sitnik, W. W. Agace, T. D. Randall, W. J. de Jonge, and R. E. Mebius. 2009. Chemokine CXCL13 is essential for lymph node initiation and is induced by retinoic acid and neuronal stimulation. *Nat Immunol.* 10:1193-1199. doi:1110.1038/ni.1789. Epub 2009 Sep 1127.
217. Watanabe, J., K. Nomata, M. Noguchi, H. Satoh, S. Kanda, H. Kanetake, and Y. Saito. 1999. All-trans retinoic acid enhances gap junctional intercellular communication among renal epithelial cells in vitro treated with renal carcinogens. *Eur J Cancer.* 35:1003-1008.
218. Jongen, W. M., D. J. Fitzgerald, M. Asamoto, C. Piccoli, T. J. Slaga, D. Gros, M. Takeichi, and H. Yamasaki. 1991. Regulation of connexin 43-mediated gap junctional intercellular communication by Ca²⁺ in mouse epidermal cells is controlled by E-cadherin. *J Cell Biol.* 114:545-555.
219. MacLennan, I. C., and D. Gray. 1986. Antigen-driven selection of virgin and memory B cells. *Immunol Rev.* 91:61-85.
220. Lindhout, E., A. Lakeman, and C. de Groot. 1995. Follicular dendritic cells inhibit apoptosis in human B lymphocytes by a rapid and irreversible blockade of preexisting endonuclease. *J Exp Med.* 181:1985-1995.
221. Liu, Y. J., D. E. Joshua, G. T. Williams, C. A. Smith, J. Gordon, and I. C. MacLennan. 1989. Mechanism of antigen-driven selection in germinal centres. *Nature* 342:929-931.
222. Laird, D. W., K. L. Puranam, and J. P. Revel. 1991. Turnover and phosphorylation dynamics of connexin43 gap junction protein in cultured cardiac myocytes. *Biochem J.* 273(Pt 1):67-72.
223. Victora, G. D., D. Dominguez-Sola, A. B. Holmes, S. Deroubaix, R. Dalla-Favera, and M. C. Nussenzweig. 2012. Identification of human germinal center light and dark zone cells and their relationship to human B-cell lymphomas. *Blood* 120:2240-2248.
224. Muraguchi, A., J. H. Kehrl, D. L. Longo, D. J. Volkman, K. A. Smith, and A. S. Fauci. 1985. Interleukin 2 receptors on human B cells. Implications for the role of interleukin 2 in human B cell function. *J Exp Med.* 161:181-197.

225. Defrance, T., B. Vanbervliet, J. Pene, and J. Banchereau. 1988. Human recombinant IL-4 induces activated B lymphocytes to produce IgG and IgM. *J Immunol.* 141:2000-2005.
226. Rabinowitz, J. L., V. K. Tsiagbe, M. H. Nicknam, and G. J. Thorbecke. 1990. Germinal center cells are a major IL-5-responsive B cell population in peripheral lymph nodes engaged in the immune response. *J Immunol.* 145:2440-2447.
227. Muraguchi, A., T. Hirano, B. Tang, T. Matsuda, Y. Horii, K. Nakajima, and T. Kishimoto. 1988. The essential role of B cell stimulatory factor 2 (BSF-2/IL-6) for the terminal differentiation of B cells. *J Exp Med.* 167:332-344.
228. Rousset, F., E. Garcia, T. Defrance, C. Peronne, N. Vezzio, D. H. Hsu, R. Kastelein, K. W. Moore, and J. Banchereau. 1992. Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci. U S A* 89:1890-1893.
229. Snapper, C. M., C. Peschel, and W. E. Paul. 1988. IFN-gamma stimulates IgG2a secretion by murine B cells stimulated with bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol.* 140:2121-2127.
230. Coffman, R. L., D. A. Lebman, and B. Shrader. 1989. Transforming growth factor beta specifically enhances IgA production by lipopolysaccharide-stimulated murine B lymphocytes. *J Exp Med.* 170:1039-1044.
231. Kim, H. S., X. Zhang, and Y. S. Choi. 1994. Activation and proliferation of follicular dendritic cell-like cells by activated T lymphocytes. *J Immunol.* 153:2951-2961.
232. Allen, C. D., and J. G. Cyster. 2008. Follicular dendritic cell networks of primary follicles and germinal centers: phenotype and function. *Semin Immunol.* 20:14-25. doi:10.1016/j.smim.2007.1012.1001. Epub 2008 Feb 1017.
233. Estes, J. D., T. C. Thacker, D. L. Hampton, S. A. Kell, B. F. Keele, E. A. Palenske, K. M. Druey, and G. F. Burton. 2004. Follicular dendritic cell regulation of CXCR4-mediated germinal center CD4 T cell migration. *J Immunol.* 173:6169-6178.
234. Park, C. S., and Y. S. Choi. 2005. How do follicular dendritic cells interact intimately with B cells in the germinal centre? *Immunol.* 114:2-10.
235. Schmitt, N., and H. Ueno. 2015. Regulation of human helper T cell subset differentiation by cytokines. *Curr Opin Immunol.* 34:130-136.
236. Mehta, P. P., B. L. Lokeshwar, P. C. Schiller, M. V. Bendix, R. C. Ostenson, G. A. Howard, and B. A. Roos. 1996. Gap-junctional communication in normal and neoplastic prostate epithelial cells and its regulation by cAMP. *Mol Carcinog.* 15:18-32.
237. Knox, K. A., G. D. Johnson, and J. Gordon. 1993. Distribution of cAMP in secondary follicles and its expression in B cell apoptosis and CD40-mediated survival. *Int immunol.* 5:1085-1091.
238. Simon, A. M., and D. A. Goodenough. 1998. Diverse functions of vertebrate gap junctions. *Trends Cell Biol.* 8:477-483.
239. Newell, M. K., J. VanderWall, K. S. Beard, and J. H. Freed. 1993. Ligation of major histocompatibility complex class II molecules mediates apoptotic cell death in resting B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci. U S A* 90:10459-10463.
240. Heinen, E., and A. Bosseloir. 1994. Follicular dendritic cells: whose children? *Immunol Today* 15:201-204.
241. Loewenstein, W. R., and B. Rose. 1992. The cell-cell channel in the control of growth. *Sem Cell Biol.* 3:59-79.

242. Evans, W. H., G. Bultynck, and L. Leybaert. 2012. Manipulating connexin communication channels: use of peptidomimetics and the translational outputs. *J Membr Biol.* 245:437-449.
243. Petrasch, S., M. Kosco, J. Schmitz, H. H. Wacker, and G. Brittinger. 1992. Follicular dendritic cells in non-Hodgkin-lymphoma express adhesion molecules complementary to ligands on neoplastic B-cells. *Brit J Heamatol.* 82:695-700.
244. Umetsu, D. T., L. Esserman, T. A. Donlon, R. H. DeKruyff, and R. Levy. 1990. Induction of proliferation of human follicular (B type) lymphoma cells by cognate interaction with CD4+ T cell clones. *J Immunol.* 144:2550-2557.
245. Oviedo-Orta, E., P. Gasque, and W. H. Evans. 2001. Immunoglobulin and cytokine expression in mixed lymphocyte cultures is reduced by disruption of gap junction intercellular communication. *FASEB J.* 15:768-774.
246. Machtaler, S., K. Choi, M. Dang-Lawson, L. Falk, F. Pournia, C. C. Naus, and L. Matsuuchi. 2014. The role of the gap junction protein connexin43 in B lymphocyte motility and migration. *FEBS Let.* 588:1249-1258.
247. Machtaler, S., M. Dang-Lawson, K. Choi, C. Jang, C. C. Naus, and L. Matsuuchi. 2011. The gap junction protein Cx43 regulates B-lymphocyte spreading and adhesion. *J Cell Sci.* 124:2611-2621. doi:2610.1242/jcs.089532. Epub 082011 Jul 089512.
248. Kuczma, M., J. R. Lee, and P. Kraj. 2011. Connexin 43 signaling enhances the generation of Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol.* 187:248-257.
249. Montecino-Rodriguez, E., H. Leathers, and K. Dorshkind. 2000. Expression of connexin 43 (Cx43) is critical for normal hematopoiesis. *Blood* 96:917-924.
250. Oviedo-Orta, E., M. Perreau, W. H. Evans, and I. Potoicchio. 2010. Control of the proliferation of activated CD4+ T cells by connexins. *J. Leuk Biol.* 88:79-86.
251. Neijssen, J., C. Herberts, J. W. Drijfhout, E. Reits, L. Janssen, and J. Neefjes. 2005. Cross-presentation by intercellular peptide transfer through gap junctions. *Nature* 434:83-88.
252. Pang, B., J. Neijssen, X. Qiao, L. Janssen, H. Janssen, C. Lippuner, and J. Neefjes. 2009. Direct antigen presentation and gap junction mediated cross-presentation during apoptosis. *J Immunol.* 183:1083-1090.
253. Ratkay-Traub, I., B. Hopp, Z. Bor, L. Dux, D. L. Becker, and T. Krenacs. 2001. Regeneration of rabbit cornea following excimer laser photorefractive keratectomy: a study on gap junctions, epithelial junctions and epidermal growth factor receptor expression in correlation with cell proliferation. *Exp Eye Res.* 73:291-302.
254. Gorbe, A., D. L. Becker, L. Dux, L. Krenacs, and T. Krenacs. 2006. In differentiating prefusion myoblasts connexin43 gap junction coupling is upregulated before myoblast alignment then reduced in post-mitotic cells. *Histochem Cell Biol.* 125:705-716.
255. Gorbe, A., D. L. Becker, L. Dux, E. Stelkovics, L. Krenacs, E. Bagdi, and T. Krenacs. 2005. Transient upregulation of connexin43 gap junctions and synchronized cell cycle control precede myoblast fusion in regenerating skeletal muscle in vivo. *Histochem Cell Biol.* 123:573-583.
256. Gorbe, A., T. Krenacs, J. E. Cook, and D. L. Becker. 2007. Myoblast proliferation and syncytial fusion both depend on connexin43 function in transfected skeletal muscle primary cultures. *Exp Cell Res.* 313:1135-1148.
257. Gipson, I. K., S. Spurr-Michaud, A. Tisdale, J. Elwell, and M. A. Stepp. 1993. Redistribution of the hemidesmosome components alpha 6 beta 4 integrin and

