

T. C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI

KOLONİK SUBEPİTELYAL VE PERİKRIPTAL MYOFİBROBLASTLAR İÇİN  
İMMUNOHİSTOKİMYASAL BELİRTEÇLERİN TANIMLANMASI VE NEOPLASTİK  
SÜREÇTEKİ İFADELERİNİN ARAŞTIRILMASI

Dr. Kübra Katipoğlu

UZMANLIK TEZİ  
Olarak Hazırlanmıştır

ANKARA  
2019

T. C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI

KOLONİK SUBEPİTELYAL VE PERİKRIPTAL MYOFİBROBLASTLAR İÇİN  
İMMUNOHİSTOKİMYASAL BELİRTEÇLERİN TANIMLANMASI VE NEOPLASTİK  
SÜREÇTEKİ İFADELERİNİN ARAŞTIRILMASI

Dr. Kübra Katipoğlu

UZMANLIK TEZİ  
Olarak Hazırlanmıştır

TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. Aytekin AKYOL

ANKARA  
2019

## TEŞEKKÜR

Bu araştırma Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından THD-2019-18183 numaralı bilimsel araştırma projesi olarak desteklenmiştir.

Öğrencilik hayatımın başından itibaren bu yolda bana emek veren tüm öğretmenlerime ve tabii ki patoloji eğitimime katkısı olan Hacettepe Üniversitesi Patoloji ABD'nin birbirinden değerli tüm öğretim üyelerine;

Tezimin fikir kaynağı olan, her aşamasında desteği ve bilgisi ile bana yol gösteren, sadece iyi bir bilim insanı değil iyi bir insan olma konusunda da örnek almaya çalıştığım çok değerli tez danışmanım Prof. Dr. Aytekin Akyol'a;

Arşivden preparatları ve blokları temin eden Lokman Kale ve Şükrü Oral'a;

Taze doku toplanmasında yardımcı olan tüm asistan arkadaşlarıma, Mefa Kalkancı'ya ve Sultan Selim Saraç'a;

Doku mikrodizini oluşturulması ve immunhistokimyasal boyama uygulanmasını gerçekleştiren Aynur Işık ve Özlem Kalaycı'ya,

Her aşamasında samimiyetle yardımcı olan Sarp Uzun'a

Asistanlık periyodunda birlikte çalıştığım başta tüm asistan arkadaşlarım olmak üzere; burayı sıcak bir aile ortamına çeviren Hacettepe Patoloji ABD'nin tüm çalışanlarına;

*Teşekkür ederim.....*

Bu hayattaki en büyük şansım olan annem, babam ve kardeşlerime ben olmamı sağladıkları ve uzak kelimesini anlamsızlaştırdıkları için;

Benden desteğini esirgemeyen ve anlayışı ile hayatımı kolaylaştıran sevgili eşim Burak Katipoğlu'na

*Minnettarım....*

## ÖZET

**Katipoglu K., “Kolonik Subepitelyal ve Perikriptal Myofibroblastlar İçin İmmunohistokimyasal Belirteçlerin Tanımlanması ve Neoplastik Süreçteki İfadelerinin Araştırılması”, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Ankara, 2019.**

Kolonik subepitelyal myofibroblastlar, lamina propriada kriptlerin hemen altında yer alan; yara iyileşmesi, epitel büyümesi, fibrozis, immuntolerans, inflamasyon, tümör invazyonu gibi birçok süreçte rol alan  $\alpha$ -SMA pozitif mezenkimal hücrelerdir. Kolonik lamina propriada subepitelyal myofibroblastlar haricinde  $\alpha$ -SMA boyanan başka mezenkimal hücreler de (örneğin perisitler) mevcuttur. Bu tez çalışmasının amacı; kolonik subepitelyal ve perikriptal myofibroblastlara spesifik bir immunbelirteç bulmaktır. Çalışmaya Hacettepe Üniversitesi Tıp fakültesi’nde 2019 yılında adenokarsinom nedeniyle kolektomi ameliyatı olan 20 adet vaka dahil edilmiştir. Olgulara ait normal kolon mukozasını temsil eden parafin bloklardan iki ayrı odak örneklenerek doku mikrodizini hazırlanmıştır. Mikrodizinden elde edilen seri kesitlere ZEB1,  $\alpha$ -SMA, Desmin, TMEM119, AOC3, PR2D3, MYH11, CD146, CD56 antikorları kullanılarak immünohistokimyasal çalışmalar uygulanmıştır. Ayrıca iki farklı doku mikrodizininde temsil edilen 28 kolorektal adenokarsinom TMEM119, AOC3 ve MYH11 ile boyanmıştır. Bu çalışmada literatürde ilk kez TMEM119 ile kolonik subepitelyal ve perikriptal myofibroblastların pozitif olduğunu göstermiştir. Myofibroblastlarda ZEB-1 ekspresyonu EMT’yi desteklemektedir. Kolorektal kanserlerde stromada myofibroblastik biyobelirteçlerde kayıp da gösterilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** ZEB1,  $\alpha$ -SMA, Desmin, TMEM119, AOC3, PR2D3, MYH11, CD146, CD56, Kolonik Subepitelyal ve Perikriptal Myofibroblastlar

## ABSTRACT

**Katipoglu K.**, *“Identification of Immunohistochemical Markers for Colonic Subepithelial and Pericryptal Myofibroblasts and Investigation of Their Expressions in the Neoplastic Process”*, Hacettepe University Faculty of Medicine, Department of Medical Pathology, Ankara, 2019.

Colonic subepithelial and pericryptal myofibroblasts are located just beneath the epithelium in the colonic lamina propria whom are  $\alpha$ -SMA positive mesenchymal cells that play a role in many processes such as wound healing, epithelial growth, fibrosis, immuno-tolerance, inflammation and tumor invasion. In addition to subepithelial myofibroblasts, there are other mesenchymal cells (eg, pericytes) in the colonic lamina propria which are stained positive with  $\alpha$ -SMA. The aim of this thesis is find a specific biomarker for colonic subepithelial and pericryptal myofibroblasts. Twenty patients who underwent colectomy for adenocarcinoma in Hacettepe University School of Medicine in 2019 were included in this study. Tissue microarray was prepared by sampling two separate foci from paraffin blocks representing the normal colon mucosa of each case. Immunohistochemical studies were performed using  $\alpha$ -SMA, Desmin, ZEB1, TMEM119, AOC3, PR2D3, MYH11, CD146, CD56 antibodies on serial sections. Expression of TMEM119, AOC3, and MYH11 were evaluated in 28 colorectal adenocarcinoma cases in two different tissue microarrays. In this study, we demonstrated that colonic subepithelial and pericryptal myofibroblasts were positive for TMEM119 for the first time in the literature. Presence of ZEB-1 expression in myofibroblasts supports the EMT event. In colorectal cancers loss of myofibroblastic markers in stroma were also demonstrated.

**Key words:** ZEB1,  $\alpha$ -SMA, Desmin, TMEM119, AOC3, PR2D3, MYH11, CD146, CD56, Colonic subepithelial and pericryptal myofibroblasts

## İÇİNDEKİLER

|  |           |
|--|-----------|
| TEŞEKKÜR.....  | iii       |
| ÖZET.....  | iv        |
| ABSTRACT.....  | v         |
| İÇİNDEKİLER.....   | vi        |
| KISALTMALAR.....   | viii      |
| ŞEKİLLER.....  | xi        |
| RESİMLER.....  | xii       |
| TABLolar.....  | xiii      |
| <b>1.GİRİŞ.....</b>  | <b>1</b>  |
| <b>2.GENEL BİLGİLER.....</b>   | <b>2</b>  |
| 2.1 Kolon lamina propriasındaki mezenkimal hücreler ve kök hücre nişi.....   | 2         |
| 2.2 Kolonik subepitelyal ve perikriptal myofibroblastlar ile ilgili genel bilgiler.....                                  | 4         |
| 2.3 Kolonik subepitelyal ve perikriptal myofibroblastların kaynakları/köken aldıkları hücreler/<br>orijinleri.....       | 7         |
| 2.4 Kolonik subepitelyal ve perikriptal myofibroblastların görevleri.....  | 11        |
| 2.4.1 İntestinal epitelyal hücrelerin büyümesinin desteklemek.....   | 11        |
| 2.4.2 Otoimmün ve inflamatuvar bağırsak hastalıkları.....  | 12        |
| 2.4.3 Mekanik bariyer, mekanosensör ve villus hareketi.....  | 13        |
| 2.4.4 Antijen sunumu doğal ve kazanılmış bağışıklık ve immün tolerans.....   | 16        |
| 2.4.5 Doku morfogenez, kök hücrenin uygun yere yerleşmesi ve epitel mezenkim arası<br>karşılıklı konuşma.....            | 18        |
| 2.4.6 Kanser ilişkili Myofibroblastlar, invazyon ilişkisi ve ilaç direnci.....   | 25        |
| 2.4.6a Kanser ilişkili Myofibroblast/fibroblast.....   | 25        |
| 2.4.6b İnvazyondaki Roller.....  | 27        |
| 2.4.6c İlaç direnci.....   | 28        |
| 2.5 Kolonik subepitelyal ve perikriptal myofibroblastların İmmünohistokimyasal<br>Belirteçleri.....                      | 28        |
| 2.6 Kolonik subepitelyal ve perikriptal myofibroblastların diğer organlardaki eşdeğer<br>hücreleri.....                  | 36        |
| <b>3. GEREÇ VE YÖNTEM.....</b>   | <b>38</b> |
| 3.1. İnsan kolon doku örneklerinin toplanması ve doku mikrodizininin hazırlanması.....                                   | 38        |
| 3.2. İmmünohistokimyasal Boyama ve antikorlar.....   | 38        |
| 3.2.1. Leica BOND-Max Otomatik İmmünohistokimya Boyaması.....  | 38        |
| 3.2.2. Manuel immünohistokimyasal Boyama Metodu.....   | 39        |
| 3.2.3. İmmünohistokimyasal Boyalı Preparatların Dijital Slayt Haline Getirilmesi ve<br>İmmünohistokimyasal Skrolama..... | 40        |
| 3.3. Kolorektal Kanser Doku Mikrodizini ve Subepitelyal Myofibroblast Belirteçleri ile<br>Boyama Özellikleri.....        | 41        |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>4. BULGULAR.....</b>   | <b>42</b> |
| 4.1. Normal Mukozaya Yönelik çalışmalarda Elde Edilen Bulgular.....                                       | 42        |
| 4.1.1 Normal Mukoza Örneği Alınan Olguların Klinikopatolojik Bulguları.....                               | 42        |
| 4.1.2 Normal Kolon Mukozasında İzlenen İmmunhistokimyasal Bulgular .....                                  | 43        |
| 4.2. Neoplastik Süreçlerde Kolonik Subepitelyal ve Perikriptal myofibroblastik Belirteçlerin İfadesi..... | 55        |
| <b>5. TARTIŞMA.....</b>   | <b>59</b> |
| <b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>  | <b>67</b> |
| <b>KAYNAKLAR.....</b>   | <b>69</b> |
| Ek 1 Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Çalışma İzni               |           |
| Ek 2 İncelenen Hastaların Kodlanmış Örnek Numaraları ve Doku Mikrodizini Koordinatları                    |           |
| Ek 3 İmmunohistokimyasal Çalışmaların Skorlanmış Verileri A) Normal Kolon Mukozası                        |           |
| Ek 4 İmmunohistokimyasal Çalışmaların Skorlanmış Verileri B) Kolon Karsinomları                           |           |

**KISALTMALAR**

$\alpha$ -SMA:  $\alpha$  Smooth muscle actin

5HT: 5 hydroxytryptamine receptors

AML: Akut myeloid lösemi

AOC3/VAP1: Bakır içeren amin oksidaz-3 / Vasküler adezyon proteini

AT2: Angiotensin II reseptörü

Bmp: Bone morphogenetic protein

BMPRII: BMP type II receptor

cAMP: Cyclic Adenosine monophosphate

CD: Cluster differentiation

CD56 / NCAM: Neural cell adhesion molecule

CD146 / MCAM: Melanoma cell adhesion molecule

Cdc42: Cell division control protein 42

Coll1a: Collagen Type I Alpha 1 Chain

CTLA4: Cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4

dBcAMP: Dibutiril siklik adenzin monofosfat

DcR3: Decoy receptor 3

DR3: DR3: death-domain receptor 3

EGF: Epidermal Growth Factor

EMT: Epithelial-to-Mesenchymal Transition

ENMT: Endothelial-to-Mesenchymal Transition ET: Endotelin

ETAR: Endotelin A reseptörleri

E-box: Enhancer box

FAP: Fibroblast aktive edici protein

FGFR: Fibroblast growth factor receptor

FSP-1: Fibroblast spesifik protein

FSP / S100A-4: Fibroblast spesifik protein / sitoplazmik Ca bağlayan S100 süperailisi

Fz: Frizzled

GIST: Gastrointestinal stromal tümör



Hes-1: Enhancer of split homolog-1  
HGF: Hepatocyte growth factor  
Hh: Hedgehog  
Hhip: Hedgehog-interacting protein  
H&E: Hematoksilen & Eozin  
IFN: Interferon  
IL: İnterleukin  
ISC: Intestinal stem cell  
İBH: İnflamatuvar bağırsak hastalığı  
KİF: Kanser ilişkili fibroblast  
Lgr-5: Leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptor 5  
LRRC17: Leucine-rich repeat-containing 17  
LYVE1: Lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor  
MAP: Mitogen activated protein  
MCP: monocyte chemotactic protein  
MCSP / NG2: Melanoma kondroitin sülfat proteoglikan / neuron glia2  
MHC: Major Histocompatibility Copmlex  
MMP: Matriks metaloproteinaz  
MPSKT: Malign periferik sinir kılıfı tümörü  
mRNA: Messanger ribonucleic acid  
MSC: Mesenchymal stem cell  
Msi-1: Musashi-1  
MYH11: Myosin heavy chain 11-smooth muscle myosin  
NK: Natural Killer  
NK1R: Neurokinin 1 receptor  
NKX2-3: NK2 transcription factor-related, locus 3  
P2y1: ADP reseptör  
PCP: Planar Cell polarity  
PDGF: Platalet derived growth factor  
PDGFR- $\beta$ : Platalet derived growth factor receptor beta