- bullous pemphigoid antigens during epithelial wound healing. *Exp Cell Res.* 207:86-98.
258. Schultz, G., N. Chegini, M. Grant, P. Khaw, and S. MacKay. 1992. Effects of growth factors on corneal wound healing. *Acta Ophthalmol Suppl.* 202:60-66.
 259. Wilson, S. E., G. S. Schultz, N. Chegini, J. Weng, and Y. G. He. 1994. Epidermal growth factor, transforming growth factor alpha, transforming growth factor beta, acidic fibroblast growth factor, basic fibroblast growth factor, and interleukin-1 proteins in the cornea. *Exp Eye Res.* 59:63-71.
 260. Hanna, C. 1966. Proliferation and migration of epithelial cells during corneal wound repair in the rabbit and the rat. *Am J Ophthalmol.* 61:55-63.
 261. Chung, E. H., A. E. Hutcheon, N. C. Joyce, and J. D. Zieske. 1999. Synchronization of the G1/S transition in response to corneal debridement. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 40:1952-1958.
 262. Takeuchi, S. 1987. The rearrangement of cytoskeletal systems in epithelial cells accompanying the transition from a stationary to a motile state at the start of epithelial spreading. *J Cell Sci.* 88 (Pt 1):109-119.
 263. Shi, Y., M. Tabesh, and S. P. Sugrue. 2000. Role of cell adhesion-associated protein, pinin (DRS/memA), in corneal epithelial migration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 41:1337-1345.
 264. Dong, Y., M. Roos, T. Gruijters, P. Donaldson, S. Bullivant, E. Beyer, and J. Kistler. 1994. Differential expression of two gap junction proteins in corneal epithelium. *Eur J Cell Biol.* 64:95-100.
 265. Matic, M., I. N. Petrov, T. Rosenfeld, and J. M. Wolosin. 1997. Alterations in connexin expression and cell communication in healing corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 38:600-609.
 266. Petridou, S., and S. K. Masur. 1996. Immunodetection of connexins and cadherins in corneal fibroblasts and myofibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37:1740-1748.
 267. Suzuki, K., T. Tanaka, M. Enoki, and T. Nishida. 2000. Coordinated reassembly of the basement membrane and junctional proteins during corneal epithelial wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 41:2495-2500.
 268. Watsky, M. A. 1995. Keratocyte gap junctional communication in normal and wounded rabbit corneas and human corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 36:2568-2576.
 269. Risek, B., A. Pozzi, and N. B. Gilula. 1998. Modulation of gap junction expression during transient hyperplasia of rat epidermis. *J Cell Sci.* 111 (Pt 10):1395-1404.
 270. Mohay, J., and B. J. McLaughlin. 1995. Corneal endothelial wound repair in normal and mitotically inhibited cultures. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 233:727-736.
 271. White, T. W., R. Bruzzone, S. Wolfram, D. L. Paul, and D. A. Goodenough. 1994. Selective interactions among the multiple connexin proteins expressed in the vertebrate lens:the second extracellular domain is a determinant of compatibility between connexins. *J Cell Biol.* 125:879-892.
 272. Williams, K. K., and M. A. Watsky. 1997. Dye spread through gap junctions in the corneal epithelium of the rabbit. *Curr Eye Res.* 16:445-452.
 273. Nodder, S., and P. Martin. 1997. Wound healing in embryos:a review. *Anat Embryol. (Berl)* 195:215-228.

274. Gibson, D. F., D. D. Bikle, J. Harris, and G. S. Goldberg. 1997. The expression of the gap junctional protein Cx43 is restricted to proliferating and non differentiated normal and transformed keratinocytes. *Exp Dermatol.* 6:167-174.
275. Goliger, J. A., and D. L. Paul. 1995. Wounding alters epidermal connexin expression and gap junction-mediated intercellular communication. *Mol Biol Cell* 6:1491-1501.
276. Haaskjold, E., H. Refsum, S. B. Refsum, and R. Bjerknes. 1992. Cell kinetics of the rat corneal epithelium. *APMIS* 100:1123-1128.
277. Sandvig, K. U., and E. Haaskjold. 1993. The proliferative response during regeneration of a ringshaped defect in the corneal epithelium. *Acta Ophthalmol. (Copenh)* 71:39-43.
278. Zieske, J. D. 2000. Expression of cyclin-dependent kinase inhibitors during corneal wound repair. *Prog Retin Eye Res.* 19:257-270.
279. Kitazawa, T., S. Kinoshita, K. Fujita, K. Araki, H. Watanabe, Y. Ohashi, and R. Manabe. 1990. The mechanism of accelerated corneal epithelial healing by human epidermal growth factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 31:1773-1778.
280. Petroll, W. M., J. V. Jester, J. Bean, and H. D. Cavanagh. 1999. Labeling of cycling corneal endothelial cells during healing with a monoclonal antibody to the Ki67 antigen (MIB-1). *Cornea* 18:98-108.
281. McCormick, D., C. Yu, C. Hobbs, and P. A. Hall. 1993. The relevance of antibody concentration to the immunohistological quantification of cell proliferation-associated antigens. *Histopathol.* 22:543-547.
282. Scott, R. J., P. A. Hall, J. S. Haldane, S. van Noorden, Y. Price, D. P. Lane, and N. A. Wright. 1991. A comparison of immunohistochemical markers of cell proliferation with experimentally determined growth fraction. *J Pathol.* 165:173-178.
283. Wilson, S. E., L. Chen, R. R. Mohan, Q. Liang, and J. Liu. 1999. Expression of HGF, KGF, EGF and receptor messenger RNAs following corneal epithelial wounding. *Exp Eye Res.* 68:377-397.
284. Zieske, J. D., H. Takahashi, A. E. Hutcheon, and A. C. Dalbone. 2000. Activation of epidermal growth factor receptor during corneal epithelial migration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 41:1346-1355.
285. Beuerman, R. W., and H. W. Thompson. 1992. Molecular and cellular responses of the corneal epithelium to wound healing. *Acta Ophthalmol Suppl.* 202:7-12.
286. Willecke, K., J. Eiberger, J. Degen, D. Eckardt, A. Romualdi, M. Guldenagel, U. Deutsch, and G. Sohl. 2002. Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biol Chem.* 383:725-737.
287. Monti, R. J., R. R. Roy, and V. R. Edgerton. 2001. Role of motor unit structure in defining function. *Muscle Nerve* 24:848-866.
288. Constantin, B., and L. Cronier. 2000. Involvement of gap junctional communication in myogenesis. *Int Rev Cytol.* 196:1-65.
289. Dahl, E., E. Winterhager, O. Traub, and K. Willecke. 1995. Expression of gap junction genes, connexin40 and connexin43, during fetal mouse development. *Anat Embryol. (Berl)* 191:267-278.
290. Kalderon, N., M. L. Epstein, and N. B. Gilula. 1977. Cell-to-cell communication and myogenesis. *J Cell Biol.* 75:788-806.
291. Rash, J. E., and L. A. Staehelin. 1974. Freeze-cleave demonstration of gap junctions between skeletal myogenic cells in vivo. *Dev Biol.* 36:455-461.
292. Schmalbruch, H. 1982. Skeletal muscle fibers of newborn rats are coupled by gap junctions. *Dev Biol.* 91:485-490.

293. Araya, R., D. Eckardt, M. A. Riquelme, K. Willecke, and J. C. Saez. 2003. Presence and importance of connexin43 during myogenesis. *Cell Commun Adhes.* 10:451-456.
294. Balogh, S., C. C. Naus, and P. A. Merrifield. 1993. Expression of gap junctions in cultured rat L6 cells during myogenesis. *Dev Biol.* 155:351-360.
295. Constantin, B., L. Cronier, and G. Raymond. 1997. Transient involvement of gap junctional communication before fusion of newborn rat myoblasts. *C R Acad Sci. III* 320:35-40.
296. Mege, R. M., D. Goudou, C. Giaume, M. Nicolet, and F. Rieger. 1994. Is intercellular communication via gap junctions required for myoblast fusion? *Cell Adhes Commun.* 2:329-343.
297. Proulx, A., P. A. Merrifield, and C. C. Naus. 1997. Blocking gap junctional intercellular communication in myoblasts inhibits myogenin and MRF4 expression. *Dev Genet.* 20:133-144.
298. Proulx, A. A., Z. X. Lin, and C. C. Naus. 1997. Transfection of rhabdomyosarcoma cells with connexin43 induces myogenic differentiation. *Cell Growth Differ.* 8:533-540.
299. Hawke, T. J., and D. J. Garry. 2001. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J Appl Physiol.* 91:534-551.
300. Rash, J. E., and D. Fambrough. 1973. Ultrastructural and electrophysiological correlates of cell coupling and cytoplasmic fusion during myogenesis in vitro. *Dev Biol.* 30:166-186.
301. Houghton, F. D. 2005. Role of gap junctions during early embryo development. *Reproduction* 129:129-135.
302. Grounds, M. D. 1999. Muscle regeneration: molecular aspects and therapeutic implications. *Curr Opin Neurol.* 12:535-543.
303. Lefaucheur, J. P., and A. Seville. 1995. The cellular events of injured muscle regeneration depend on the nature of the injury. *Neuromuscul Disord.* 5:501-509.
304. Parker, M. H., P. Seale, and M. A. Rudnicki. 2003. Looking back to the embryo: defining transcriptional networks in adult myogenesis. *Nat Rev Genet.* 4:497-507.
305. Rudnicki, M. A., P. N. Schnegelsberg, R. H. Stead, T. Braun, H. H. Arnold, and R. Jaenisch. 1993. MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. *Cell* 75:1351-1359.
306. Kitzmann, M., and A. Fernandez. 2001. Crosstalk between cell cycle regulators and the myogenic factor MyoD in skeletal myoblasts. *Cell Mol Life Sci.* 58:571-579.
307. Lawlor, M. A., and P. Rotwein. 2000. Coordinate control of muscle cell survival by distinct insulin-like growth factor activated signaling pathways. *J Cell Biol.* 151:1131-1140.
308. Ostrovsky, O., and E. Bengal. 2003. The mitogen-activated protein kinase cascade promotes myoblast cell survival by stabilizing the cyclin-dependent kinase inhibitor, p21WAF1 protein. *J Biol Chem.* 278:21221-21231.
309. Little, J. B., E. I. Azzam, S. M. de Toledo, and H. Nagasawa. 2002. Bystander effects: intercellular transmission of radiation damage signals. *Radiat Prot Dosimetry* 99:159-162.
310. Harris, J. B., and C. A. MacDonell. 1981. Phospholipase A2 activity of notexin and its role in muscle damage. *Toxicon* 19:419-430.
311. Zador, E., L. Mendler, M. Ver Heyen, L. Dux, and F. Wuytack. 1996. Changes in mRNA levels of the sarcoplasmic/endoplasmic-reticulum Ca(2+)-ATPase