PDL1: Programme death ligand 1

PEComa: Perivascular epitheloid cell neoplasm

PI3K: Phosphatidylinositol 3-kinase

PMT: Pericyte to Myofibroblast Transition

PPAR: Peroxisome proliferator activated receptor

PORCN: Porcupine

RAC: Ras related C3 botulinium toxin substrate

Rho: Ras homolog gene family member A

SEIMF: Subepitelyal intestinal myofibroblast

SF/HGF: Scatter factor/hepatocyte growth factor

SHOX2: Short stature homeobox 2

SIP1: Smad-interacting protein-1

TAK-1: TGF- $\beta$ -activated kinase 1

TAp73: p53 homologu olan p73'ün tüm boyut izoformu

TBX5: T-box 5

TCF4: T-hücre faktör-4

TEM1/Endosialine/CD248: Tumor endothelial marker 1/ Sialylated transmembran protein

TGF- $\beta$ : Tranforming growth factor  $\beta$

Th-17: T helper 17

TIMP: Tissue inhibitor of metalloproteinase

TIMP-1: Tissue inhibitor of matrix metalloproteases 1

TLR: Toll like receptor

TNF: Tumor necrosis factor TL1A: TNF like cytokine 1A

Treg: Regulatory T cell

VEGF: Vascular endothelial growth factor

ZEB-1: Zinc finger E-box-binding homeobox 1 / deltaEF1

ZEB-2: Zinc finger E-box-binding homeobox 1

qPCR: Quantative polymerase chain reaction

Wnt: Wingless ve İnt1

## ŞEKİLLER

| Şekil |  | Sayfa |
|-------|--|-------|
| 2.1   | İnce bağırsak villus-kript aksının epitel ve mezenkimal elementlerinin mekansal ilişkileri.  | 2     |
| 2.2   | Myofibroblastın düz kas ve fibroblast ile kıyaslanması.  | 6     |
| 2.3   | İki aşamalı myofibroblast oluşumu.   | 8     |
| 2.4   | Myofibroblastların kökenleri.  | 9     |
| 2.5   | Bağırsak mezenkimal-stromal hücrelerin kemik iliği kök hücre orijini.  | 10    |
| 2.6   | A) Epitel ve bağ dokusu bileşenlerinin çıkarılmasından sonra bir villusun bir elektron mikroskopik görüntüsü.<br>B) Bir villusta subepitelyal fibroblastların şematik gösterimi. | 14    |
| 2.7   | Epitelden yoksun villusta mekanik uyarı sonucunda ATP salınımı (Luminescence Luciferine-Luciferase) sonrası 20. saniyedeki görüntüde villus kontraksiyonu.                       | 15    |
| 2.8   | ATP salınımının myofibroblastlar üzerine etkisi ve Substans P aracılı olarak sinaps benzeri varikositeleri etkilemesi.   | 16    |
| 2.9   | Doğal ve adaptif immünite arasındaki bağ olarak mezenkimal stromal hücreler.   | 17    |
| 2.10  | Epitelyal-mezenkimal etkileşimler  | 19    |
| 2.11  | Kanonikal Wnt yolağı.  | 20    |
| 2.12  | Kanonik BMP yolağı.  | 21    |
| 2.13  | Hedgehog sinyal yolağı.  | 22    |
| 2.14  | Aktin bağımlı hücre-matriks adezyonu.  | 31    |
| 3.1   | Konvansiyonel immunhistokimya değerlendirme yöntemi.   | 41    |

## RESİMLER

| Resim |   | Sayfa |
|-------|---|-------|
| 2.1   | Hh inhibisyonu fare intestinindeki histomorfolojik değişiklikler  | 29    |
| 2.2   | Literatürdeki immunobelirteçlerin “The Human Protein Atlas” görüntüleri.  | 35    |
| 4.1   | Neoplastik olmayan kolon mukozasından hazırlanan doku mikrodizinin (TMA-K11) H&E boyaması ve dijital slayt olarak görünümü. | 42    |
| 4.2   | X17 kodlu dokuya ait H&E ve $\alpha$ -SMA boyamaları  | 44    |
| 4.3   | X19 kodlu olguya ait H&E ve ZEB-1 boyamaları  | 46    |
| 4.4   | X12 kodlu olguya ait H&E ve TMEM-119 boyamaları   | 47    |
| 4.5   | PR2D3 ile FFPE kolon mukozasında boyanma negatif.   | 48    |
| 4.6   | X5 kodlu olguya ait H&E ve AOC3 boyamaları  | 49    |
| 4.7   | X12 kodlu olguya ait H&E ve CD146 boyamaları  | 50    |
| 4.8   | X19 kodlu olguya ait H&E ve CD56 boyamaları   | 51    |
| 4.9   | X17 kodlu olguya ait H&E ve desmin boyamaları   | 52    |
| 4.10  | X5 kodlu dokuya ait MYH11 immünboyaması.  | 54    |
| 4.11  | K6 16 nolu AOC3 doku boyaması   | 56    |
| 4.12  | Kolon karsinomu desmoplastik stromasında AOC3 ekspresyonu   | 56    |
| 4.13  | TMEM119 kolon karsinomu desmoplastik stroma ekspresyonu   | 57    |
| 4.14  | TMEM119 boyanma paternleri.   | 57    |
| 4.15  | MYH11 desmoplastik stromada ekspresyonu   | 58    |

**TABLolar**

| Tablo |   | Sayfa |
|-------|---|-------|
|       | Fibroblast, myofibroblast ve düz kas hücrelerinin ultrastrüktürel olarak ve fonksiyon ve immunohistokimyasal açılarından birbirleri ile kıyaslanması. | 5     |
| 2.1   | İnce bağırsak ve kolonik fibroblastların ara filamanlar ile boyanma özellikleri.  | 29    |
| 2.2   |   |       |
| 3.1   | Çalışmada kullanılan antikorların bilgileri.  | 40    |
|       | Normal kolon mukozası kullanılan olgulara ait klinikopatolojik bilgiler.  |       |
| 4.1   | Subepitelyal ve perikriptal myofibroblastları $\alpha$ -SMA pozitif mezenkimal hücrelerden ayırmak için kullanılacak immunohistokimyasal belirteçler. | 43    |
| 4.2   | Bağımsız olarak her üç antikorun kolon kansinomlarında ekspresyonu:   | 53    |
| 4.3   |   | 58    |
| 4.4   | AOC3, TMEM119 ve MYH11 ekspresyon ilişkisi.   | 58    |

## 1. GİRİŞ

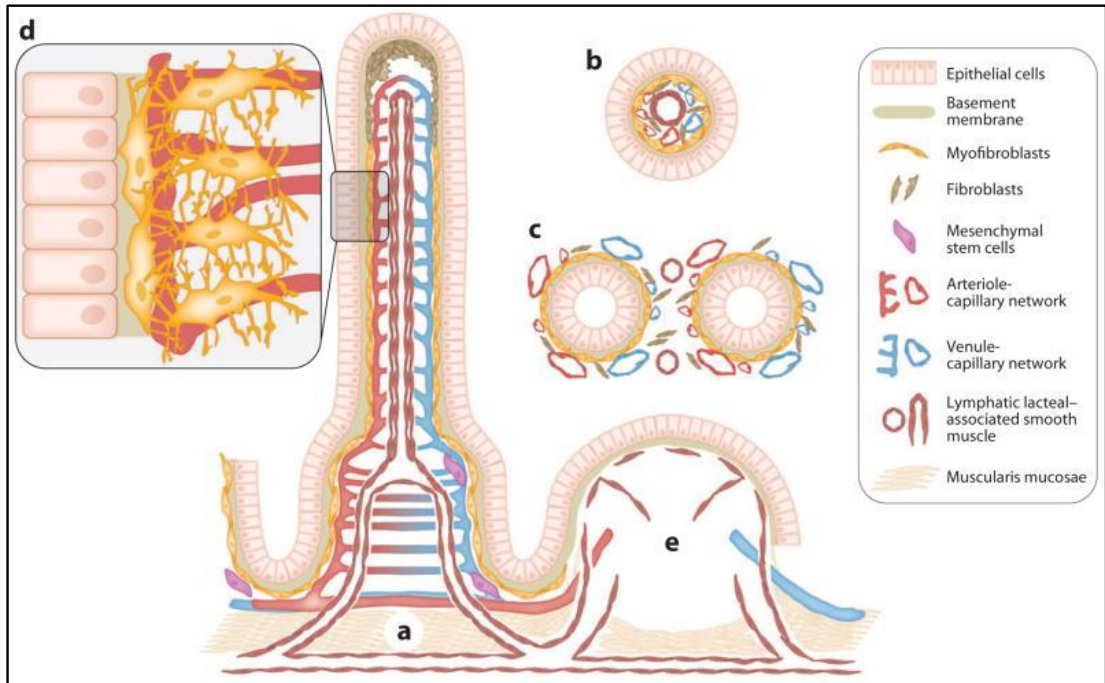
İnce bağırsak ve kolon duvarı histolojik olarak dört tabakadan oluşmaktadır: Bunlar sırasıyla mukoza, submukoza, muskularis propria ve seroza yapılarıdır. Mukoza, epitel, lamina propria ve muskularis mukozadan meydana gelmektedir. İnce bağırsak ve kolon lamina propriasında villus ve kript epitelinin hemen altında myofibroblastlar yer alır<sup>1</sup>. Dinlenme durumundaki fibroblastlar ki bunlar  $\alpha$ -SMA negatiftir<sup>2</sup>; epitele bitişik lamina propria boyunca yayılır. Subepitelyal ve kript duvarının konturlarını takip eden “perikriptal” yerleşimli myofibroblastlar hem fibroblastik hem de düz kas farklılaşması sergilemektedirler. Mural hücreler (perisitler), kemik iliğinden köken alan stromal kök hücreler, muskularis mukozayı oluşturan hücreler, ince bağırsak villus korunu oluşturan düz kas hücreleri ve subepitelyal intestinal myofibroblastlar (SEİMF) intestinal lamina proprianın mezenkimal elemanlarını oluşturmaktadırlar. Bu hücreler intraselüler hücre iskeleti proteinlerini ( $\alpha$ -SMA, vimentin, kollajen tip 1) eksprese ederken, epitelyal sitokeratinlerden yoksun oldukları bilinmektedir<sup>3</sup>.

Eyden ve arkadaşları SEİMF’ları; düz-yıldızimsı morfolojide,  $\alpha$ -SMA, vimentin, fibronektin ve düz kas dışı myozin eksprese eden, düz kas myozini ile desmin negatif (veya zayıf pozitif) hücreler olarak tanımlamışlardır. Elektron mikroskopik olarak bu hücreler bol sitoplazmalı, endoplazmik retikulum ve golgiden zengin, granüler kollajen içermekte olup, komşu SEİMF’lara “gap junction”lar ile bağlıdırlar. SEİMF’lar çevre matrikse ise fibroneksus ile (bazal lamina aracılıklı değil) bağlıdır. Bu sayede kontraktıl bir ağ oluşmakta olup bu özellikleri de yara iyileşmesinde kritik rol almalarını sağlamaktadır<sup>4</sup>. SEİMF’lar anatomik ve fonksiyonel olarak sinsityum oluşturan mezenkimal hücrelerin özelleşmiş bir topluluğu olup ekstrasellüler matrikste retiküler bir ağ meydana getirmektedirler<sup>5</sup>.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kolon lamina propriasındaki mezenkimal hücreler ve intestinal kök hücre nişi

Subepitelyal ve perikriptal myofibroblastların saptanmasında  $\alpha$ -SMA ifadesinin belirteç olarak kullanılması sensitif olmakla birlikte, lamina propriada yer alan diğer bazı mezenkimal hücreler de  $\alpha$ -SMA ekspresyonu göstermektedir. Bunlar; kemik iliği kökenli stromal kök hücreler, perisitler (diğer adıyla mural hücreler), villus korunun düz kası, muskularis mukoza ve lenfatik laktealleri çevreleyen düz kas hücreleridir<sup>3</sup> (Şekil 2.1). Hatta myofibroblastlara atfedilen bir çok rolün gerçekten myofibroblastlar tarafından üstlenilip üstlenilmediği; diğer  $\alpha$ -SMA pozitif mezenkimal



**Şekil 2.1.** İnce bağırsak villus-kript aksının epitel ve mezenkimal elementlerinin mekansal ilişkileri. a) İnce bağırsak villus kript aksının longitudinal kesiti:  $\alpha$ SMA + SEİMF'lar, perisitler, mezenkimal kök hücreler, lenfatik lakteal düz kası, özellikle villusun üst kısmında yerleşimli fibroblastlar ( $\alpha$ -SMA-) gösterilmiştir. b) Villus transvers kesiti: Lenfatik lakteal düz kası gösterir. c) Kript transvers kesiti: Lenfatik perisitleri göstermektedir. (b) ve (c) ayrıca, villusta subepitelyal yerleşimli myofibroblastların esasen perisitler olduğunu göstermektedir. d) Myofibroblastların ve perisitlerin yakından görünümü. e) Peyer plağı: Vasküler, lenfatik ve stromal elementleri (lenfositler, makrofajlar, dendritik hücreler ve polimorfonükleer lökositler gösterilmemiştir). 4 nolu (Powell DW, Pinchuk IV, Saada JI, Chen X, Mifflin RC: Mesenchymal cells of the intestinal lamina propria. Annu Rev Physiol 2011, 73:213-37) referanstan direkt alıntıdır.

hücrelerinin rolünü çalıp çalmadığı sorgulanmıştır<sup>6</sup>. Literatürde myofibroblast ve diğer  $\alpha$ -SMA pozitif mezenkimal hücreleri immunbelirteçler ile ayırmak için kullanılan yöntemler bölüm 4.2'de anlatılmıştır.