- isoforms in the rat soleus muscle regenerating from notexin-induced necrosis. *Biochem J.* 320 (Pt 1):107-113.
312. Keresztes, M., J. Haggblad, and E. Heilbronn. 1991. Basal and ATP-stimulated phosphoinositol metabolism in fusing rat skeletal muscle cells in culture. *Exp Cell Res.* 196:362-364.
 313. Becker, D., D. Ciantar, M. Catsicas, R. Pearson, and P. Mobbs. 2001. Use of pIRES vectors to express EGFP and connexin constructs in studies of the role of gap junctional communication in the early development of the chick retina and brain. *Cell Commun Adhes.* 8:355-359.
 314. Araya, R., D. Eckardt, S. Maxeiner, O. Kruger, M. Theis, K. Willecke, and J. C. Saez. 2005. Expression of connexins during differentiation and regeneration of skeletal muscle: functional relevance of connexin43. *J Cell Sci.* 118:27-37.
 315. Rando, T. A., and H. M. Blau. 1994. Primary mouse myoblast purification, characterization, and transplantation for cell-mediated gene therapy. *J Cell Biol.* 125:1275-1287.
 316. Bischoff, R. 1990. Cell cycle commitment of rat muscle satellite cells. *J Cell Biol.* 111:201-207.
 317. Husmann, I., L. Soulet, J. Gautron, I. Martelly, and D. Barritault. 1996. Growth factors in skeletal muscle regeneration. *Cytokine Growth Factor Rev.* 7:249-258.
 318. de Alvaro, C., N. Martinez, J. M. Rojas, and M. Lorenzo. 2005. Sprouty-2 overexpression in C2C12 cells confers myogenic differentiation properties in the presence of FGF2. *Mol Biol Cell.* 16:4454-4461.
 319. Cantini, M., E. Giuriso, C. Radu, S. Tiozzo, F. Pampinella, D. Senigaglia, G. Zaniolo, F. Mazzoleni, and L. Vitiello. 2002. Macrophage-secreted myogenic factors: a promising tool for greatly enhancing the proliferative capacity of myoblasts in vitro and in vivo. *Neurol Sci.* 23:189-194.
 320. Lescaudron, L., E. Peltekian, J. Fontaine-Perus, D. Paulin, M. Zampieri, L. Garcia, and E. Parrish. 1999. Blood borne macrophages are essential for the triggering of muscle regeneration following muscle transplant. *Neuromuscul Disord.* 9:72-80.
 321. Robertson, T. A., M. A. Maley, M. D. Grounds, and J. M. Papadimitriou. 1993. The role of macrophages in skeletal muscle regeneration with particular reference to chemotaxis. *Exp Cell Res.* 207:321-331.
 322. Sherr, C. J., and J. M. Roberts. 1999. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* 13:1501-1512.
 323. Walsh, K., and H. Perlman. 1997. Cell cycle exit upon myogenic differentiation. *Curr Opin Genet Dev.* 7:597-602.
 324. Azzam, E. I., S. M. de Toledo, and J. B. Little. 2001. Direct evidence for the participation of gap junction-mediated intercellular communication in the transmission of damage signals from alpha -particle irradiated to nonirradiated cells. *Proc Natl Acad Sci. U S A* 98:473-478.
 325. Berthoud, V. M., R. Singh, P. J. Minogue, C. W. Ragsdale, and E. C. Beyer. 2004. Highly restricted pattern of connexin36 expression in chick somite development. *Anat Embryol. (Berl)* 209:11-18.
 326. Beyer, E. C. 1990. Molecular cloning and developmental expression of two chick embryo gap junction proteins. *J Biol Chem.* 265:14439-14443.
 327. von Maltzahn, J., C. Euwens, K. Willecke, and G. Sohl. 2004. The novel mouse connexin39 gene is expressed in developing striated muscle fibers. *J Cell Sci.* 117:5381-5392.

328. Ko, K., P. Arora, W. Lee, and C. McCulloch. 2000. Biochemical and functional characterization of intercellular adhesion and gap junctions in fibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol.* 279:C147-157.
329. Liao, Y., K. H. Day, D. N. Damon, and B. R. Duling. 2001. Endothelial cell-specific knockout of connexin 43 causes hypotension and bradycardia in mice. *Proc Natl Acad Sci. U S A* 98:9989-9994.
330. Constantin, B., C. Cognard, and G. Raymond. 1996. Myoblast fusion requires cytosolic calcium elevation but not activation of voltage-dependent calcium channels. *Cell Calcium* 19:365-374.
331. Entwistle, A., R. J. Zalin, S. Bevan, and A. E. Warner. 1988. The control of chick myoblast fusion by ion channels operated by prostaglandins and acetylcholine. *J Cell Biol.* 106:1693-1702.
332. Wang, Y., F. Shibasaki, and K. Mizuno. 2005. Calcium signal-induced cofilin dephosphorylation is mediated by Slingshot via calcineurin. *J Biol Chem.* 280:12683-12689.
333. Pearson, R. A., N. L. Luneborg, D. L. Becker, and P. Mobbs. 2005. Gap junctions modulate interkinetic nuclear movement in retinal progenitor cells. *J Neurosci.* 25:10803-10814.
334. Scherberich, A., M. Campos-Toimil, P. Ronde, K. Takeda, and A. Beretz. 2000. Migration of human vascular smooth muscle cells involves serum-dependent repeated cytosolic calcium transients. *J Cell Sci.* 113 (Pt 4):653-662.
335. Albright, C. D., J. Kuo, and S. Jeong. 2001. cAMP enhances Cx43 gap junction formation and function and reverses choline deficiency apoptosis. *Exp Mol Pathol.* 71:34-39.
336. Darrow, B. J., V. G. Fast, A. G. Kleber, E. C. Beyer, and J. E. Saffitz. 1996. Functional and structural assessment of intercellular communication. Increased conduction velocity and enhanced connexin expression in dibutyryl cAMP-treated cultured cardiac myocytes. *Circ Res.* 79:174-183.
337. Marchal, S., I. Cassar-Malek, J. P. Magaud, J. P. Rouault, C. Wrutniak, and G. Cabello. 1995. Stimulation of avian myoblast differentiation by triiodothyronine:possible involvement of the cAMP pathway. *Exp Cell Res.* 220:1-10.
338. Zalin, R. J., and W. Montague. 1974. Changes in adenylate cyclase, cyclic AMP, and protein kinase levels in chick myoblasts, and their relationship to differentiation. *Cell* 2:103-108.
339. Baek, H. J., Y. J. Jeon, H. S. Kim, M. S. Kang, C. H. Chung, and D. B. Ha. 1994. Cyclic AMP negatively modulates both Ca²⁺/calmodulin-dependent phosphorylation of the 100-kDa protein and membrane fusion of chick embryonic myoblasts. *Dev Biol.* 165:178-184.
340. Clairmont, A., and H. Sies. 1997. Evidence for a posttranscriptional effect of retinoic acid on connexin43 gene expression via the 3'-untranslated region. *FEBS Let.* 419:268-270.
341. Shin, Y. J., J. H. Woo, C. H. Chung, and H. S. Kim. 2000. Retinoic acid and its geometrical isomers block both growth and fusion of L6 myoblasts by modulating the expression of protein kinase A. *Mol Cells* 10:162-168.
342. David, J. D., C. R. Faser, and G. P. Perrot. 1990. Role of protein kinase C in chick embryo skeletal myoblast fusion. *Dev Biol.* 139:89-99.
343. David, J. D., W. M. See, and C. A. Higginbotham. 1981. Fusion of chick embryo skeletal myoblasts:role of calcium influx preceding membrane union. *Dev Biol.* 82:297-307.

344. Farzaneh, F., A. Entwistle, and R. J. Zalin. 1989. Protein kinase C mediates the hormonally regulated plasma membrane fusion of avian embryonic skeletal muscle. *Exp Cell Res.* 181:298-304.
345. Lampe, P. D., and A. F. Lau. 2000. Regulation of gap junctions by phosphorylation of connexins. *Arch Biochem Biophys.* 384:205-215.
346. Watkins, M., S. K. Grimston, J. Y. Norris, B. Guillotin, A. Shaw, E. Beniash, and R. Civitelli. 2011. Osteoblast connexin43 modulates skeletal architecture by regulating both arms of bone remodeling. *Mol Biol Cell* 22:1240-1251.
347. Loiselle, A. E., J. X. Jiang, and H. J. Donahue. 2013. Gap junction and hemichannel functions in osteocytes. *Bone* 54:205-212.
348. Szendroi, M. 2004. Giant-cell tumour of bone. *J Bone Joint Surg. Br.* 86:5-12.
349. Lau, Y. S., A. Sabokbar, C. L. Gibbons, H. Giele, and N. Athanasou. 2005. Phenotypic and molecular studies of giant-cell tumors of bone and soft tissue. *Hum Pathol.* 36:945-954.
350. Knowles, H. J., and N. A. Athanasou. 2009. Canonical and non-canonical pathways of osteoclast formation. *Histol Histopathol.* 24:337-346.
351. Balla, P., M. E. Maros, G. Barna, I. Antal, G. Papp, Z. Sapi, N. A. Athanasou, M. S. Benassi, P. Picci, and T. Krenacs. 2015. Prognostic impact of reduced connexin43 expression and gap junction coupling of neoplastic stromal cells in giant cell tumor of bone. *PloS one* 10:e0125316.
352. Sung, H. W., D. P. Kuo, W. P. Shu, Y. B. Chai, C. C. Liu, and S. M. Li. 1982. Giant-cell tumor of bone:analysis of two hundred and eight cases in Chinese patients. *J Bone Joint Surg. Am.* 64:755-761.
353. Balke, M., L. Schremper, C. Gebert, H. Ahrens, A. Streitbuerger, G. Koehler, J. Harges, and G. Gosheger. 2008. Giant cell tumor of bone:treatment and outcome of 214 cases. *J Canc Res Clin Oncol.* 134:969-978.
354. Lee, M. J., D. F. Sallomi, P. L. Munk, D. L. Janzen, D. G. Connell, J. X. O'Connell, P. M. Logan, and B. A. Masri. 1998. Pictorial review:giant cell tumours of bone. *Clinical radiology* 53:481-489.
355. van der Heijden, L., P. D. Dijkstra, M. A. van de Sande, J. R. Kroep, R. A. Nout, C. S. van Rijswijk, J. V. Bovee, P. C. Hogendoorn, and H. Gelderblom. 2014. The clinical approach toward giant cell tumor of bone. *Oncologist* 19:550-561.
356. Rock, M. G., F. H. Sim, K. K. Unni, G. A. Witrak, F. J. Frassica, M. F. Schray, J. W. Beabout, and D. C. Dahlin. 1986. Secondary malignant giant-cell tumor of bone. Clinicopathological assessment of nineteen patients. *J Bone Joint Surg. Am.* 68:1073-1079.
357. Alberghini, M., K. Kliskey, T. Krenacs, P. Picci, L. Kindblom, R. Forsyth, and N. A. Athanasou. 2010. Morphological and immunophenotypic features of primary and metastatic giant cell tumour of bone. *Virchows Arch.* 456:97-103.
358. Amanatullah, D. F., T. R. Clark, M. J. Lopez, D. Borys, and R. M. Tamurian. 2014. Giant cell tumor of bone. *Orthopedics* 37:112-120.
359. Forsyth, R. G., G. De Boeck, S. Bekaert, T. De Meyer, A. H. Taminiau, D. Uyttendaele, H. Roels, M. M. Praet, and P. C. Hogendoorn. 2008. Telomere biology in giant cell tumour of bone. *J Pathol.* 214:555-563.
360. Gorunova, L., F. Vult von Steyern, C. T. Storlazzi, B. Bjerkehagen, G. Folleras, S. Heim, N. Mandahl, and F. Mertens. 2009. Cytogenetic analysis of 101 giant cell tumors of bone:nonrandom patterns of telomeric associations and other structural aberrations. *Genes Chromosomes Cancer* 48:583-602.
361. Moskovszky, L., K. Szuhai, T. Krenacs, P. C. Hogendoorn, M. Szendroi, M. S. Benassi, L. Kopper, T. Fule, and Z. Sapi. 2009. Genomic instability in giant cell