$\alpha$ -SMA pozitif diğer hücrelerden olan perisitler H&E kesitlerde iğsi şekilli morfolojiye sahip olup, küçük damarların bazal membranlarına gömülü olarak bulunmaktadır. Bu hücrelerin membran oluşumu ve anjiogenezde (tümör anjiogenezi dahil) görevli oldukları bilinmektedir. Maktrikse tutunan adezyon plakları ile kuvvetlendirdikleri hücre bağlantılarında asıl rolü neksuslar ("gap junction") üstlenmekte olup neksus aracılığıyla hem birbirilerine hem de endotele bağlanmaktadır<sup>6</sup>. Perisitler, myofibroblastlar ile bir çok ortak immunbelirteç eksprese ederler. Bu iki hücrenin morfolojik olarak da benzer olması ve birbirine dönüşebildikleri<sup>7</sup> de göz önüne alındığında, aynı tip hücrelerin farklı lokalizasyonlarda yer alan formları olabileceği akla gelmektedir.

İnce bağırsak villus korunda yer alan düz kas hücreleri ile lenfatik laktealleri çevreleyen düz kas hücreleri benzer özellikler göstermektedirler. Merkezdeki lenfatikleri çevreleyen ve kasılabilen bu hücreler sayesinde lenf sıvısı duktus torasikusa doğru akabilmektedir<sup>3</sup>.

Kemik iliğinden köken alan mezenkimal kök hücreler kemik, kıkırdak, kas, tendon, adipoz ve stromal hücrelere farklılaşma yeteneğine sahiptir<sup>8</sup>. H&E boyalı kesitlerde lamina propriada yer alan mezenkimal ve hematopoetik kök hücreleri saptamak kolay olmasa da  $\alpha$ -SMA boyaması bu hücreleri belirginleştirmektedir.

Muskularis mukozayı oluşturan düz kas hücreleri morfolojik olarak diğer tüm hücrelerden kolayca ayrılabilir.

İntestinal lamina propriada yer alan bir diğer mezenkimal hücre  $\alpha$ -SMA negatif fibroblastlardır. Fibroblastlar, mekanik stres varlığında myofibroblastlara dönüşebilen, ekstraselüler matriks sentezi, kontraktilite, migrasyon veya sekretuar hiçbir işlevi olmayan dokuda rezerv görevi gören hücrelerdir<sup>9</sup>.

İntestinal kök hücre nişinin ana hücresi; bağırsak bütünlüğünü koruyabilmek için proliferasyon, farklılaşma ve kendini yenileme yeteneği olan kök hücrelerdir. Ancak kök hücrenin yer aldığı nişi oluşturan komşu epitel hücreleri, Paneth hücreleri,



bazal membran, mezenkimal hücreler ve özellikle ksenobiyotik direnci sayesinde nişin devamlılığını sağlama yeteneği<sup>10</sup> olan myofibroblastlardır. Bu epitel mezenkim çapraz konuşması özellikle Wnt, Bmp ve Hh sinyal yolları (2.4.5 nolu bölümde bu sinyal yolları ayrıntılandırılacaktır), büyüme faktörleri, ekstraselüler matris nişin devamlılığı için önemlidir. Kök hücre belirteci olarak nöral kök hücre belirteci olan Msi-1 (Musashi-1) ve Notch sinyal yolağında görevli transkripsiyon faktörü olan Hes-1 (Enhancer of split homolog-1) önerilmektedir<sup>11</sup>.

## 2.2. Kolonik subepitelyal ve perikriptal myofibroblastlar ile ilgili genel bilgiler

Myofibroblastlar ilk kez yara iyileşme sürecinde granülasyon dokusunda içerdiği hücre içi iskelet yapıları sayesinde kasılma kuvvetinden sorumlu olan hücreler olarak tanımlanmıştır. Daha sonra neoplastik (bir çok karsinomda olduğu gösterilmiş olmakla birlikte özellikle desmoplastik stromadan zengin olanlarda) ve non-neoplastik dokularda (Dupuytren kontraktürü) fibroblast ile düz kas arası bir farklılaşma gösteren bu hücreler araştırılmaya başlanmıştır.

Hücre iskeleti özelliklerine göre myofibroblastlar 5 fenotip oluşturur:

- Sadece vimentin: Fenotip V;
- Vimentin ve  $\alpha$ -düz kas aktini: Fenotip VA;
- Vimentin,  $\alpha$ -düz kas aktini ve desmin: Fenotip VAD;
- Vimentin ve desmin: Fenotip VD;
- Vimentin,  $\alpha$ -düz kas aktini, düz kas myosin ağır zinciri ve +/- desmin: Fenotip VA (D) M

Vasküler düz kas hücrelerinin aktin izoformu karakteristiği olan  $\alpha$ -SMA varlığı, myofibroblastik fenotipin belirleyicisi olarak kabul edilse de yukarıda özetlendiği üzere her myofibroblast (fenotip V ve fenotip VD)  $\alpha$ -SMA içermeyebilir. Ayrıca fibroblastlardan TGF- $\beta$  sinyali ile 2 aşamalı olarak myofibroblast oluşumu sırasındaki ara hücre fenotipi olan protomyofibroblastlar da  $\alpha$ -SMA negatiftirler.

Ultrastrüktürel olarak bu hücreleri fibroblast ve düz kas hücreleri ile kıyaslayarak Tablo 2.1'de ayrıntılı olarak incelenmiştir<sup>1</sup>.

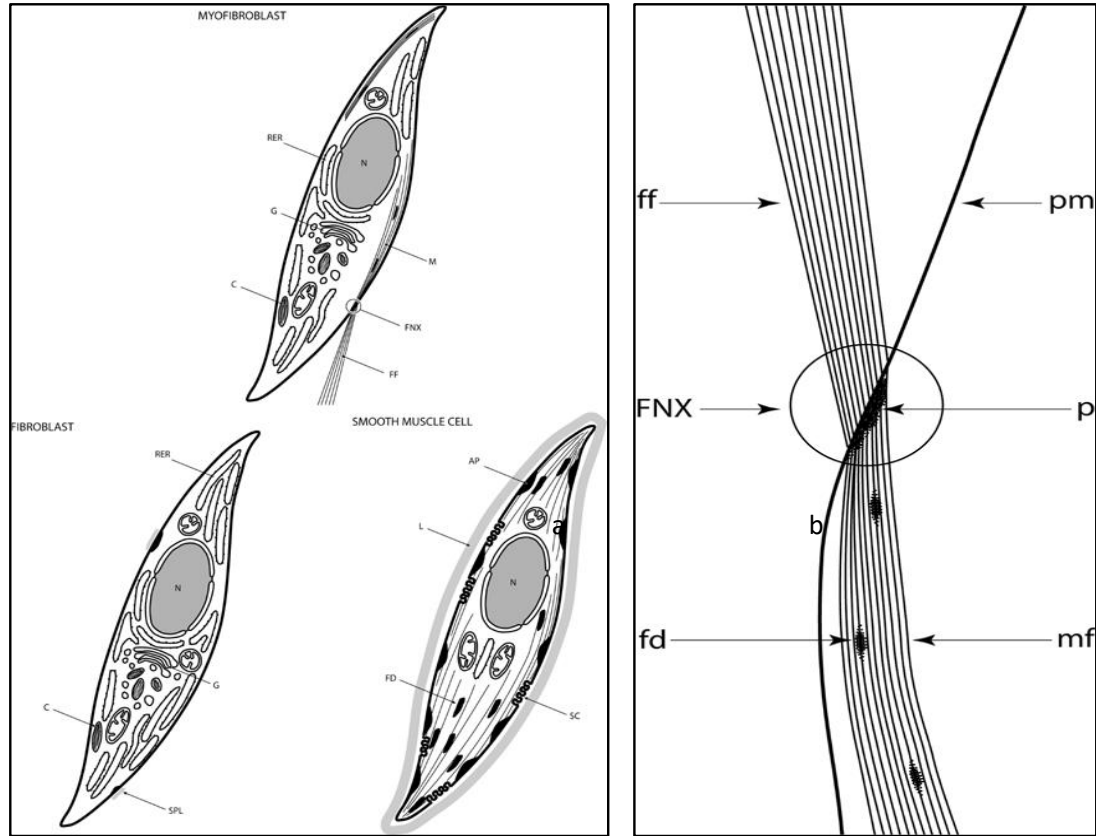
Tablo 2.1'de özetlenen ve Şekil-2.2'de resmedilen ayrıntılı ultrastrüktürel incelemelerin sonucunda "Histology for Pathologist"te myofibroblastların yalnızca

ultrastrüktürel olarak tanımlanabileceği; heterojen ve kompleks bir immünoekspresyonu olduğu için immünohistokimyasal olarak tanımlanamayacağından bahsedilmiştir<sup>1</sup>. Şekil 2.2’de ise bu üç hücrenin özellikleri şematize edilmiştir.

| <b>Fibroblast</b>                                   | <b>Myofibroblast</b>  | <b>Düz Kas</b>   |
|---|---|--|
| Düzensiz nükleer kontürler                          | Genelde düzensiz nükleer kontürler  | İrregüler nükleer kontürler  |
| İnce-füziform nükleus                               |   |  |
| İyi gelişmiş bir golgi zonu                         | İyi gelişmiş bir golgi zonu   |  |
| Granüler endoplazmik retikulum (sisterna oluşturan) | Granüler endoplazmik retikulum (sisterna oluşturan)   | Granüler endoplazmik retikulumdan fakir                                |
| Dağınık mitokondri                                  |   |  |
| Düzensiz plazma membranı                            | Düzensiz plazma membranı  | Küçük irregülerite   |
| Fibronektin yok                                     | Fibronektin   | Fibronektin yok  |
| Aktin yok   | Aktin   | Aktin  |
|   | Hücrenin uzun eksenine paralel intrasitoplazmik mikrofilament demetler                            | Hücrenin uzun eksenine paralel intrasitoplazmik mikrofilament demetler |
| Az sayıda sitoplazmik uzantı                        | Değişken (düz veya yıldızlı uzantılara sahip olabilir)  |  |
| Bağlantı plağı yok                                  | Bağlantı plağı mevcut   | Bağlantı plağı mevcut  |
| “dense body” yok                                    | Membran ile ilişkili çok sayıda “dense body”  | Membran ile ilişkili çok sayıda “dense body”                           |
| Hücreler arası bağlantı yok                         | Gap junction: düşük direnç alanı oluşturarak sinsityum halinde kasılmayı sağlar                   | Gap junction ve zonula adherens  |
| Hücre-stroma arası bağlantı yok                     | Fibronexüs: hücre matriks bağlantısı (fibronektin ile hücre içi mikrofilament demetleri arasında) | Daha az sayıda veya hiç fibronexüs                                     |
| Pinositik vezikül yok                               |   | Çok sayıda pinositik vezikül   |
| Vimentin+   | Vimentin+   | Vimentin-  |
| Desmin-   | Desmin-   | Desmin+++  |
| $\alpha$ -SMA -                                     | $\alpha$ -SMA +   | $\alpha$ -SMA +++  |
| Kollajen sekresyonu mevcut                          | Kollajen sekresyonu Mevcut  | Kollajen sekresyonu yok  |
| Kontraktilite yeteneği yok                          | Kontraktilite yeteneği mevcut   | Kontraktilite yeteneği mevcut  |

**Tablo 2.1.** Fibroblast, myofibroblast ve düz kas hücrelerinin ultrastrüktürel olarak ve fonksiyon ve immünohistokimyasal açılarından birbirleri ile kıyaslanması.

Literatürde yapılan araştırmalarda myofibroblastlar tanımlanırken farklı immünohistokimyasal kombinasyonlar kullanılmaktadır. Bu konu 2.5. bölümde ayrıntılı olarak verilmiştir. Eyden ve arkadaşları ise myofibroblastları tanımlarken şu



**Şekil 2.2.** Myofibroblastın düz kas ve fibroblast ile kıyaslanması (ilk panel). Kısaltmalar: AP, tutunma plağı; C, kollajen salgı granülü; FD, fokal yoğunluk; FF, fibronektin fibrili; FNX, fibroneksus; G, Golgi cisimi; L, lamina; M, myofilament demeti; N, nükleus; RER, kaba endoplazmik retikulum; SC, plazmalemmal caveola; SPL, subplazmalemmal lineer yoğunluk-fokal adezyon pm, plazmalemma. Fibroneksusun şematik olarak gösterilmesi (ikinci panel). Plak şeklinde membrandan doğru myofilamentler (mf) ve fibronektin filamentleri (ff) ile bağlantı kuruyor. 5 nolu (Eyden B: *The myofibroblast: phenotypic characterization as a prerequisite to understanding its functions in translational medicine. J Cell Mol Med 2008, 12:22-37*) referanstan direkt alıntıdır.)

kriterleri kullanmıştır:

- Düz ya da yıldızsı görünümde,
- Soluk eozinofilik sitoplazmalı,
- Çok miktarda sitoplazma içeren,
- Belirgin perisellüler matrikse sahip,
- Belirgin bir granüllü endoplazmik retikulumu olan,
- Kollajen granülleri üreten bir Golgi zonu barındıran,
- Komşu myofibroblastlara gap junction ile bağlanan,
- OB-kadherin içeren özelleşmiş tutturucu bağlantılar içeren,
- Çevre matrikse bazal lamina ile değil bir fibroneksus ile tutunan,

(Fibronexsus: Ekstrasellüler fibronektin filamanları ile myofibroblastı matrikse bağlayan adezyon yapısıdır; fibronektin filamanları hücreye paralel uzanır ve sonrasında myofibroblastın sitoplazmasına girer, fibrillerin hücre membranına girdiği yerde plak benzeri yapı oluşturur. Birbirine ve matrikse tutunmayı sağlayan bu adezyonlar, yara boyutunu azaltmaya yarayan güçlü kontraktıl bir ağ oluşmasını sağlar. Çevre matrikse bazal lamina aracılığı ile değil de fibronexsus aracılığı ile tutunması bu açıdan oldukça önemlidir.)