- tumor of bone. A study of 52 cases using DNA ploidy, relocalization FISH, and array-CGH analysis. *Genes Chromosomes Cancer* 48:468-479.
362. Behjati, S., P. S. Tarpey, N. Presneau, S. Scheipl, N. Pillay, and P. Van Loo. 2013. Distinct H3F3A and H3F3B driver mutations define chondroblastoma and giant cell tumor of bone. *Nat Genet.* 45:1479-1482.
 363. Werner, M. 2006. Giant cell tumour of bone:morphological, biological and histogenetical aspects. *Int Orthopaedics* 30:484-489.
 364. Steensma, M. R., W. K. Tyler, A. G. Shaber, S. R. Goldring, F. P. Ross, B. O. Williams, J. H. Healey, and P. E. Purdue. 2013. Targeting the giant cell tumor stromal cell:functional characterization and a novel therapeutic strategy. *PloS one* 8:e69101.
 365. Lehner, B., P. Kunz, H. Saehr, and J. Fellenberg. 2014. Epigenetic silencing of genes and microRNAs within the imprinted Dlk1-Dio3 region at human chromosome 14.32 in giant cell tumor of bone. *BMC Cancer* 14:495.
 366. Zheng, M. H., J. Xu, P. Robbins, N. Pavlos, S. Wysocki, S. M. Kumta, D. J. Wood, and J. M. Papadimitriou. 2000. Gene expression of vascular endothelial growth factor in giant cell tumors of bone. *Hum Pathol.* 31:804-812.
 367. Knowles, H. J., and N. A. Athanasou. 2008. Hypoxia-inducible factor is expressed in giant cell tumour of bone and mediates paracrine effects of hypoxia on monocyte-osteoclast differentiation via induction of VEGF. *J Pathol.* 215:56-66.
 368. Kumta, S. M., L. Huang, Y. Y. Cheng, L. T. Chow, K. M. Lee, and M. H. Zheng. 2003. Expression of VEGF and MMP-9 in giant cell tumor of bone and other osteolytic lesions. *Life Sci.* 73:1427-1436.
 369. Dickson, B. C., S. Q. Li, J. S. Wunder, P. C. Ferguson, B. Eslami, J. A. Werier, R. E. Turcotte, and R. A. Kandel. 2008. Giant cell tumor of bone express p63. *Modern Pathol.* 21:369-375.
 370. Lee, C. H., I. Espinosa, K. C. Jensen, S. Subramanian, S. X. Zhu, S. Varma, K. D. Montgomery, T. O. Nielsen, M. van de Rijn, and R. B. West. 2008. Gene expression profiling identifies p63 as a diagnostic marker for giant cell tumor of the bone. *Modern Pathol.* 21:531-539.
 371. Balla, P., L. Moskovszky, Z. Sapi, R. Forsyth, H. Knowles, N. A. Athanasou, M. Szendroi, L. Kopper, H. Rajnai, F. Pinter, I. Petak, M. S. Benassi, P. Picci, A. Conti, and T. Krenacs. 2011. Epidermal growth factor receptor signalling contributes to osteoblastic stromal cell proliferation, osteoclastogenesis and disease progression in giant cell tumour of bone. *Histopathol.* 59:376-389.
 372. Horvai, A. E., M. J. Kramer, J. J. Garcia, and R. J. O'Donnell. 2008. Distribution and prognostic significance of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) expression in giant-cell tumor of bone. *Modern Pathol.* 21:423-430.
 373. Horvai, A. E., R. Roy, D. Borys, and R. J. O'Donnell. 2012. Regulators of skeletal development:a cluster analysis of 206 bone tumors reveals diagnostically useful markers. *Modern Pathol.* 25:1452-1461.
 374. Antal, I., Z. Sapi, and M. Szendroi. 1999. The prognostic significance of DNA cytophotometry and proliferation index (Ki-67) in giant cell tumors of bone. *Int Orthopaedics* 23:315-319.
 375. Campanacci, M., N. Baldini, S. Boriani, and A. Sudanese. 1987. Giant-cell tumor of bone. *J Bone Joint Surg. Am.* 69:106-114.
 376. Enneking, W. F. 1986. A system of staging musculoskeletal neoplasms. *Clin Orthop Rel Res.* 204:9-24.

377. Oviedo-Orta, E., T. Hoy, and W. H. Evans. 2000. Intercellular communication in the immune system: differential expression of connexin40 and 43, and perturbation of gap junction channel functions in peripheral blood and tonsil human lymphocyte subpopulations. *Immunol.* 99:578-590.
378. Lloyd, S. A., and H. J. Donahue. 2010. Gap Junctions and Biophysical Regulation of Bone Cells. *Clin Rev Bone Miner Metab.* 8:189-200.
379. Buo, A. M., and J. P. Stains. 2014. Gap junctional regulation of signal transduction in bone cells. *FEBS Let.* 588:1315-1321.
380. Schajnovitz, A., T. Itkin, G. D'Uva, A. Kalinkovich, K. Golan, A. Ludin, D. Cohen, Z. Shulman, A. Avigdor, A. Nagler, O. Kollet, R. Seger, and T. Lapidot. 2011. CXCL12 secretion by bone marrow stromal cells is dependent on cell contact and mediated by connexin-43 and connexin-45 gap junctions. *Nat Immunol.* 12:391-398.
381. Gonzalez-Nieto, D., L. Li, A. Kohler, G. Ghiaur, E. Ishikawa, A. Sengupta, M. Madhu, J. L. Arnett, R. A. Santho, S. K. Dunn, G. I. Fishman, D. E. Gutstein, R. Civitelli, L. C. Barrio, M. Gunzer, and J. A. Cancelas. 2012. Connexin-43 in the osteogenic BM niche regulates its cellular composition and the bidirectional traffic of hematopoietic stem cells and progenitors. *Blood* 119:5144-5154.
382. Li, Z., Z. Zhou, M. M. Saunders, and H. J. Donahue. 2006. Modulation of connexin43 alters expression of osteoblastic differentiation markers. *Am J Physiol Cell Physiol.* 290:C1248-1255.
383. Bellido, T., and L. I. Plotkin. 2011. Novel actions of bisphosphonates in bone: preservation of osteoblast and osteocyte viability. *Bone* 49:50-55.
384. Park, D. J., C. J. Wallick, K. D. Martyn, A. F. Lau, C. Jin, and B. J. Warn-Cramer. 2007. Akt phosphorylates Connexin43 on Ser373, a "mode-1" binding site for 14-3-3. *Cell Commun Adhes.* 14:211-226.
385. Dunn, C. A., V. Su, A. F. Lau, and P. D. Lampe. 2012. Activation of Akt, not connexin 43 protein ubiquitination, regulates gap junction stability. *J Biol Chem.* 287:2600-2607.
386. Burghardt, R. C., R. Barhoumi, T. C. Sewall, and J. A. Bowen. 1995. Cyclic AMP induces rapid increases in gap junction permeability and changes in the cellular distribution of connexin43. *J Membr Biol.* 148:243-253.
387. Yogo, K., T. Ogawa, M. Akiyama, N. Ishida, and T. Takeya. 2002. Identification and functional analysis of novel phosphorylation sites in Cx43 in rat primary granulosa cells. *FEBS Let.* 531:132-136.
388. Etzerodt, A., and S. K. Moestrup. 2013. CD163 and inflammation: biological, diagnostic, and therapeutic aspects. *Antiox Redox Signal.* 18:2352-2363.
389. Asumda, F. Z., and P. B. Chase. 2011. Age-related changes in rat bone-marrow mesenchymal stem cell plasticity. *BMC Cell Biology* 12:44.
390. Chanson, M., J. P. Derouette, I. Roth, B. Foglia, I. Scerri, T. Dudez, and B. R. Kwak. 2005. Gap junctional communication in tissue inflammation and repair. *Biochim Biophys Acta* 1711:197-207.
391. Schilling, A. F., S. Filke, T. Lange, M. Gebauer, S. Brink, A. Baranowsky, J. Zustin, and M. Amling. 2008. Gap junctional communication in human osteoclasts in vitro and in vivo. *J Cell Mol Med.* 12:2497-2504.
392. Hemingway, F., T. G. Kashima, G. Mahendra, A. Dhongre, P. C. Hogendoorn, F. Mertens, and N. A. Athanasou. 2012. Smooth muscle actin expression in primary bone tumours. *Virchows Arch.* 460:525-534.
393. Spanakis, S. G., S. Petridou, and S. K. Masur. 1998. Functional gap junctions in corneal fibroblasts and myofibroblasts. *Invest Ophthalmol Visual Sci.* 39:1320-1328.