-Ayrıca immunhistokimyasal olarak da

- $\alpha$ -SMA pozitif,
- vimentin pozitif,
- düz kas olmayan miyozin pozitif,
- fibronektin pozitif,
- desmin için çok zayıf pozitif / genelde negatif,
- düz kas miyozin negatif,
- epitelyal belirteç (keratin) negatif,
- Smoothelin (terminal düz kas farklılaşma belirteci) negatif

immunprofiline sahip olan hücreleri myofibroblast olarak tanımlamıştır<sup>4</sup>.

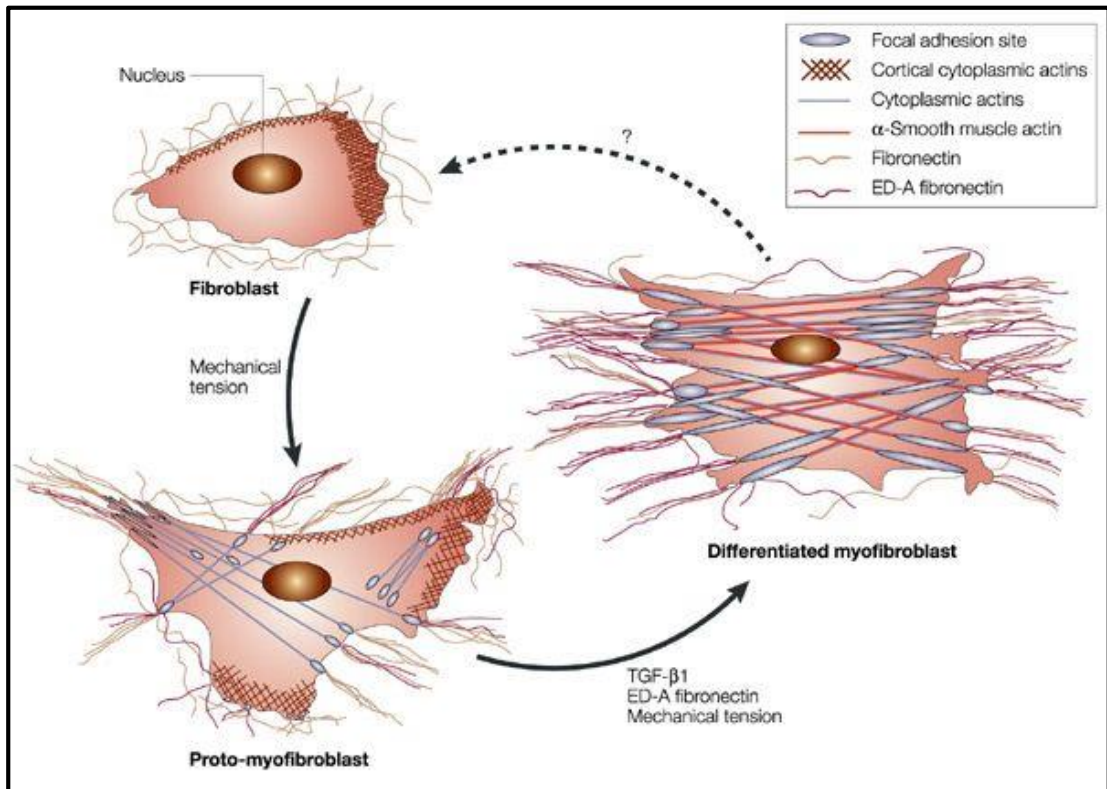
Bağırsakta bu hücreler epitelin hemen altında yer alırlar. Düz ve bazen yıldızlı uzantıları olabilir. İnce bağırsakta ve kolonda genel olarak benzer özellikler göstermektedirler. Ancak ince bağırsak villuslarının etrafını saran myofibroblastların zayıf desmin ekspresyonu nedeniyle bu hücrelerin perisit olabileceği speküle edilmiştir<sup>6</sup>. Kolondaki subepitelyal ve perikriptal myofibroblastların gerçek myofibroblast olduğu ve desmin negatif olduğu düşünülmektedir.

### **2.3. Kolonik subepitelyal ve perikriptal myofibroblastların kaynakları/köken aldıkları hücreler/orijinleri**

Myofibroblastların tanımlaması ve immunbelirteçlerle saptanması zor olan heterojen bir popülasyon olmasının sebebi; hücre içi iskelet proteinlerinin farklı olması yanı sıra myofibroblastların tek bir hücreden değil de çeşitli hücrelerden köken alabiliyor olmasıdır. Bochaton-Piallat ve arkadaşları myofibroblastların fenotipik bir

varyant olabileceğini ortaya sürerek “multiple” köken konusuna farklı bir yaklaşım getirmişlerdir<sup>12</sup>.

Myofibroblastlar ilk olarak yara iyileşmesi sürecinde tanımlanmıştır. İki aşamalı olarak gelişen bu süreçte, TGF- $\beta$  sinyali ile dokuda sessiz şekilde bekleyen  $\alpha$ -SMA negatif fibroblastlardan, ortamda ED-a splicing varyant fibronektin bulunması şartı ve mekanik stres varlığında ilk önce  $\alpha$ -SMA pozitif protomyofibroblastlar oluşur<sup>13</sup> (Şekil 2.3). İkinci adımda ise  $\alpha$ -SMA pozitif myofibroblasta dönüşüm gerçekleşir ki bu bir çeşit aktivasyon olduğu için myofibroblastlara “aktive fibroblast” da denilmektedir<sup>14</sup>.



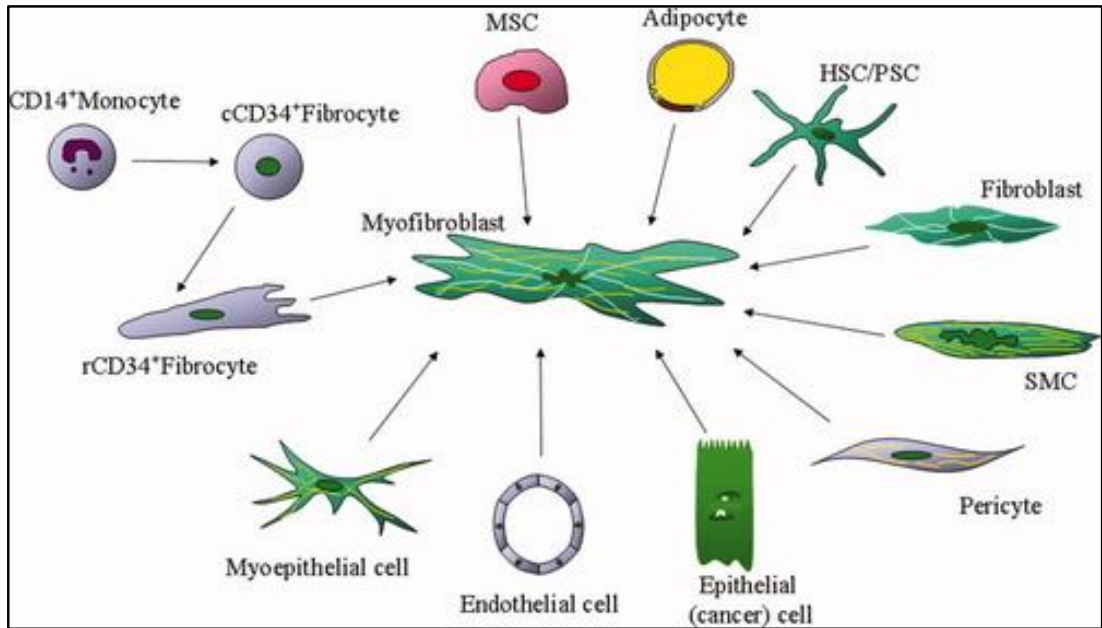
**Şekil 2.3.** İki aşamalı myofibroblast oluşumu. 1 nolu (Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA: *Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. Nat Rev Mol Cell Biol* 2002, 3:349-63) referanstan direkt alıntıdır.

Embriyogenezde iki görüş mevcuttur: İlki nöral krestin SEİMF’lerin olası kaynağı olduğudur<sup>15</sup>. Diğer görüş ise 11. günde serozal mezotelyal hücrelerin epitelyal-mezenkimal geçişi ile lamina propria mezenkimal hücrelerinin, özellikle myofibroblastlar ve perisitlerin aynı kökenden oluştuğu yönündedir<sup>16</sup>.

Erişkinde myofibroblastların oluşumu kemik iliği kaynaklı veya kemik iliği dışı kaynaklı olmak üzere iki başlıkta inceleyebiliriz (Şekil 2.4).

Kemik iliği dışı kökenli myofibroblast oluşumunda son zamanlarda epitelden mezenkime dönüşüm (EMT: Epithelial-to-Mesenchymal Transition) ile myofibroblastların oluştuğu gösterilmiştir<sup>7</sup>.

Ayrıca benzer şekilde endotelden mezenkime dönüşümde (ENMT: Endothelial-to-Mesenchymal Transition) ilk olarak kalp embriyogenezinde CD31 ifadesinin kaybı ve  $\alpha$ -SMA, fibronektin ile FSP-1 ekspresyon artışı gösterilerek; myofibroblastların bir diğer kaynağı olduğu kanıtlanmıştır<sup>8</sup>.

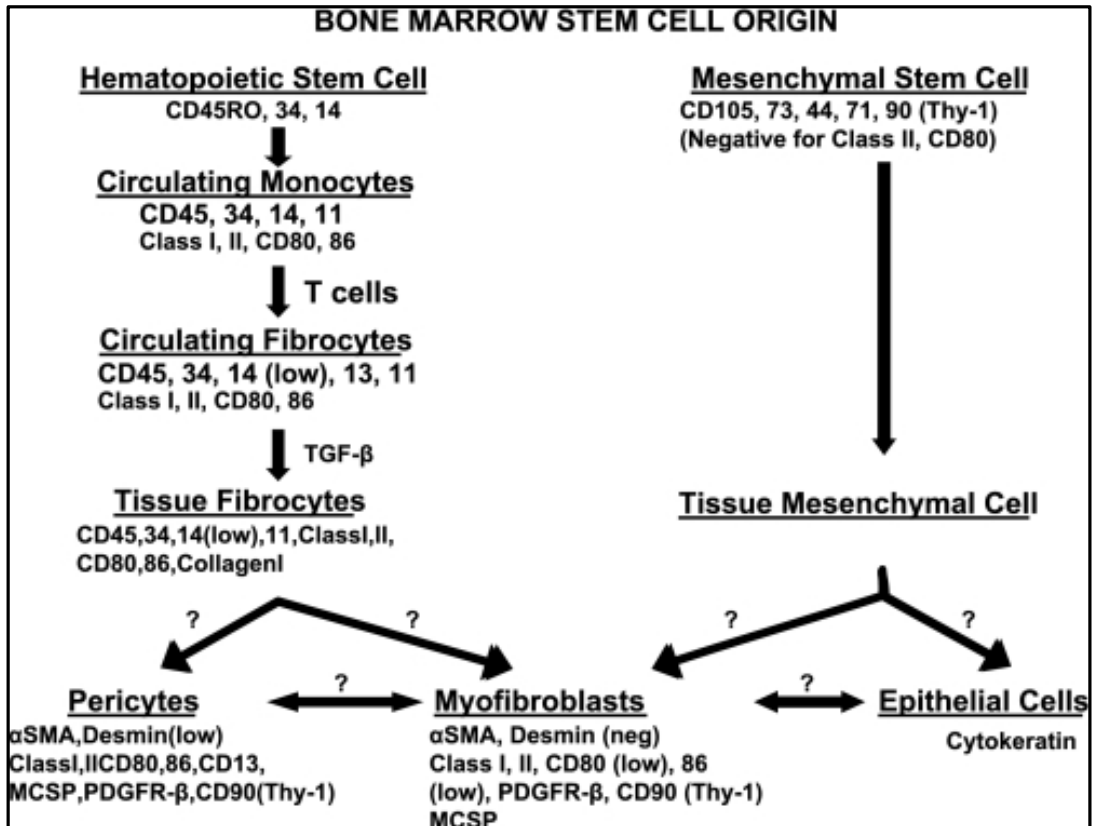


**Şekil 2.4.** Myofibroblastların kökenleri. Kısaltmalar: MSC, mezenkimal kök hücre; C, dolaşımdaki hücre; HSC, hepatik stellat hücreleri; PSC, pankreas yıldız hücreleri; R, yerleşik; SMC, düz kas hücresi. 8 nolu (De Wever O, Demetter P, Mareel M, Bracke M: *Stromal myofibroblasts are drivers of invasive cancer growth. Int J Cancer 2008, 123:2229-38*) referanstan direkt alıntıdır.

Gabbiani'nin derleme makalesinde bahsettiği üzere düz kas hücrelerinden diferansiyasyonla düz kas belirteçlerinin kaybı ile de myofibroblasta dönüşüm mümkündür<sup>7</sup>. Dokudaki diğer mezenkimal hücrelerin (adiposit vb.) ve mezenkimal kök hücrelerin (MSC: mesenchymal stem cell) myofibroblast kaynağı olduğu bilinmektedir<sup>6</sup>. Mezenkimal kök hücreler CD45, CD34, CD80 ve CD86 negatiftirler yani hematopoetik belirteçler ya da antigen sunan hücrelerde yer alan moleküller eksprese etmezler.

Kemik iliği kökenli myofibroblast oluşumunda CD14 pozitif monositlerden köken alan CD34 pozitif fibrositler (CD34+, CD45+, CD80+, CD86, MHC class II ve  $\alpha$ -

SMA pozitif kemik iliği kaynaklı fibrositler) (Şekil 2.5'te şematize edilmiştir) rol oynamaktadır. Kemik iliği kökeni; dişi fareye transplante edilen erkek fare kemik iliği deneyinde, transplantasyon sonrasında *in situ* hibridizasyon yöntemi ile Y kromozomunun SEİMF'larda gösterilmesi ile kanıtlanmıştır<sup>17</sup>. Özellikle deneysel kolit durumunda transplantasyondan 1 hafta sonra SEİMF'ların %75'inin kemik iliği kökenli olduğu gösterilmiştir<sup>17</sup>.



**Şekil 2.5.** Bağırsak mezenkimal-stromal hücrelerin kemik iliği kök hücre orijini. Diyagram, olası kök hücre orijini ve lamina propria mezenkimal hücrelerin (ve epitel hücrelerin) kemik iliği öncülerinden türeme yollarını göstermektedir. 7 nolu (Mifflin RC, Pinchuk IV, Saada JI, Powell DW: *Intestinal myofibroblasts: targets for stem cell therapy. American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 2011, 300:G684-96) referanstan direkt alıntıdır.

Notch1'in; perisitlerdeki PDGFR  $\beta$  ifadesini artırarak perisitlerin endotelden interstisyuma migrasyonuna ve myofibroblasta transizyonuna (PMT: perisit-myofibroblast transizyonu) sebep olduğu bilinmektedir. Renal fibrozis ve akciğer fibrozisinin tedavisinde Notch1/PDGFR  $\beta$  yolağı aşırı aktivasyonunu önlemek için Notch1 inhibisyonu umut vaat eden bir tedavi yaklaşımıdır<sup>18</sup>.

## 2.4. Kolonik subepitelyal ve perikriptal myofibroblastların görevleri

### 2.4.1. İntestinal epitel hücrelerinin büyümesinin desteklenmesi

İn vitro kültürlerde herhangi bir mezenkimal niş olmaksızın, ISC (“intestinal stem cell”)’den enterosite farklılaşmayı mümkün kılan bazı egzogen büyüme faktörleri mevcuttur. Bunlardan birisi Wnt agonisti olan R-spondin 1’dir. Lgr5 pozitif kök hücreleri ile yapılan in vitro deneylerde, egzogen R-spondin 1 sayesinde, kript villus ünitlerinin kendi kendini düzenlediği ve kök hücre nişinden bağımsız organoid oluşturabildiği sonucuna varılmıştır<sup>19</sup>.

İn vitro olarak farelerden elde edilen SEİMF varlığı ve yokluğunda insan bağırsak epitel kültürleri incelenmiş ve bu mezenkimal katmanın epitelin büyümesinde rol aldığı ve besleyici görevi olduğu sonucuna varılmıştır. SEİMF yokluğunda epitel canlılığı 2-3 gün iken; SEİMF varlığında 60 güne kadar çıkmıştır. Ayrıca CDX2 immunhistokimyasal boyaması ile belirginleşen organoid-enteroid oluşumu da dikkat çekicidir. İn vivo deneylerde de benzer bulgular mevcuttur. İmmunbaskılanmış farelerin cilt altı dokusuna, SEİMF ile 10 gün birlikte kültüre edilmiş insan bağırsak epiteli enjekte edilmiştir. 28 gün sonra bu alan incelendiğinde herhangi ek büyüme faktörü olmadığı halde in vitro deneydeki ile benzer morfolojik özellikler sergileyen ve yine immunohistokimyasal olarak da doğrulanan enteroid oluşumu görülmüştür<sup>20</sup>.

SEİMF’lar heterojen bir grup olup; yetişkinlerde non-supportif, yenidoğan döneminde ise supportif olduğu yönünde bulgular mevcuttur. Hem yenidoğan hem de erişkin fareden supportif ve nonsupportif SEİMF’lar izole edilerek karşılaştırılmış ve supportif SEİMF’ların qPCR ile R-spondin 1 yüksek ekspresyonu gösterilmiştir. Non-supportif SEİMF popülasyonları, R-spondinlerin ekspresyonunu azaltmıştır. Clevers ve ekibinin<sup>19</sup> tanımladığı Lgr5 kök hücrelerde egzogen Wnt agonisti olan R-spondin 1 desteği ile kript ve villus yapısının oluşmasına karşılık bu çalışmada da egzogen katkı olmaksızın supportif SEİMF lar sayesinde (ki bu hücrelerdeki R-spondin 1 yüksek ifadesi de gösterilmiş) epitel büyümesi desteklenmiştir<sup>21</sup>. Ayrıca intestinal hasar durumlarında intestinal mukozanın tamirinde önemli olduğu düşünülen bu hücreler kök hücre tedavisinde de umut olmaktadır<sup>6</sup>.



#### 2.4.2. Otoimmunité ve inflamatuvar bağırsak hastalıkları

İnflamatuvar bağırsak hastalıkları özellikle gelişmekte olan ÷lkelerde sık olan ve henüz geri dönüşümlü aşamada iken tanısai yöntemi olmayan artmış myofibroblast sayısı ve ekstraselüler matriks üretimi, skarlaşma ve fibrozis ile giden hastalıklardır. Fibroziste mezenkimdeki bir çok hücre myofibroblast kaynağı olduğu için dolaylı olarak rol oynamaktadır. Fibroziste ana mekanizma myofibroblast artışı ve fibronektin, N-kaderin gibi araçlarla migrasyon sonucu fibrozis olsa da EMT (epitel-mezenkimal transizyon) aracılı migrasyon da önem arz etmektedir. IL13 ve TGF- $\beta$  upregulasyonu sonucu nükleer  $\beta$ -katenin birikimi EMT aracılı striktür gelişiminden sorumludur. TGF- $\beta$  sinyal yolağındaki defekt ve SMAD seviyelerindeki düşme olası bir terapötik hedefdir. Sağlıklı kolon mukozasında FAP (Fibroblast activation protein) yok iken İBH'lı kolektomi spesmenlerinde yüksek ekspresyonu mevcuttur. FAP inhibisyonu yapan ilaçlar ile ex vivo olarak tip I kollajen ve TIMP üretiminde anlamlı derecede azalma ve ekstraselüler matriksin yeniden düzenlenmesini sağlamış olup yeni nesil tedaviler açısından umut vaat etmektedir<sup>22</sup>. Günümüzde anti-TNF tedavileri ile kolektomi yaşı ertenebilse de patogeneizde önemli hücreler, sitokinler ve reseptörler (PPAR- $\gamma$  agonistleri, anti-VEGF monoklonal antikolar vb) küratif tedavi açısından araştırılmaktadır<sup>23</sup>.

TL1A (TNF like cytokine 1A) ve TL1A reseptörleri olarak bilinen DR3 (death-domain receptor 3) ile DcR3 (decoy receptor 3) deneysel inflamatuvar bağırsak hastalığı modellerinde önemlidir. Fibrozis başladıktan sonra medikal ajanlarla kür olması günümüz şartlarında mümkün olmamakla birlikte son zamanlarda yapılan araştırmalarda TL1A-DR3 sinyal inhibisyonu yapan monoklonal TL 1a sayesinde bağırsak fibrozisinin engellenmesi yanı sıra fibroblast ve myofibroblast azalması gözlemlenmiştir<sup>24</sup>. Bu konu üzerinde epitel-mezenkim arasındaki karşılıklı sinyalleşmeyi aydınlatmak isteyen bir diğer çalışmada ise proinflamatuvar (IL-1a ve TNF- $\alpha$ ) sitokinleri ile uyarılan SEİMF'lardaki TL1A ekspresyonun arttığı, bunun reseptörlerinin epitelde artması ve epitelde IL8 ekspresyon artışı kanıtlanmıştır<sup>25</sup>. Bu sinyal yolağının tersi de incelenmiş ve proinflamatuvar sitokinlerin varlığında epitelde

salınan soluble faktörler sonucunda SEİMF'lardaki TL1A ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir<sup>25</sup>.

Th-17 hücreleri tarafından sentezlenen IL-17'nin (normal bireylerin kolonlarında IL-17 ekspresyonu yoktur) SEİMF'larda MAP kinaz aktivasyonu ve IL-6, IL-8 ve MCP sekresyonu ile otoimmün ve inflamatuvar hastalıkların patogenezinde rol aldığı bilinmektedir<sup>26</sup>.

Crohn hastaları ve kontrol grup ile yapılan çalışmalarda intestinal myofibroblastların TAK1 sinyali artımı ve fibroziste rol oynadıkları gösterilmiştir. Bu hücrelerin ve TAK1 inhibisyonunun tedavide yeri olabilir. Bu yaklaşımın uygulandığı fare deneylerinde Col1a1 gen ekspresyonu ve proteini azalmıştır<sup>27</sup>.

IL-10 sitokin ailesinin bir üyesi olan IL26; daha önceden tanımlanmış CD4+ TH17 hücrelerinden salınır. IL26 mRNA'sı ve protein ekspresyonu IBH'larında artmış bulunmuş olup SEİMF'ların IL26 reseptör kompleksi eksprese ederek hastalığın patogenezinde rol aldığı gösterilmiştir<sup>28</sup>.

CD90+ myofibroblast / fibroblast hücreleri profesyonel olmayan antijen sunan hücreler olup Treg hücreleri aracılı periferel immun toleransın düzenlenmesinde görev alırlar<sup>29</sup>. Sağlıklı, Ülseratif kolitli ve Crohn hastalıklı bireylerden elde edilen SEİMF'ların T helper 1 hücreleri ile kokültürlerinde PDL1 ekspresyonu değişkenliği gözlenmiştir. ÜK'te PDL1 artışı ile immunsupresyon olurken; Crohn hastalığında PDL1 kaybı bulunmuş ve ileride bu iki hastalık ayırımında PDL1 ekspresyonunun yardımcı olarak kullanabileceği, terapötik hedef için aday olması yanı sıra her iki inflamatuvar bağırsak hastalığında da immun toleransın düzenlenmesinde SEİMF'ların önemli olduğu vurgulanmıştır<sup>30</sup>.

#### **2.4.3. Mekanik bariyer, mekanosensör ve villus hareketi**

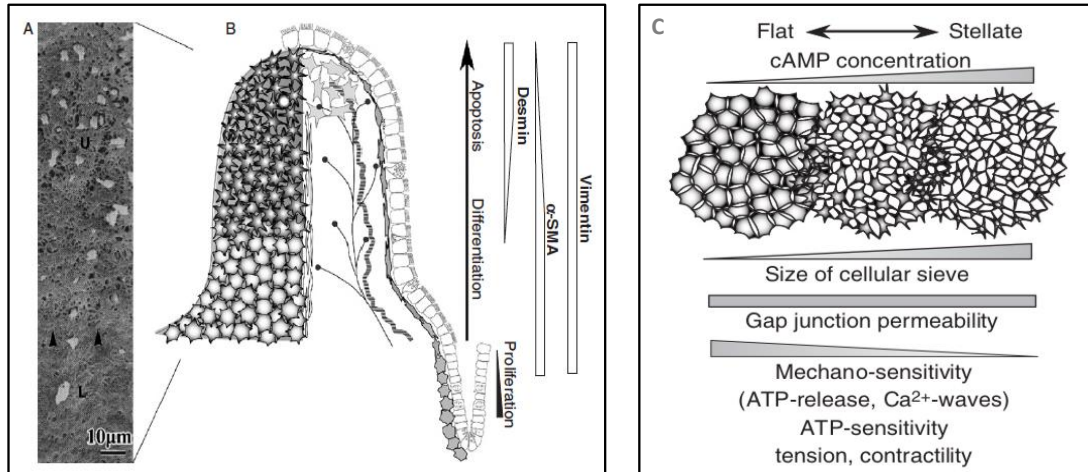
SEİMF'lar uzun zamandır sanıldığı gibi aksine sadece epitel altında mekanik bir bariyer ya da bir iskelet değildir. Bazal membran maddelerini, sitokinleri büyüme faktörlerini salgırlar. Hızlı hücre şekil değişikliği ve kontraksiyon yeteneği sayesinde SEİMF'ların oluşturdukları ağ, mekanik sensor ve sinyal iletim mekanizmasında düzenleyicidir.

Taşikinler (Substans P); peristaltizm, damar geçirgenliği, su-elektrolit

taşınması, nosiseptif bilgi aktarımı ve immün hücrelerin aktivasyonu dahil olmak üzere çeşitli fizyolojik ve patofizyolojik bağırsak fonksiyonlarını düzenleyen bir nörotransmitter grubu olup resöptörleri NK1R'dir<sup>31</sup>.

Bağırsak hareketlerinin düzenlenmesinde bir diğer önemli madde enterokromafin hücrelerden salınan serotonin olup; hem düz kasta hem sinir uçlarında çok çeşitli reseptörleri (5HT1, 5HT2 gibi) bulunmaktadır ve günümüzde antiemetik ya da peristaltizmi düzenleyen ilaçların temelini oluşturmaktadır.

SEİMF'lar, hücre içi cAMP seviyesine bağlı olarak yıldızsı veya düz hücre şekilleri arasında hızlı şekil değiştirme yeteneğine sahiptir. Dibutiril siklik adenosin monofosfat (dBcAMP), forskolin veya kolera toksinin ilavesi ile düz şekilden yıldızsı şekle dönerken; endotelinler (ET'ler) veya serum ilavesiyle düz şekline döner. Bu şekil değişikliği esnasında gap junctionlar arası geçirgenlik değişmez (Şekil 2.6'da özetlenmiştir).