394. Baum, J. R., B. Long, C. Cabo, and H. S. Duffy. 2012. Myofibroblasts cause heterogeneous Cx43 reduction and are unlikely to be coupled to myocytes in the healing canine infarct. *Am J Physiol. Heart Circ Physiol.* 302:H790-800.
395. Churko, J. M., Q. Shao, X. Q. Gong, K. J. Swoboda, D. Bai, J. Sampson, and D. W. Laird. 2011. Human dermal fibroblasts derived from oculodentodigital dysplasia patients suggest that patients may have wound-healing defects. *Hum Mutat.* 32:456-466.
396. Asazuma-Nakamura, Y., P. Dai, Y. Harada, Y. Jiang, K. Hamaoka, and T. Takamatsu. 2009. Cx43 contributes to TGF-beta signaling to regulate differentiation of cardiac fibroblasts into myofibroblasts. *Exp Cell Res.* 315:1190-1199.
397. Tabar, L., and P. B. Dean. 2003. Mammography and breast cancer:the new era. *Int J Gynaecol Obstet.* 82:319-326.
398. Jemal, A., F. Bray, M. M. Center, J. Ferlay, E. Ward, and D. Forman. 2011. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 61:69-90.
399. Ferlay, J., H. R. Shin, F. Bray, D. Forman, C. Mathers, and D. M. Parkin. 2010. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008:GLOBOCAN 2008. *Inter J Cancer* 127:2893-2917.
400. Harbeck, N., K. Sotlar, R. Wuerstlein, and S. Doisneau-Sixou. 2014. Molecular and protein markers for clinical decision making in breast cancer:today and tomorrow. *Cancer Treat Rev.* 40:434-444.
401. Payne, S. J., R. L. Bowen, J. L. Jones, and C. A. Wells. 2008. Predictive markers in breast cancer--the present. *Histopathol.* 52:82-90.
402. Rakha, E. A., J. S. Reis-Filho, and I. O. Ellis. 2010. Combinatorial biomarker expression in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 120:293-308.
403. Baselga, J., E. A. Perez, T. Pienkowski, and R. Bell. 2006. Adjuvant trastuzumab:a milestone in the treatment of HER-2-positive early breast cancer. *Oncologist* 11 Suppl 1:4-12.
404. Prat, A., J. S. Parker, O. Karginova, C. Fan, C. Livasy, J. I. Herschkowitz, X. He, and C. M. Perou. 2010. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res.* 12(5):R68.
405. Szasz, A. M., Z. Nemeth, B. Gyorffy, M. Micsinai, T. Krenacs, Z. Baranyai, L. Harsanyi, A. Kiss, Z. Schaff, A. M. Tokes, and J. Kulka. 2011. Identification of a claudin-4 and E-cadherin score to predict prognosis in breast cancer. *Cancer Sci* 102:2248-2254.
406. Locke, D. 1998. Gap junctions in normal and neoplastic mammary gland. *J Pathol.* 186:343-349.
407. Monaghan, P., C. Clarke, N. P. Perusinghe, D. W. Moss, X. Y. Chen, and W. H. Evans. 1996. Gap junction distribution and connexin expression in human breast. *Exp Cell Res.* 223:29-38.
408. Tomasetto, C., M. J. Neveu, J. Daley, P. K. Horan, and R. Sager. 1993. Specificity of gap junction communication among human mammary cells and connexin transfectants in culture. *J Cell Biol.* 122:157-167.
409. Plante, I., M. K. Stewart, K. Barr, A. L. Allan, and D. W. Laird. 2011. Cx43 suppresses mammary tumor metastasis to the lung in a Cx43 mutant mouse model of human disease. *Oncogene* 30:1681-1692.
410. Talhouk, R. S., R. C. Elble, R. Bassam, M. Daher, A. Sfeir, L. A. Mosleh, H. El-Khoury, S. Hamoui, B. U. Pauli, and M. E. El-Sabban. 2005. Developmental expression patterns and regulation of connexins in the mouse mammary gland:expression of connexin30 in lactogenesis. *Cell Tissue Res.* 319:49-59.

411. Pointis, G., C. Fiorini, J. Gilleron, D. Carette, and D. Segretain. 2007. Connexins as precocious markers and molecular targets for chemical and pharmacological agents in carcinogenesis. *Curr Med Chem.* 14:2288-2303.
412. Oviedo-Orta, E., R. J. Errington, and W. H. Evans. 2002. Gap junction intercellular communication during lymphocyte transendothelial migration. *Cell Biol Int.* 26:253-263.
413. Laird, D. W., P. Fistouris, G. Batist, L. Alpert, H. T. Huynh, G. D. Carystinos, and M. A. Alaoui-Jamali. 1999. Deficiency of connexin43 gap junctions is an independent marker for breast tumors. *Cancer Res.* 59:4104-4110.
414. McLachlan, E., Q. Shao, and D. W. Laird. 2007. Connexins and gap junctions in mammary gland development and breast cancer progression. *J Membr Biol.* 218:107-121.
415. Kanczuga-Koda, L., S. Sulkowski, A. Lenczewski, M. Koda, A. Wincewicz, M. Baltaziak, and M. Sulkowska. 2006. Increased expression of connexins 26 and 43 in lymph node metastases of breast cancer. *J Clin Pathol.* 59:429-433.
416. Kapoor, P., M. M. Saunders, Z. Li, Z. Zhou, N. Sheaffer, E. L. Kunze, R. S. Samant, D. R. Welch, and H. J. Donahue. 2004. Breast cancer metastatic potential: correlation with increased heterotypic gap junctional intercellular communication between breast cancer cells and osteoblastic cells. *Int J Cancer* 111:693-697.
417. Pollmann, M. A., Q. Shao, D. W. Laird, and M. Sandig. 2005. Connexin 43 mediated gap junctional communication enhances breast tumor cell diapedesis in culture. *Breast Cancer Res.* 7:R522-534.
418. Banerjee, D., G. Gakhar, D. Madgwick, A. Hurt, D. Takemoto, and T. A. Nguyen. 2010. A novel role of gap junction connexin46 protein to protect breast tumors from hypoxia. *Int J Cancer* 127:839-848.
419. Conklin, C., D. Huntsman, E. Yorida, N. Makretsov, D. Turbin, J. F. Bechberger, W. C. Sin, and C. C. Naus. 2007. Tissue microarray analysis of connexin expression and its prognostic significance in human breast cancer. *Cancer let.* 255:284-294.
420. Cserni, G., M. Francz, B. Jaray, E. Kalman, I. Kovacs, J. Kulka, Z. Orosz, N. Udvarhelyi, and L. Vass. 2010. [Pathologic diagnosis and histopathology record of breast cancer]. *Magyar Onkologia* 54:217-226.
421. Mittendorf, E. A., J. S. Jeruss, S. L. Tucker, A. Kolli, L. A. Newman, A. M. Gonzalez-Angulo, T. A. Buchholz, A. A. Sahin, J. N. Cormier, A. U. Buzdar, G. N. Hortobagyi, and K. K. Hunt. 2011. Validation of a novel staging system for disease-specific survival in patients with breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol.* 29:1956-1962.
422. Sahoo, S., and S. C. Lester. 2009. Pathology of breast carcinomas after neoadjuvant chemotherapy: an overview with recommendations on specimen processing and reporting. *Arch Pathol Lab Med.* 133:633-642.
423. Shien, T., C. Shimizu, K. Seki, T. Shibata, T. Hojo, M. Ando, T. Kohno, N. Katsumata, S. Akashi-Tanaka, T. Kinoshita, and Y. Fujiwara. 2009. Comparison among different classification systems regarding the pathological response of preoperative chemotherapy in relation to the long-term outcome. *Breast Cancer Res Treat.* 113:307-313.
424. Kuroi, K., M. Toi, H. Tsuda, M. Kurosumi, and F. Akiyama. 2006. Issues in the assessment of the pathologic effect of primary systemic therapy for breast cancer. *Breast Cancer* 13:38-48.

425. Jeruss, J. S., E. A. Mittendorf, S. L. Tucker, A. M. Gonzalez-Angulo, T. A. Buchholz, A. A. Sahin, J. N. Cormier, A. U. Buzdar, G. N. Hortobagyi, and K. K. Hunt. 2008. Combined use of clinical and pathologic staging variables to define outcomes for breast cancer patients treated with neoadjuvant therapy. *J Clin Oncol.* 26:246-252.
426. Jeruss, J. S., E. A. Mittendorf, S. L. Tucker, A. M. Gonzalez-Angulo, T. A. Buchholz, A. A. Sahin, J. N. Cormier, A. U. Buzdar, G. N. Hortobagyi, and K. K. Hunt. 2008. Staging of breast cancer in the neoadjuvant setting. *Cancer Res.* 68:6477-6481.
427. Curtis, C., S. P. Shah, S. F. Chin, G. Turashvili, O. M. Rueda, M. J. Dunning, D. Speed, A. G. Lynch, S. Samarajiwa, Y. Yuan, S. Graf, G. Ha, G. Haffari, A. Bashashati, R. Russell, S. McKinney, A. Langerod, A. Green, E. Provenzano, G. Wishart, S. Pinder, P. Watson, F. Markowitz, L. Murphy, I. Ellis, A. Purushotham, A. L. Borresen-Dale, J. D. Brenton, S. Tavare, C. Caldas, and S. Aparicio. 2012. The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature* 486:346-352.
428. Gyorffy, B., A. Lanczky, A. C. Eklund, C. Denkert, J. Budczies, Q. Li, and Z. Szallasi. 2010. An online survival analysis tool to rapidly assess the effect of 22,277 genes on breast cancer prognosis using microarray data of 1,809 patients. *Breast Cancer Res Treat.* 123:725-731.
429. Teleki, I., T. Krenacs, M. A. Szasz, J. Kulka, B. Wichmann, C. Leo, B. Papassotiropoulos, C. Riemenschnitter, H. Moch, and Z. Varga. 2013. The potential prognostic value of connexin 26 and 46 expression in neoadjuvant-treated breast cancer. *BMC Cancer* 13:50.
430. Teleki, I., A. M. Szasz, M. E. Maros, B. Gyorffy, J. Kulka, N. Meggyeshazi, G. Kiszner, P. Balla, A. Samu, and T. Krenacs. 2014. Correlations of differentially expressed gap junction connexins Cx26, Cx30, Cx32, Cx43 and Cx46 with breast cancer progression and prognosis. *PloS one* 9:e112541.
431. Gyorffy, B., A. Lanczky, and Z. Szallasi. 2012. Implementing an online tool for genome-wide validation of survival-associated biomarkers in ovarian-cancer using microarray data from 1287 patients. *Endocr Relat Cancer* 19:197-208.
432. Groenendijk, F. H., and R. Bernards. 2014. Drug resistance to targeted therapies: Deja vu all over again. *Mol Oncol.* 8:1067-1083.
433. Ng, C. K., H. N. Pemberton, and J. S. Reis-Filho. 2012. Breast cancer intratumor genetic heterogeneity: causes and implications. *Exp Rev Anticancer Ther.* 12:1021-1032.
434. Kanczuga-Koda, L., M. Sulkowska, M. Koda, R. Rutkowski, and S. Sulkowski. 2007. Increased expression of gap junction protein--connexin 32 in lymph node metastases of human ductal breast cancer. *Folia Histochem Cytobiol.* 45 Suppl 1:S175-180.
435. Bier, A., I. Oviedo-Landaverde, J. Zhao, Y. Mamane, M. Kandouz, and G. Batist. 2009. Connexin43 pseudogene in breast cancer cells offers a novel therapeutic target. *Mol Cancer Ther.* 8:786-793.
436. Lee, S. W., C. Tomasetto, D. Paul, K. Keyomarsi, and R. Sager. 1992. Transcriptional downregulation of gap-junction proteins blocks junctional communication in human mammary tumor cell lines. *J Cell Biol.* 118:1213-1221.
437. Plante, I., A. Wallis, Q. Shao, and D. W. Laird. 2010. Milk secretion and ejection are impaired in the mammary gland of mice harboring a Cx43 mutant while

- expression and localization of tight and adherens junction proteins remain unchanged. *Biol Reprod.* 82:837-847.
438. Saunders, M. M., M. J. Seraj, Z. Li, Z. Zhou, C. R. Winter, D. R. Welch, and H. J. Donahue. 2001. Breast cancer metastatic potential correlates with a breakdown in homospecific and heterospecific gap junctional intercellular communication. *Cancer Res.* 61:1765-1767.
 439. Koval, M., S. A. Molina, and J. M. Burt. 2014. Mix and match: investigating heteromeric and heterotypic gap junction channels in model systems and native tissues. *FEBS Lett.* 588:1193-1204.
 440. Locke, D., N. Perusinghe, T. Newman, H. Jayatilake, W. H. Evans, and P. Monaghan. 2000. Developmental expression and assembly of connexins into homomeric and heteromeric gap junction hemichannels in the mouse mammary gland. *J Cell Physiol.* 183:228-237.
 441. Orthmann-Murphy, J. L., M. Freidin, E. Fischer, S. S. Scherer, and C. K. Abrams. 2007. Two distinct heterotypic channels mediate gap junction coupling between astrocyte and oligodendrocyte connexins. *J Neurosci.* 27:13949-13957.
 442. Yum, S. W., J. Zhang, V. Valiunas, G. Kanaporis, P. R. Brink, T. W. White, and S. S. Scherer. 2007. Human connexin26 and connexin30 form functional heteromeric and heterotypic channels. *Am J Physiol Cell Physiol.* 293:C1032-1048.
 443. Shao, Q., H. Wang, E. McLachlan, G. I. Veitch, and D. W. Laird. 2005. Down-regulation of Cx43 by retroviral delivery of small interfering RNA promotes an aggressive breast cancer cell phenotype. *Cancer Res.* 65:2705-2711.
 444. Helguero, L. A., M. H. Faulds, J. A. Gustafsson, and L. A. Haldosen. 2005. Estrogen receptors alpha (ERalpha) and beta (ERbeta) differentially regulate proliferation and apoptosis of the normal murine mammary epithelial cell line HC11. *Oncogene* 24:6605-6616.
 445. Andersen, J. 2000. Comparing regulation of the connexin43 gene by estrogen in uterine leiomyoma and pregnancy myometrium. *Environ Health Persp.* 108 Suppl 5:811-815.
 446. Carey, L. A., C. M. Perou, C. A. Livasy, L. G. Dressler, D. Cowan, K. Conway, G. Karaca, M. A. Troester, C. K. Tse, S. Edmiston, S. L. Deming, J. Geradts, M. C. Cheang, T. O. Nielsen, P. G. Moorman, H. S. Earp, and R. C. Millikan. 2006. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA* 295:2492-2502.
 447. Renoir, J. M., V. Marsaud, and G. Lazennec. 2013. Estrogen receptor signaling as a target for novel breast cancer therapeutics. *Biochemical pharmacology* 85:449-465.
 448. Jamieson, S., J. J. Goings, R. D'Arcy, and W. D. George. 1998. Expression of gap junction proteins connexin 26 and connexin 43 in normal human breast and in breast tumours. *J Pathol.* 184:37-43.
 449. Kalra, J., Q. Shao, H. Qin, T. Thomas, M. A. Alaoui-Jamali, and D. W. Laird. 2006. Cx26 inhibits breast MDA-MB-435 cell tumorigenic properties by a gap junctional intercellular communication-independent mechanism. *Carcinogenesis* 27:2528-2537.
 450. Banerjee, D., S. Das, S. A. Molina, D. Madgwick, M. R. Katz, S. Jena, L. K. Bossmann, D. Pal, and D. J. Takemoto. 2011. Investigation of the reciprocal relationship between the expression of two gap junction connexin proteins, connexin46 and connexin43. *J Biol Chem.* 286:24519-24533.

451. Boswell, B. A., A. C. Le, and L. S. Musil. 2009. Upregulation and maintenance of gap junctional communication in lens cells. *Exp Eye Res.* 88:919-927.
452. Lesniewicz, T., L. Kanczuga-Koda, M. Baltaziak, K. Jarzabek, R. Rutkowski, M. Koda, A. Wincewicz, M. Sulkowska, and S. Sulkowski. 2009. Comparative evaluation of estrogen and progesterone receptor expression with connexins 26 and 43 in endometrial cancer. *Int J Gynecol Cancer* 19:1253-1257.
453. Lin, V. C., A. S. Eng, N. E. Hen, E. H. Ng, and S. H. Chowdhury. 2001. Effect of progesterone on the invasive properties and tumor growth of progesterone receptor-transfected breast cancer cells MDA-MB-231. *Clin Cancer Res.* 7:2880-2886.
454. Saito, T., R. Tanaka, K. Wataba, R. Kudo, and H. Yamasaki. 2004. Overexpression of estrogen receptor-alpha gene suppresses gap junctional intercellular communication in endometrial carcinoma cells. *Oncogene* 23:1109-1116.
455. Zhou, J. Z., and J. X. Jiang. 2014. Gap junction and hemichannel-independent actions of connexins on cell and tissue functions--an update. *FEBS Let.* 588:1186-1192.
456. Kyo, N., H. Yamamoto, Y. Takeda, K. Ezumi, C. Y. Ngan, M. Terayama, M. Miyake, I. Takemasa, M. Ikeda, Y. Doki, K. Dono, M. Sekimoto, H. Nojima, and M. Monden. 2008. Overexpression of connexin 26 in carcinoma of the pancreas. *Oncol Reports* 19:627-631.
457. Tate, A. W., T. Lung, A. Radhakrishnan, S. D. Lim, X. Lin, and M. Edlund. 2006. Changes in gap junctional connexin isoforms during prostate cancer progression. *Prostate* 66:19-31.
458. Liu, X., T. Furuya, D. Li, J. Xu, X. Cao, Q. Li, J. Xu, Z. Xu, K. Sasaki, and X. Liu. 2010. Connexin 26 expression correlates with less aggressive phenotype of intestinal type-gastric carcinomas. *Int J Mol Med.* 25:709-716.
459. Nomura, S., K. Maeda, E. Noda, T. Inoue, S. Fukunaga, H. Nagahara, and K. Hirakawa. 2010. Clinical significance of the expression of connexin26 in colorectal cancer. *J Exp Clin Cancer Res.* 29:79.
460. Miglietta, L., P. Vanella, L. Canobbio, C. Naso, N. Cerisola, P. Meszaros, M. A. Parodi, and F. Morabito. 2010. Prognostic value of estrogen receptor and Ki-67 index after neoadjuvant chemotherapy in locally advanced breast cancer expressing high levels of proliferation at diagnosis. *Oncology* 79:255-261.
461. Kulka, J., A. M. Tokes, A. I. Toth, A. M. Szasz, A. Farkas, K. Borka, B. Jaray, E. Szekely, R. Istok, G. Lotz, L. Madaras, A. Korompay, L. Harsanyi, Z. Laszlo, Z. Ruzs, B. A. Molnar, I. A. Molnar, I. Kenessey, G. Szentmartoni, B. Szekely, and M. Dank. 2009. [Immunohistochemical phenotype of breast carcinomas predicts the effectiveness of primary systemic therapy]. *Magyar Onkologia* 53: 335-343.
462. Varga, Z., R. Caduff, and B. Pestalozzi. 2005. Stability of the HER2 gene after primary chemotherapy in advanced breast cancer. *Virchows Arch.* 446: 136-141.

12. Köszönetnyilvánítás

Köszönöm Matolcsy András és Kopper László professzoroknak a lehetőséget, hogy a Semmelweis Egyetem I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetben ideális körülmények között dolgozhatok.

Hálás vagyok Ormos Jenő professzornak, hogy bevezetett a patológiai kutatás világába és Martin Rosendaal professzornak, hogy a University College Londonban a connexin csatornák felé fordította érdeklődésemet.

Köszönöm Dux László professzornak, a Szegedi Tudományegyetemen általa vezetett Multidiszciplináris Iskolában kínált inspiráló lehetőségeket és hallgatókat.

Hálás vagyok Kulka Janina professzor asszonynak és Szász Marcell doktornak a klinikai irányultságú diagnosztikai kutatási szemlélet átadásáért. Molnár Béla tudományos főmunkatársnak, hogy lendületével és ötleteivel mindig ösztönzően hatott munkámra.

Köszönettel tartozom Krenács László, Iványi Béla és Tímár József professzornak a tanulságos közös munkákért, valamint Sápi Zoltán, Szendrői Miklós, Nick Athanasou és Pancras Hogendoorn professzoroknak az EuroBonet projektben folytatott, számomra nagyon hasznos együttműködésért.

Hálás vagyok a kiváló asszisztenseknek, akikkel együtt dolgozhattam: Makrainé Parsch Edit†, Tamási Anna, Lábdy Mária, Danyi Ferencné, Sarró Anikó, Dudás Ágnes, Fehér Edit, Geller Ildikó, Paulusz Mónika, Farkasné Kónya Gabriella, Csorba Gézáné és Kaminszki Zsuzsa, Cserneky Mária, Laczik Cecilia.

Nagy köszönet jár PhD hallgatóimnak: Ratkay-Traub Imolának, Görbe Anikónak, Teleki Ivettnek, Meggyesházi Nórának, Balla Péternek, Kiszner Gergőnek, Maros Máténak, Vancsik Tamásnak és Kiss Évának, valamint TDK hallgatóimnak a közös erőfeszítésekért és a jó hangulatban végzett eredményes munkáért.

Köszönettel tartozom az Semmelweis Egyetem I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetben és a Szegedi Patológiai Intézetben mostani és korábbi munkatársaimnak az együttműködésért.

Végül, nagyon hálás vagyok családomnak, szüleimnek, feleségemnek, gyermekeimnek türelmes támogatásukért, ami elengedhetetlen volt az eredményes munkámhoz.

13. Az értekezés alapját képező közlemények

1. Rajnai H, Teleki I, Kiszner G, Meggyeshazi N, Balla P, Vancsik T, Muzes G, Csomor J, Matolcsy A, **Krenacs T**: Connexin 43 communication channels in follicular dendritic cell development and in follicular lymphomas. *J Immunol Res.* 2015, 2015:528098.
2. Balla P, Maros ME, Barna G, Antal I, Papp G, Sapi Z, Athanasou NA, Benassi MS, Picci P, **Krenacs T**: Prognostic impact of reduced connexin43 expression and gap junction coupling of neoplastic stromal cells in giant cell tumor of bone. *PLoS One* 2015, 10(5):e0125316.
3. Teleki I, Szasz AM, Maros ME, Gyorffy B, Kulka J, Meggyeshazi N, Kiszner G, Balla P, Samu A, **Krenacs T**: Correlations of differentially expressed gap junction connexins Cx26, Cx30, Cx32, Cx43 and Cx46 with breast cancer progression and prognosis. *PLoS One* 2014, 9(11):e112541.
4. Teleki I, **Krenacs T**, Szasz MA, Kulka J, Wichmann B, Leo C, Papassotiropoulos B, Riemenschnitter C, Moch H, Varga Z: The potential prognostic value of connexin 26 and 46 expression in neoadjuvant-treated breast cancer. *BMC Cancer* 2013, 13:50.
5. Stelkovics E, Kiszner G, Meggyeshazi N, Korom I, Varga E, Nemeth I, Molnar J, Marczinovits I, **Krenacs T**: Selective *in situ* protein expression profiles correlate with distinct phenotypes of basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma of the skin. *Histol Histopathol.* 2013, 28(7):941-954.
6. Balla P, Moskovszky L, Sapi Z, Forsyth R, Knowles H, Athanasou NA, Szendroi M, Kopper L, Rajnai H, Pinter F, Petak I, Benassi MS, Picci P, Conti A, **Krenacs T**: Epidermal growth factor receptor signalling contributes to osteoblastic stromal cell proliferation, osteoclastogenesis and disease progression in giant cell tumour of bone. *Histopathology* 2011, 59(3):376-389.
7. Alberghini M, Kliskey K, **Krenacs T**, Picci P, Kindblom L, Forsyth R, Athanasou NA: Morphological and immunophenotypic features of primary and metastatic giant cell tumour of bone. *Virchows Arch.* 2010, 456(1):97-103.
8. Moskovszky L, Szuhai K, **Krenacs T**, Hogendoorn PC, Szendroi M, Benassi MS, Kopper L, Fule T, Sapi Z: Genomic instability in giant cell tumor of bone. A study of

52 cases using DNA ploidy, relocalization FISH, and array-CGH analysis. *Genes Chromosomes Cancer* 2009, 48(6):468-479.