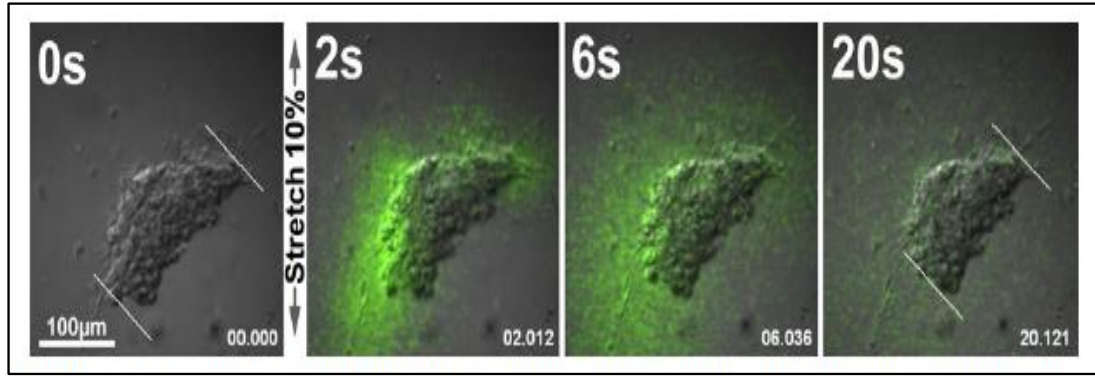


**Şekil 2.6.** A) Epitel ve bağ dokusu bileşenlerinin çıkarılmasından sonra bir villusun bir elektron mikroskopik görüntüsü. Üstte (U), çok sayıda ince dallara sahip yıldızsı hücreler, elek benzeri bir ağ oluştururlar. Altta (L) geniş uzantılara sahip düz hücreler. B) Bir villusta subepitelyal fibroblastların şematik gösterimi. Kriptta subepitelyal fibroblastlar çoğalır ve postmitotik hücreler epilyal hücrelerle yaklaşık olarak senkronize olarak villusun üst kısmına taşınır. Vimentin,  $\alpha$ -SMA ve desmin ekspresyonu villus aksınca değişir. C) Hücre şekillerinin subepitelyal fibroblast ağlarının özelliklerini nasıl etkilediğinin özeti. 36 nolu (Furuya S, Furuya K: *Subepithelial fibroblasts in intestinal villi: roles in intercellular communication. Int Rev Cytol* 2007, 264:165-223) referanstan alıntıdır.

Hücre şekli değişikliği sayesinde SEİMF'lar mekanik sensitivitelerini düzenlerler. Mekanosensitiviteleri de düz şekilde iken yüksek, yıldızsı durumda iken

düşüktür. Ayrıca villusun üst kısmında daha çok olmak üzere fenestralı bazal membran izlenir ve bu hücre şekil değişimi ile hücreler arası yarık büyüklüğü ve besin-su alışverişi kontrol edilir.

Yapılan araştırmalarda SEİMF'larda NK1R (substans P reseptörü), endotelin A reseptörleri (ETAR'lar)<sup>32</sup>, Angiotensin II reseptör (AT2) ve ATP reseptör (P2Y1)lerinin<sup>32</sup> varlığı kanıtlanmıştır. Ayrıca SEİMF'lar villusu uyaran (kolinerjik-kolinerjik olmayan sekretomotor-vazodilatör nöronlar, duyuşal nöronlar: submukozal intrinsik primer afferent nöronlar, ekstrinsik primer aferent nöronlar) çeşitli sinir uçları ile sinaps-benzeri oluşum yapar<sup>33, 34</sup>.

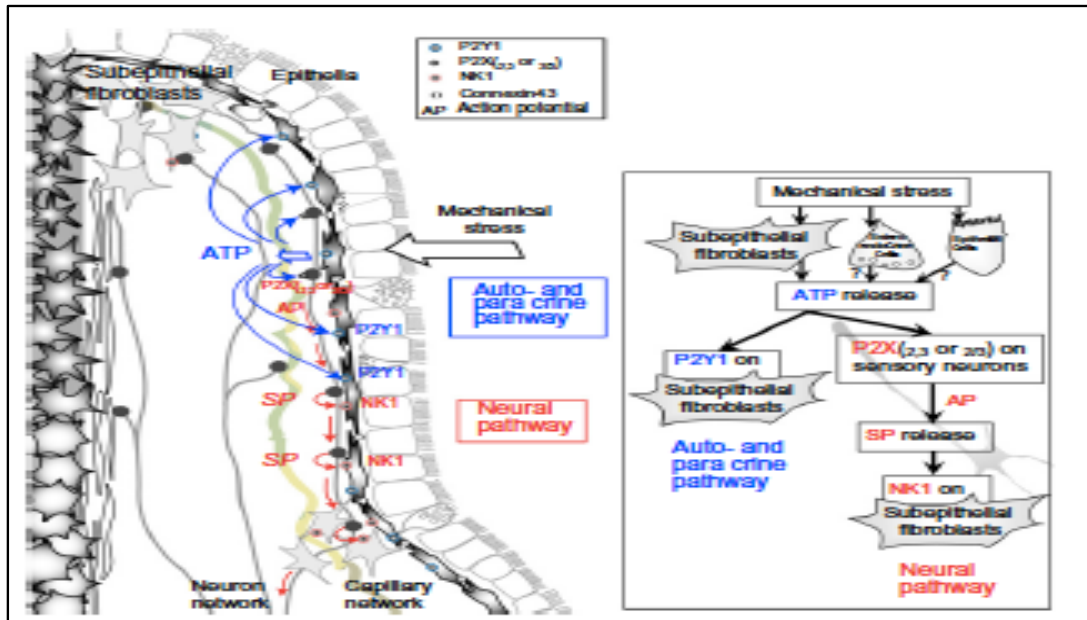


**Şekil 2.7.** Epitelden yoksun villusta mekanik uyarı sonucunda ATP salınımı (Luminescence Luciferine-Luciferase) sonrası 20. saniyedeki görüntüde villus kontraksiyonu. 35 nolu (*Furuya S, Furuya K: Roles of substance P and ATP in the subepithelial fibroblasts of rat intestinal villi. Int Rev Cell Mol Biol 2013, 304:133-89*) referanstan alıntıdır.

Epitelden yoksun ancak villusun diğer tüm bileşenlerini içeren bir deney düzeneğinde yapılan incelemelerde SEİMF'lardan mekanik uyarılara (dokunma ve germe) cevaben ATP salındığı bulunmuştur<sup>35</sup> (Şekil 2.7). Oluşan ATP bulutu ile yakın çevredeki SEİMF'lar üzerindeki P2Y1 reseptörleri üzerinden ve sinaps benzeri yapılar sayesinde de sinir uçlarındaki P2X1 reseptörleri üzerinden etkileşim gerçekleşir. Hücre içi cAMP değişimi ile şekil değişikliği yanısıra; etkilenen sinir uçlarından salınan Substans P'nin NK1R reseptörüne bağlanması ile Ca aracılı kasılma başlatılmış olur. Bu deneylerin epitel yoksun olması nedeniyle kasılmayı başlatan ATP'nin SEİMF olduğu kanıtlanmış olmakla birlikte epitel kaynaklı ATP'nin hücre dışı ortamda bulunan ATP'azlar nedeni ile etkin konsantrasyona ulaşamayacağı da bir başka destekleyici unsurdur. Bu çalışmalar sadece kültür çalışmaları ile değil uzaysal ve

zamansal incelemeye olanak sağlayan “Luciferin-Luciferase Bioluminescence” ortamlarında yapılmış ve SEİMF’ların mekanosensör olduğu doğrulanmıştır<sup>36</sup>(Şekil 2.7 ve Şekil 2.8).

Ayrıca SEİMF’ların P2X reseptörleri üzerinden serotonin salınımı kontrol ettiği düşünülmektedir. Bir başka konu da SEİMF’ların villus iskeletindeki damar yapılarını sardığı ve SEİMF’ların kasılması ya da şekil değişikliği ile vasküler geçirgeniliğin düzenlenmesinde görevli olduklarıdır. Ayrıca Substans P ile indüklenmiş SEİMF’lar TGF- $\beta$  salınımı ile epitel migrasyonunu da kontrol edebilmektedir. P2X2 ve P2X3 nakavt farelerde, intralüminal basınca bağlı peristalsizm inhibisyonu ve aganglionik farelerde NK1R yoğunluğunun artışı SEİMF’ların peristaltizmdeki önemini vurgulamaktadır<sup>36</sup>.

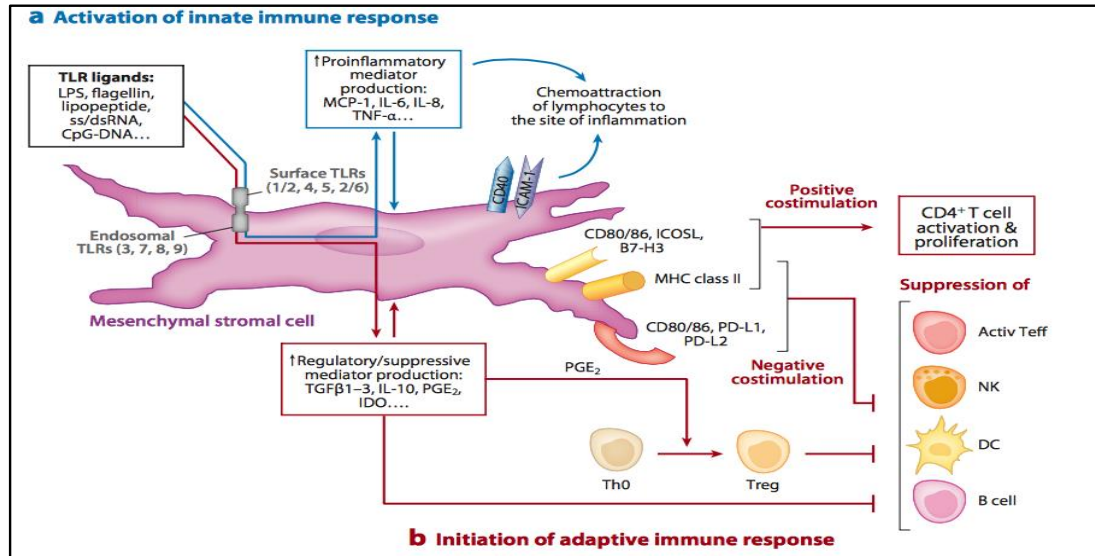


**Şekil 2.8.** ATP salınımının myofibroblastlar üzerine etkisi ve Substans P aracılı olarak sinaps benzeri varikositeleri etkilemesi. 35 nolu (Furuya S, Furuya K: Roles of substance P and ATP in the subepithelial fibroblasts of rat intestinal villi. *Int Rev Cell Mol Biol* 2013, 304:133-89) referanstan alıntıdır.

#### 2.4.4. Antijen sunumu, doğal-kazanılmış bağışıklık ve immun tolerans

Doğal bağışıklığın başlıca bileşenleri bariyer fonksiyonu gösteren epitel, fagositozu kolaylaştıran lektin ve TLR’ler, stromada hali hazırda bekleyen monosit makrofaj grubu hücreler ve NK hücreleri yanı sıra SEİMF’lardır. Epitel altı bazal membran özellikle villusun üst kısmında fenestralıdır. Bu açıklıktan içeri giren antijenle ilk karşılaşacak olan hücrelerin SEİMF’lar olduğu düşünüldüğünde; TLR’leri

barındırdığı sonucuna varılmış ve bu hücrelerin doğal bağışıklıkta görevli olduğu kanıtlanmıştır<sup>37</sup>.



**Şekil 2.9.** Doğal ve adaptif immünite arasındaki bağ olarak mezenkimal stromal hücreler. a) Stromal hücreler, TLR (Toll-like receptor) 'lerin ekspresyonu yoluyla doğal immüniteye katılır. b) Kazanılmış bağışıklık, MHC sınıf II molekülleri ve B7-pozitif veya B7-negatif kostimulatörler aracılığıyla başlatılır. 4 nolu (Powell DW, Pinchuk IV, Saada JI, Chen X, Mifflin RC: *Mesenchymal cells of the intestinal lamina propria*. *Annu Rev Physiol* 2011, 73:213-37) referanstan direkt alıntıdır.

SEİMF'ların sadece doğal bağışıklıkta değil aynı zamanda kazanılmış bağışıklıkta da görevleri olduğu son zamanlarda bulunmuştur (Şekil 2.9). SEİMF'lar mezenkimde yer alan inflamatuvar hücreler ve profesyonel antijen sunan hücreler ile yakın temasta kalmayıp; kendileri de MHC class II, CD80/86 kostimulatuar molekülleri eksprese ederek antijen sunabilmektedir<sup>38, 39</sup>. Bu çalışmada kolonik myofibroblastlar; hem lokalizasyonları ile hem de immunhistokimyasal olarak CD90 ve α-SMA ile pozitif olmaları ve diğer antijen sunan hücre belirteçlerinden (CD11c: dendritik hücre belirteci, CD68: makrofaj belirteci) yoksun olmaları ile tanımlanmıştır. Bilindiği üzere CD80; CD28 ile etkileşerek immun yanıtı uyarabilir (CD4<sup>+</sup> T hücrelerinin sitotoksik T kenfositlere dönüşmesi, makrofaj aktivasyonu, proinflamatuvar sitokin salınımı) ya da CTLA4 ile etkileşerek immunsistemi baskılayabilir (otoantijenlere karşı tolerans). MHC class II ve CD80/86 ekspresyonu (özellikle IFN gama sonrası eksprese olduğu bildirilmiştir<sup>39</sup>) antijen sunumu ve immünite için önemli ve gereklidir. Ancak

mezenkimde bir çok antijen sunan hücre olmasına karşın SEİMF'ların lokal immunitede ayrı bir öneminin olması onların stratejik lokalizasyonudur<sup>38</sup>.