9. Krenacs L, **Krenacs T**, Stelkovics E, Raffeld M: Heat-induced antigen retrieval for immunohistochemical reactions in routinely processed paraffin sections. *Methods Mol Biol.* 2010, 588:103-119.
10. **Krenacs T**, Krenacs L, Raffeld M: Multiple antigen immunostaining procedures. *Methods Mol Biol.* 2010, 588:281-300.
11. Gorbe A, Becker DL, Dux L, Stelkovics E, Krenacs L, Bagdi E, **Krenacs T**: Transient upregulation of connexin43 gap junctions and synchronized cell cycle control precede myoblast fusion in regenerating skeletal muscle in vivo. *Histochem Cell Biol.* 2005, 123(6):573-583.
12. Gorbe A, Becker DL, Dux L, Krenacs L, **Krenacs T**: In differentiating prefusion myoblasts connexin43 gap junction coupling is upregulated before myoblast alignment then reduced in post-mitotic cells. *Histochem Cell Biol.* 2006, 125(6):705-716.
13. Gorbe A, **Krenacs T**, Cook JE, Becker DL: Myoblast proliferation and syncytial fusion both depend on connexin43 function in transfected skeletal muscle primary cultures. *Exp Cell Res.* 2007, 313(6):1135-1148.
14. **Krenacs T**, Bagdi E, Stelkovics E, Bereczki L, Krenacs L: How we process trephine biopsy specimens: epoxy resin embedded bone marrow biopsies. *J Clin Pathol.* 2005, 58(9):897-903.
15. Ratkay-Traub I, Hopp B, Bor Z, Dux L, Becker DL, Krenacs T: Regeneration of rabbit cornea following excimer laser photorefractive keratectomy: a study on gap junctions, epithelial junctions and epidermal growth factor receptor expression in correlation with cell proliferation. *Exp Eye Res.* 2001, 73(3):291-302.
16. Bagdi E, Krenacs L, **Krenacs T**, Miller K, Isaacson PG: Follicular dendritic cells in reactive and neoplastic lymphoid tissues: a reevaluation of staining patterns of CD21, CD23, and CD35 antibodies in paraffin sections after wet heat-induced epitope retrieval. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2001, 9(2):117-124.

17. Rosendaal M, **Krenacs T**: Regulatory pathways in blood-forming tissue with particular reference to gap junctional communication. *Pathol Oncol Res.* 2000, 6(4):243-249.
18. Ploemacher RE, Mayen AE, De Koning AE, **Krenacs T**, Rosendaal M: Hematopoiesis: Gap junction intercellular communication is likely to be involved in regulation of stroma-dependent proliferation of hemopoietic stem cells. *Hematology* 2000, 5(2):133-147.
19. **Krenacs T**, Rosendaal M: Connexin43 gap junctions in normal, regenerating, and cultured mouse bone marrow and in human leukemias: their possible involvement in blood formation. *Am J Pathol.* 1998, 152(4):993-1004.
20. **Krenacs T**, Rosendaal M: Gap-junction communication pathways in germinal center reactions. *Dev Immunol.* 1998, 6(1-2):111-118.
21. **Krenacs T**, van Dartel M, Lindhout E, Rosendaal M: Direct cell/cell communication in the lymphoid germinal center: connexin43 gap junctions functionally couple follicular dendritic cells to each other and to B lymphocytes. *Eur J Immunol.* 1997, 27(6):1489-1497.
22. Rosendaal M, Mayen A, de Koning A, Dunina-Barkovskaya T, **Krenacs T**, Ploemacher R: Does transmembrane communication through gap junctions enable stem cells to overcome stromal inhibition? *Leukemia* 1997, 11(8):1281-1289.
23. **Krenacs T**, Rosendaal M: Immunohistological detection of gap junctions in human lymphoid tissue: connexin43 in follicular dendritic and lymphoendothelial cells. *J Histochem Cytochem.* 1995, 43(11):1125-1137.

Könyvfejezet az értekezés témájában

1. **Krenacs T**, Teleki I Z, Kiszner G, Rosendaal M. 2013. Gap junctions and connexins in the hematopoietic-immune system: structural considerations. In: *Connexin communication channels: Roles in the immune system and immunopathology*. Evans. H. W., Kwak. B. R. & Oviedo-Orta E., ed. CRC Press, Boca Raton, FL pp15-36.

14. További fontosabb saját közlemények és könyvfejezetek

1. Szalay CI, Erdélyi K, Kökény G, Lajtár E, Godó M, Révész C, Kaucsár T, Kiss N, Sárközy M, Csont T, **Krenács T**, Szénási G, Pacher P, Hamar P: Oxidative/nitrative stress and inflammation drive progression of doxorubicin-induced renal fibrosis in rats as revealed by comparing a normal and a fibrosis-resistant rat strain. *PLoS One* 2015, 10(6):e0127090.
2. Fritzsching B, Fellenberg J, Moskovszky L, Sápi Z, **Krenacs T**, Machado I, Poeschl J, Lehner B, Szendrői M, Bosch AL, Bernd L, Csóka M, Mechtersheimer G, Ewerbeck V, Kinscherf R, Kunz P: CD8(+)/FOXP3(+)-ratio in osteosarcoma microenvironment separates survivors from non-survivors: a multicenter validated retrospective study. *Oncoimmunology* 2015, 4(3):e990800.
3. Leiszter K, Sipos F, Galamb O, **Krenács T**, Veres G, Wichmann B, Fűri I, Kalmár A, Patai ÁV, Tóth K, Valcz G, Tulassay Z, Molnár B: Promoter hypermethylation-related reduced somatostatin production promotes uncontrolled cell proliferation in colorectal cancer. *PLoS One* 2015, 10(2):e0118332.
4. Pénczvártó Z, Lánckzy A, Lénárt J, Meggyesházi N, **Krenács T**, Szoboszlai N, Denkert C, Pete I, Győrffy B: MEK1 is associated with carboplatin resistance and is a prognostic biomarker in epithelial ovarian cancer. *BMC Cancer* 2014, Nov 18;14:837.
5. Valcz G, Patai AV, Kalmár A, Péterfia B, Fűri I, Wichmann B, Műzes G, Sipos F, **Krenács T**, Mihály E, Spisák S, Molnár B, Tulassay Z: Myofibroblast-derived SFRP1 as potential inhibitor of colorectal carcinoma field effect. *PLoS One* 2014, 9(11):e106143.
6. Kunz P, Fellenberg J, Moskovszky L, Sápi Z, **Krenacs T**, Machado I, Poeschl J, Lehner B, Szendrői M, Ruef P, Bohlmann M, Bosch AL, Ewerbeck V, Kinscherf R, Fritzsching B: Improved survival in osteosarcoma patients with atypical low vascularization. *Ann Surg Oncol.* 2015, 22(2):489-96.
7. Andocs G, Meggyeshazi N, Balogh L, Spisak S, Maros ME, Balla P, Kiszner G, Teleki I, Kovago C, **Krenacs T**: Upregulation of heat shock proteins and the promotion of damage-associated molecular pattern signals in a colorectal cancer model by modulated electrohyperthermia. *Cell Stress Chaperones* 2015, 20(1):37-46.

8. Kiszner G, Wichmann B, Nemeth IB, Varga E, Meggyeshazi N, Teleki I, Balla P, Maros ME, Penksza K, **Krenacs T**. Cell cycle analysis can differentiate thin melanomas from dysplastic nevi and reveals accelerated replication in thick melanomas. *Virchows Arch*. 2014, 464(5):603-612.
9. Kunz P, Fellenberg J, Moskovszky L, Spi Z, **Krenacs T**, Poeschl J, Lehner B, Szendri M, Ewerbeck V, Kinscherf R, Fritzsching B. Osteosarcoma microenvironment: whole-slide imaging and optimized antigen detection overcome major limitations in immunohistochemical quantification. *PLoS One* 2014, 9(3):e90727.
10. Meggyeshazi N, Andocs G, Balogh L, Balla P, Kiszner G, Teleki I, Jeney A, **Krenacs T**: DNA fragmentation and caspase-independent programmed cell death by modulated electrohyperthermia. *Strahlenther Onkol*. 2014, 190(9):815-822.
11. Leiszter K, Galamb O, Sipos F, **Krenács T**, Veres G, Wichmann B, Kalmár A, Patai V, Tóth K, Valcz G, Molnár B, Tulassay Z: Sporadic colorectal cancer development shows rejuvenescence regarding epithelial proliferation and apoptosis. *PLoS One* 2013, 8(10):e74140.
12. Kaucsr T, Rvsz C, God M, **Krenács T**, Albert M, Szalay CI, Rosivall L, Beny Z, Btkai S, Thum T, Sznsi G, Hamar P: Activation of the miR-17 family and miR-21 during murine kidney ischemia-reperfusion injury. *Nucleic Acid Ther*. 2013, 23(5):344-354.
13. Verbeke SL, Bertoni F, Bacchini P, Oosting J, Sciort R, **Krenács T**, Bovée JV. Active TGF- signaling and decreased expression of PTEN separates angiosarcoma of bone from its soft tissue counterpart. *Mod Pathol*. 2013, 26(9):1211-1221.
14. van Oosterwijk JG, Meijer D, van Ruler MA, van den Akker BE, Oosting J, **Krenács T**, Picci P, Flanagan AM, Liegl-Atzwanger B, Leithner A, Athanasou N, Daugaard S, Hogendoorn PC, Bovée JV. Screening for potential targets for therapy in mesenchymal, clear cell, and dedifferentiated chondrosarcoma reveals Bcl-2 family members and TGF as potential targets. *Am J Pathol*. 2013, 182(4):1347-1356.
15. Galamb O, Wichmann B, Sipos F, Spisák S, **Krenács T**, Tóth K, Leiszter K, Kalmár A, Tulassay Z, Molnár B. Dysplasia-carcinoma transition specific transcripts in colonic biopsy samples. *PLoS One* 2012, 7(11):e48547.