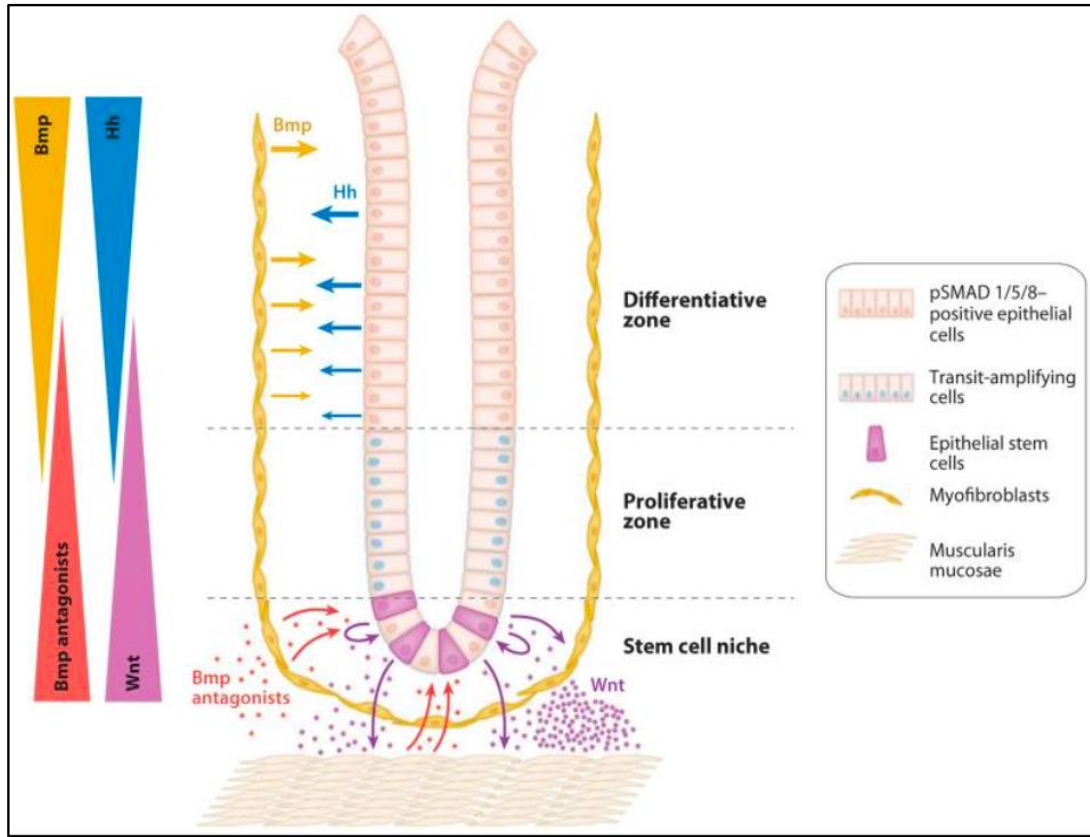
İmmun sistemi baskıladıklarını açıklayan bir diğer çalışma ise son zamanlarda özellikle tümör hücrelerinin konak immunsisteminden kaçış mekanizması olarak kullandığı bilinen PDL1 ve PDL2 ekspresyonlarının SEİMF'larda da mevcut olduğu üzerinedir<sup>40</sup>. SEİMF'larda hem PDL1 hem de PDL2 ekspresyonu sayesinde IL-2 üretiminin inhibisyonu ile T hücrelerinin baskılandığı gösterilmiştir (Kokültürlere egzogen IL-2 ilavesi ile T hücre proliferasyonunda parsiyel "recovery" olması bu hipotezi destekliyor). Mukozal toleransta CD4+ T hücre proliferasyonunun sınırlandırılmasında SEİMF'ların önemli olduğu kanıtlanmıştır<sup>40</sup>.

#### **2.4.5. Doku morfogenezi, kök hücrenin uygun yere yerleşmesi ve epitel mezenkim arası karşılıklı konuşma**

Bağırsak morfogenezinde epitel-mezenkim ya da bir başka deyişle endoderm-mezoderm arasındaki karşılıklı sinyalleşme ("bidirectional" veya "crosstalk") önemlidir (Şekil 2.10). Genel olarak sinyal yolları ve bağırsakta bu yolları en küçük birim olan villus kript ünitesinde inceleyecek olursak; öncelikle intestinal kök hücre nişi, proliferasyon zonu ve diferansiyasyon zonu olarak ve bu kompartmanlar arasında değişen gradientte Wnt, BMP ve Hh sinyalleri olduğunu özetleyebiliriz<sup>3</sup>.

SEİMF'lar; rejenerasyon ve normal kolon gelişiminde önemli olan "intestinal kök hücre nişi" olarak isimlendirilen oluşumun yapıtaşı hatta sınırlayıcısı ve mekânsal olarak belirleyicisidir. İntestinal kök hücre nişinin diğer komponentleri ise komşu epitelyal hücreler, Paneth hücreleri, mezenkimal hücreler, bazal membran ve bu hücrelerden salınan sitokinler, büyüme faktörleridir<sup>3</sup>.

Wnt sinyal yolağı (faredeki İnt-1 protoonkogeni ve "Drosophila"daki wingless geninin fonksiyon benzerliği göstermesi ve homolog olduğunun bulunması ile bu iki genin isimlerinin birleşimi sonucu bu ismi almıştır) bağırsakta özellikle kök hücre nişi ve proliferasyon zonunda baskındır. Epitel proliferasyonunda rol oynamaktadır. Wnt sinyalinin ana antagonisti Bmp sinyal yolağıdır. Wnt sinyal yolağı kanonikal ve kanonikal olmayan olmak üzere iki çeşittir. Kanonikal olmayan Wnt sinyal yolağı PCP (Planar Cell polarity) ve Ca<sup>2+</sup> yollarıdır.



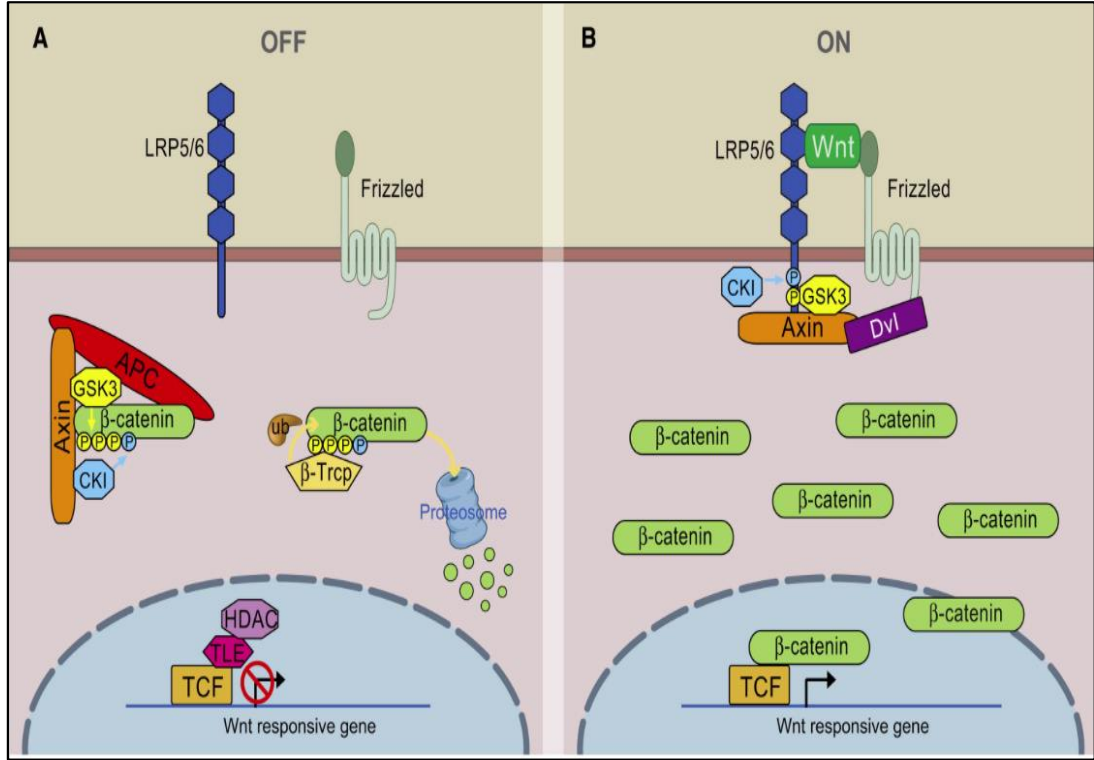
**Şekil 2.10.** Epitelyal-mezenkimal etkileşimler: hedgehog (Hh), bone morphogenetic protein (Bmp), ve Wnt sinyallerini içerir. 4 nolu (Powell DW, Pinchuk IV, Saada JI, Chen X, Mifflin RC: *Mesenchymal cells of the intestinal lamina propria*. *Annu Rev Physiol* 2011, 73:213-37) referanstan direkt alıntıdır.

Wnt/PCP (non-canonical Wnt ya da  $\beta$ -catenin bağımsız yolağın ilki) hücre adezyonundan sorumlu gen transkripsiyonunu düzenleyen ve hücre iskeletini etkileyen bir yolak olmakla birlikte ara basamaklarında Rho (Ras homolog gene family member A), RAC (Ras related C3 botulinium toxin substrate) ve Cdc42 (cell division control protein 42) yer almaktadır. Bu yolağın reseptörü Fz (Frizzled)'dir. Kanonik olmayan yani  $\beta$ -catenin bağımsız diğer yolak ise kalsiyum yolağıdır. Bu yolakta Wnt sinyali hem Fz hem de RYK ve ROR reseptörlerini kullanabilir. Hücre içi  $Ca^{+2}$  artışı ile Wnt/  $\beta$ -catenin yolağı inhibe olur<sup>41</sup>.

Kanonik Wnt yani Wnt/ $\beta$ -catenin sinyal yolağının ana düzenleyicisi hücre içi ve nükleer  $\beta$ -catenin artımıdır.  $\beta$ -catenin hücre içi seviyesinin kontrolü  $\beta$ -catenin yıkım kompleksi (APC, AXIN) sayesinde fosforile  $\beta$ -catenin'in; ubikutinlerce işaretlenmesi ve proteazomlarda yıkılması ile sonuçlanır. Wnt sinyali Fz reseptörüne bağlandığında ise yıkım kompleksi membrana yaklaşır ve sitoplazmik  $\beta$ -catenin yıkım



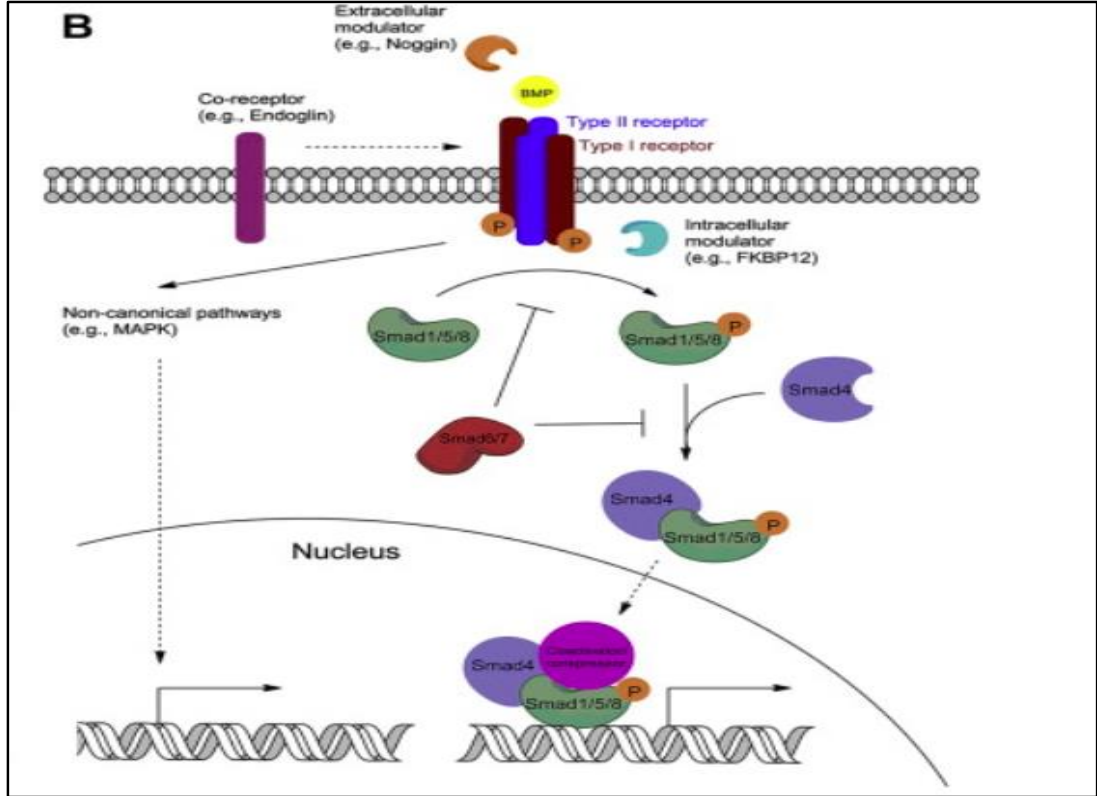
kompleksinden kurtulmuş olur<sup>42</sup>. Beta-catenin fosforlanmadığı için yıkılmaz yani sitoplazmada stabilize formda bulunur. Hücre içinde ve nükleusta birikerek hedef genlerin (TCF4; T-hücre faktör-4 transkripsiyon faktörüne bağlanması sonucunda Wnt/TCF4 hedef genlerinin transkripsiyonunda artış) sentezine yol açar<sup>42</sup> (Şekil 2.11).