16. **Krenacs T**, Kiszner G, Stelkovics E, Balla P, Teleki I, Nemeth I, Varga E, Korom I, Barbai T, Plotar V, Timar J, Raso E: Collagen XVII is expressed in malignant but not in benign melanocytic tumors and it can mediate antibody induced melanoma apoptosis. *Histochem Cell Biol.* 2012 138(4):653-667.
17. Fónyad L, **Krenács T**, Nagy P, Zalatnai A, Csomor J, Sápi Z, Pápay J, Schönleber J, Diczházi C, Molnár B. Validation of diagnostic accuracy using digital slides in routine histopathology. *Diagn Pathol.* 2012 Mar 31;7:35.
18. Rajnai H, Bődör C, Balogh Z, Gagyí E, Csomor J, **Krenács T**, Tóth E, Matolcsy A. Impact of the reactive microenvironment on the bone marrow involvement of follicular lymphoma. *Histopathology* 2012, 60(6B):E66-75.
19. Valcz G, Sipos F, **Krenács T**, Molnár J, Patai AV, Leiszter K, Tóth K, Wichmann B, Molnár B, Tulassay Z: Increase of α -SMA(+) and CK (+) cells as an early sign of epithelial-mesenchymal transition during colorectal carcinogenesis. *Pathol Oncol Res.* 2012, 18(2):371-376.
20. Szasz AM, Nemeth Z, Gyorffy B, Micsinai M, **Krenacs T**, Baranyai Z, Harsanyi L, Kiss A, Schaff Z, Tokes AM, Kulka J: Identification of a claudin-4 and E-cadherin score to predict prognosis in breast cancer. *Cancer Sci.* 2011, 102(12):2248-2254.
21. Valcz G, **Krenács T**, Sipos F, Patai AV, Wichmann B, Leiszter K, Tóth K, Balogh Z, Csizmadia A, Hagymási K, Masszi T, Molnár B, Tulassay Z: Lymphoid aggregates may contribute to the migration and epithelial commitment of bone marrow-derived cells in colonic mucosa. *J Clin Pathol.* 2011, 64(9):771-775.
22. Baka Z, Barta P, Losonczy G, Krenács T, Pápay J, Szarka E, Sármay G, Babos F, Magyar A, Géher P, Buzás EI, Nagy G. Specific expression of PAD4 and citrullinated proteins in lung cancer is not associated with anti-CCP antibody production. *Int Immunol.* 2011, 23(6):405-414.
23. Maggiani F, Forsyth R, Hogendoorn PC, **Krenacs T**, Athanasou NA. The immunophenotype of osteoclasts and macrophage polykaryons. *J Clin Pathol.* 2011, 64(8):701-705.
24. Sipos F, Galamb O, Wichmann B, **Krenács T**, Tóth K, Leiszter K, Muzes G, Zágoni T, Tulassay Z, Molnár B: Peripheral blood based discrimination of ulcerative colitis and Crohn's disease from non-IBD colitis by genome-wide gene expression profiling. *Dis Markers* 2011, 30(1):1-17.

25. Tamás L, Szentkúti G, Eros M, Dános K, Brauswetter D, Szende B, Zsákovics I, **Krenács T**: Differential biomarker expression in head and neck cancer correlates with anatomical localization. *Pathol Oncol Res.* 2011, 17(3):721-727.
26. Egervári G, Márk A, Hajdu M, Barna G, Sági Z, **Krenács T**, Kopper L, Sebestyén A. Mitotic lymphoma cells are characterized by high expression of phosphorylated ribosomal S6 protein. *Histochem Cell Biol.* 2011, 135(4):409-417.
27. Pansuriya TC, Oosting J, **Krenács T**, Taminiau AH, Verdegaal SH, Sangiorgi L, Sciot R, Hogendoorn PC, Szuhai K, Bovée JV: Genome-wide analysis of Ollier disease: Is it all in the genes? *Orphanet J Rare Dis.* 2011, Jan 14;6:2.
28. Conti A, Rodriguez GC, Chiechi A, Blazquez RM, Barbado V, **Krenacs T**, Novello C, Pazzaglia L, Quattrini I, Zanella L, Picci P, De Alava E, Benassi MS: Identification of potential biomarkers for giant cell tumor of bone using comparative proteomics analysis. *Am J Pathol.* 2011, 178(1):88-97.
29. Szasz AM, Tokes AM, Micsinai M, **Krenacs T**, Jakab C, Lukacs L, Nemeth Z, Baranyai Z, Dede K, Madaras L, Kulka J: Prognostic significance of claudin expression changes in breast cancer with regional lymph node metastasis. *Clin Exp Metastasis.* 2011, 28(1):55-63.
30. **Krenacs T**, Ficsor L, Varga SV, Angeli V, Molnar B: Digital microscopy for boosting database integration and analysis in TMA studies. *Methods Mol Biol.* 2010;664:163-175.
31. Pazzaglia L, Conti A, Chiechi A, Novello C, Magagnoli G, Astolfi A, Pession A, **Krenacs T**, Alberghini M, Picci P, Benassi MS: Differential gene expression in classic giant cell tumours of bone: Tenascin C as biological risk factor for local relapses and metastases. *Histopathology* 2010, 57(1):59-72.
32. Valcz G, **Krenács T**, Sipos F, Leiszter K, Tóth K, Balogh Z, Csizmadia A, Muzes G, Molnár B, Tulassay Z. The role of the bone marrow derived mesenchymal stem cells in colonic epithelial regeneration. *Pathol Oncol Res.* 2011, 17:11-16.
33. Galamb O, Spisák S, Sipos F, Tóth K, Solymosi N, Wichmann B, **Krenács T**, Valcz G, Tulassay Z, Molnár B: Reversal of gene expression changes in the colorectal normal-adenoma pathway by NS398 selective COX2 inhibitor. *Br J Cancer* 2010, 102(4):765-773.

34. Szabó J, Bartók K, **Krenács T**, Szepesváry Z, Szende B: GnRH receptor and androgen receptor status and outcome of advanced prostate carcinomas. *Anticancer Res.* 2009, 29(2):681-684.
35. Galamb O, Sipos F, Spisák S, Galamb B, **Krenács T**, Valcz G, Tulassay Z, Molnár B. Potential biomarkers of colorectal adenoma-dysplasia-carcinoma progression: mRNA expression profiling and in situ protein detection on TMAs reveal 15 sequentially upregulated and 2 downregulated genes. *Cell Oncol.* 2009, 31(1):19-29.
36. **Krenacs T**, Zsakovics I, Diczhazi C, Ficsor L, Varga VS, Molnar B: The potential of digital microscopy in breast pathology. *Pathol Oncol Res.* 2009, 15(1):55-58.
37. Stelkovics E, Korom I, Marczinovits I, Molnar J, Rasky K, Raso E, Ficsor L, Molnar B, Kopper L, **Krenacs T**: Collagen XVII/BP180 protein expression in squamous cell carcinoma of the skin detected with novel monoclonal antibodies in archived tissues using tissue microarrays and digital microscopy. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2008, 16(5):433-441.
38. Galamb O, Györffy B, Sipos F, Dinya E, **Krenács T**, Berczi L, Szőke D, Spisák S, Solymosi N, Németh AM, Juhász M, Molnár B, Tulassay Z. Helicobacter pylori and antrum erosion-specific gene expression patterns: the discriminative role of CXCL13 and VCAM1 transcripts. *Helicobacter* 2008, 13(2):112-126.
39. Papay J, **Krenacs T**, Moldvay J, Stelkovics E, Furak J, Molnar B, Kopper L. Immunophenotypic profiling of nonsmall cell lung cancer progression using the tissue microarray approach. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2007, 15(1):19-30.
40. Zhiponova MK, Pettkó-Szandtner A, Stelkovics E, Neer Z, Bottka S, **Krenács T**, Dudits D, Fehér A, Szilák L: Mitosis-specific promoter of the alfalfa cyclin-dependent kinase gene (Medsa;CDKB2;1) is activated by wounding and ethylene in a non-cell division-dependent manner. *Plant Physiol.* 2006, 140(2):693-703.
41. Krenacs L, Smyth MJ, Bagdi E, **Krenacs T**, Kopper L, Rudiger T, Zettl A, Muller-Hermelink HK, Jaffe ES, Raffeld M: The serine protease granzyme M is preferentially expressed in NK-cell, gamma delta T-cell, and intestinal T-cell lymphomas: evidence of origin from lymphocytes involved in innate immunity. *Blood* 2003, 101(9):3590-3593.

42. **Krenács T**, Dux L: Silver-enhanced immunogold labeling of calcium-ATPase in sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. *J Histochem Cytochem.* 1994, 42(7):967-968.
43. Krenács L, Tiszlavicz L, **Krenács T**, Boumsell L: Immunohistochemical detection of CD1A antigen in formalin-fixed and paraffin-embedded tissue sections with monoclonal antibody 010. *J Pathol.* 1993, 171(2):99-104.
44. **Krenács T**, Uda H, Tanaka S: One-step double immunolabeling of mouse interdigitating reticular cells: simultaneous application of pre-formed complexes of monoclonal rat antibody M1-8 with horseradish peroxidase-linked anti-rat immunoglobulins and of monoclonal mouse anti-Ia antibody with alkaline phosphatase-coupled anti-mouse immunoglobulins. *J Histochem Cytochem.* 1991, 39(12):1719-1723.
45. **Krenács T**, Krenács L, Bozóky B, Iványi B: Double and triple immunocytochemical labelling at the light microscope level in histopathology. *Histochem J.* 1990, 22(10):530-536.
46. Iványi B, **Krenács T**, Dobó E, Ormos J: Demonstration of bacterial antigen in macrophages in experimental pyelonephritis. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol.* 1990, 59(2):83-88.
47. **Krenács T**, Stiller D, Krenács L, Bahn H, Molnar E, Dux L: Sarcoplasmic reticulum (SR) Ca²⁺(+)-ATPase as a marker of muscle cell differentiation: immunohistochemical investigations of rhabdomyosarcomas and enhancement of the immunostaining after sodium methoxide pretreatment. *Acta Histochem.* 1990, 88(2):159-166.
48. **Krenács T**, Molnár E, Dobó E, Dux L: Fibre typing using sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase and myoglobin immunohistochemistry in rat gastrocnemius muscle. *Histochem J.* 1989, 21(3):145-155.
49. **Krenács T**, Lászik Z, Dobó E: Application of immunogold-silver staining and immunoenzymatic methods in multiple labelling of human pancreatic Langerhans islet cells. *Acta Histochem.* 1989, 85(1):79-85.
50. Iványi B, **Krenács T**, Petri S. Phagocytosis of bacteria by proximal tubular epithelium in experimental pyelonephritis. *Virchows Arch B* 1985, 50(1):59-70.

15. Tudománymetria adatok – MTMT szerint jóváhagyva

Tudományos közlemények összesen:	146
Elsőszerzős folyóiratcikkek:	24
Utolsó szerzős folyóirat cikkek:	18

Impakt faktor

Az értekezés alapját képező közlemények:	57,279
A kandidátusi értekezésben (PhD) nem szereplő további közlemények:	181,521
A kandidátusi értekezésben szereplő közlemények:	12,7
Összesen:	251,5

Hivatkozások száma

Összes hivatkozás:	1357
Független hivatkozások száma:	1109

Hirsch index

21