**Şekil 2.11.** Kanonik Wnt yolağı. A) Wnt yokluğunda, sitoplazmik β-katenin Axin, APC, GSK3 ve CK1 ile bir kompleks oluşturur ve CK1 (mavi) ve ardından GSK3 (sarı) ile fosforile edilir. Fosforile edilmiş β-katenin, proteozomlarda ubikuitin aracılı yıkılır. B) Wnt ligandının varlığında, Fz ve LRP5 / 6 arasında bir reseptör kompleksi oluşur. Fz ile Dvl alımı LRP5 / 6 fosforilasyonuna ve Axini membrana çeker ve yıkım kompleksi oluşamaz bu da β-katenin, TCF'nin Wnt duyarlı genleri aktive etmesi için bir ortak aktivatör olarak görev yaptığı çekirdek içinde birikmesine izin verir. 42 nolu (*Wnt/β-Catenin Signaling: Components, Mechanisms, and Diseases*) referanstan direkt alıntıdır.

İntestinal Wnt sinyal molekülünün hücresel kaynağına bakacak olursak; kanonik Wnt'ler (Wnt 3, 6, 9b) epitelyal hücreler tarafından üretilir. Kanonik olmayan Wnt'ler (Wnt 2b, 4, 5a, 5b) ve Wnt antagonistleri (SFRP-1, Dkk-3) mezenkimden kaynaklanır. Buradan çıkarılacak sonuçlardan birisi; mezenkimal hücrelerin görevinin intestinal kök hücreler veya progenitörlerde Wnt/β-catenin sinyallerini kısıtlamak ve olgun intestinal epitelyal hücrelerde bu kritik yolağın anormal aktivitesini engellemek olduğudur.

Paneth hücreleri, kanonik Wnt molekülünün diğer bir kaynağıdır. Kök hücelere konumsal yakınlığı, intestinal kök hücre nişinde yer alması ve Paneth hücre farklılaşmasının sağlanmasında Wnt sinyal yolağının etkin olduğunu biliyoruz.



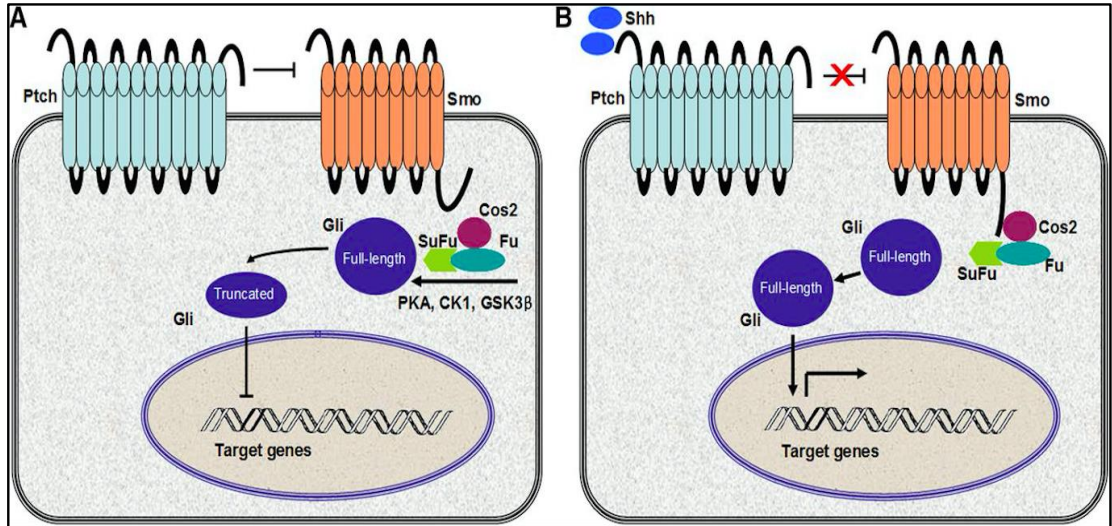
**Şekil 2.12.** Kanonik BMP yolağında (SMAD bağımlı), BMP'ler, tip I veya tip II serin / treonin kinaz reseptörlerine bağlanarak ve bir heterotetramerik kompleks oluşturarak sinyal iletim kaskadı başlatırlar. Yapısal olarak aktif tip II reseptörü daha sonra tip I reseptörünü fosforile eder ve tip I reseptörü R-Smads'ı fosforile eder (Smad1 / 5/8). Fosforile edilmiş Smad1 / 5/8, ko-Smad (Smad4) ile birleşir ve gen ekspresyonunu düzenlemek için koaktivatörler veya koruyucularla çekirdeğe yer değiştirir. MAPK kaskadı dahil olmak üzere çeşitli kanonik olmayan yollar da gen ekspresyonunun düzenlenmesine yol açabilir. BMP sinyali, hücre içi (örneğin, Noggin), hücre içi (örneğin, FKBP12, mikroRNA'lar, fosfatazlar ve I-Smads) ve plazma zarındaki (örneğin, Endoglin) yardımcı reseptörler tarafından modüle edilir. 43 nolu (Wang RN, Green J, Wang Z, Deng Y, Qiao M, Peabody M, Zhang Q, Ye J, Yan Z, Denduluri S, Idowu O, Li M, Shen C, Hu A, Haydon RC, Kang R, Mok J, Lee MJ, Luu HL, Shi LL: Bone Morphogenetic Protein (BMP) signaling in development and human diseases. *Genes Dis* 2014, 1:87-105) referanstan direkt alıntıdır.

Wnt sinyali kript bölgesi yani proliferasyon zonu ve intestinal kök hücre nişinde aktif iken onu antagonize eden ana sinyal yolağı olan Bmp (Bone morphogenetic protein) sinyal yolağı daha çok villus ve diferansiyasyon zonunda aktiftir. Stroma kaynaklıdır, intestinal kök hücre nişinin genişlemesini durdurur,

epitelyal farklılaşmayı sağlar. Bmp TGF- $\beta$  süperailisine ait bir protein olup Bmp nakavtı lethal olarak sonuçlanmıştır.

Biri kinazlar aracılı SMAD fosforilasyonu diğeri MAP kinaz yolak aktivasyonu ile olmak üzere iki farklı Bmp yolağı vardır<sup>43</sup>. Noggin bu yolağın ekstraselüler; FKBP12 ise intraselüler modülatörü, endoglin ise koreseptörüdür (Şekil 2.12). Bmp, fosfataz ve tensin homologunu (PTEN) stabilize ederek Wnt sinyalini antagonize eder, Akt aktivitesinde azalma ve sonucunda nükleer  $\beta$ -catenininde azalma olur.

Bmp kök hücre nişinde aktif değildir, çünkü myofibroblastlar (epitel ve Paneth kaynaklı Wnt sinyalleri sonucu) Bmp inhibitör molekülleri sentezlemektedir (gremlin 1, gremlin 2 ve chordin-like 1). Bu sayede diferansiasyon zonunda yüksek olan Bmp gradienti kök hücre nişinde artmış Bmp inhibitörleri nedeniyle düşer<sup>3</sup>.



**Şekil 2.13.** Hedgehog sinyal yolağı. A) Hh ligandının yokluğunda, Ptch Smo'nun plazma zarına ulaşmasını engeller ve bu nedenle mikrotübüle bağlı Cos2-Fu-SuFu kompleksi Gli'yi fosforile eder. Fosforile edilmiş Gli parçalanır ve daha sonra transkripsiyonu baskılamak için çekirdeğe gider. B) Hh ligandının varlığında, Ptch aktivitesi baskılanır ve böylece Smo, plazma membranına geçer ve Cos2 ile etkileşime girer. Bu durumda, Cos2-Fu-SuFu kompleksi Gli'yi bağlayamaz ve Gli çekirdeğe girebilir ve hedef genlerin transkripsiyonunu indükleyebilir. 44 nolu (*An Overview of Hedgehog Signaling in Fibrosis*) referanstan direkt alıntıdır.

Hedgehog (Hh) sinyal yolağı 3 çeşittir: Sonic, Indian ve Desert. Sonic Hedgehog (SHH) en çok araştırılmış olan yolak olup hedef hücrelerinde Patched (Ptch) reseptör ve Smoothened (Smo) olmak üzere 2 transmembran protein vardır. Ptch; Smo ile inhibitör formda etkileşir<sup>44</sup> (Şekil 2.13). Ptch reseptörüne Hh bağlanması sonucunda

Smo serbestleniyor ve transkripsiyon faktörleri Gli1, Gli2 ve Gli3'ün aktivasyonu ile hedef genlerin nükleer translokasyonu gerçekleşir<sup>45</sup>.

Bağırsakta, epitel kaynaklı Hh sinyali mezenkim gelişimi için önemlidir. İHH gen ekspresyonu durdurulmuş (nakavt) farelerin doğumda öldüğü bildirilmiştir. SHH nakavt farelerde bağırsakta büyük malformasyonları gözlenmiştir<sup>46</sup>.

İHH ve SHH'nin intestinal morfogenezdeki kombine rolünü incelemek için, Gumucio laboratuvarı, villus epitelinde villin promotörü ile kenetli pan-Hh inhibitörü olan hedgehog-interacting protein (Hhip) eksprese eden lethal olmayan transgenik fareler üretmiştir. Bu fare modelinde bağırsak morfolojisinde şu değişiklikler gözlenmiştir:

\*Myofibroblastlar, villus boyunca yanlış yerleşmiştir,

\*Villusun, desmin pozitif düz kas fibrilleri, disorganize yapıda yayılmıştır,

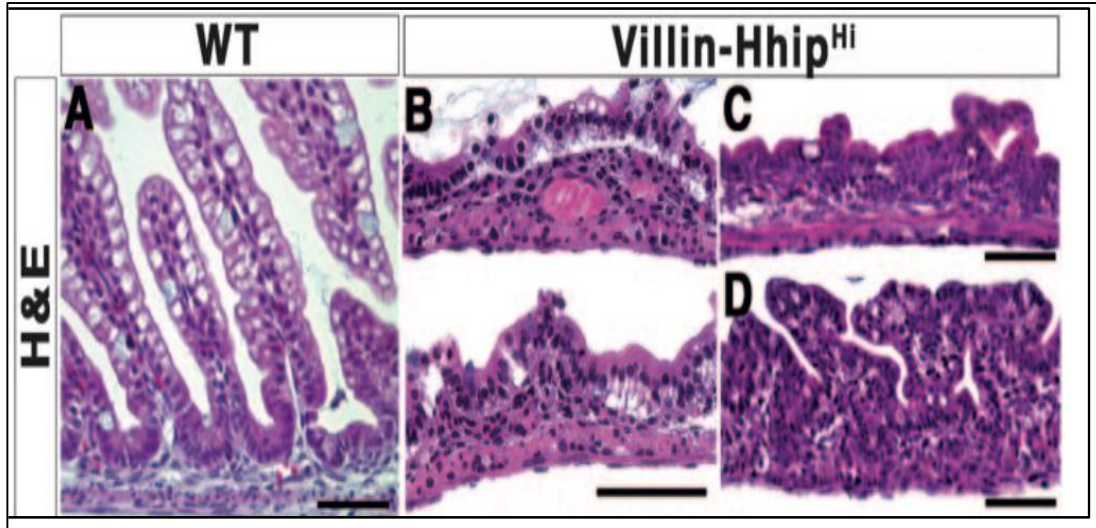
\*Embriyoda azalan Hh sinyali, myofibroblastların subepitelyal lokasyonlarında düzgün gelişmemesi,

\*Villustaki düz kasın lenfatik lakteallerin düz kası olacak bileşenleri oluşturamaması,

\*Yanlış yönlendirilmiş myofibroblastlar, normal proliferasyon olan epitel villus tabanında tutabilme özelliklerinin kaybı ve artmış epitelyal proliferasyon göstermiştir (Resim 2.1). Gumucio laboratuvarı, muskularis mukozadaki değişiklikleri bildirmemiş; villuslarda progresif kayıp, kript hiperplazisi, villus dallanma bozukluğu, anormal kript formasyonu, artmış epitelyal proliferasyon, displazi, adenomatöz değişiklikler, lamina propria inflamasyonu olduğunu kaydetmiş ve bu değişikliklerin Çöliak Hastalığı ile örtüştüğü şeklinde yorumlamıştır. Üstelik Gumucio ve ark., Hh ligandının önceden bilinmeyen antiinflamatuvar özelliklerini de ortaya koymuşlardır<sup>46</sup>.

Chen laboratuvarı ise, Hh sinyal yolağı inhibisyonunun; subepitelyal myofibroblastlarda yanlış yerleşim, villus düz kasında progresif kayıp ve villus atrofisi yanı sıra muskularis mukozada düz kasında dikkat çekici kayıp olduğunu vurgulamıştır. Klinik olarak ishal, malabsorpsiyon ve malnutrisyon ile karakterize olduğunu ve erken ölümlerle sonuçlandığını bildirmiştir. Bu modelde ince bağırsakta villus düz kas yokluğu, lenfatik lakteal kaybı ile uyumludur. Konjenital veya kazanılmış olabilen ve

lenfanjiektazi olarak adlandırılan bu hastalığın erken dönem histopatolojisi, bu transgenik fare modelindeki ile benzerdir<sup>3</sup>.



**Resim 2.1.** Hh inhibisyonu, epitelyal rejenerasyona ve villus oluşumuna engel olur. WT (`wild` tip) Hh: iyi düzenlenmiş ve iyi gelişmiş villuslar. B-C-D: (villin-Hhip<sup>Hi</sup>) villuslarda progresif kayıp, kript hiperplazisi, villus dallanma bozukluğu, anormal kript formasyonu, artmış epitelyal proliferasyon, displazi ve adenomatöz değişiklikler. 46 nolu (*Epithelial hedgehog signals pattern the intestinal crypt-villus axis Development 2005 132: 279-289; doi: 10.1242/dev.01576*) referanstan direkt alıntıdır.

Yukarıda bahsedilen bağırsak gelişimi sırasında Hh sinyali ile ilgili çalışmalarda, Hh sinyalinin ablasyonunun bozulmuş kriptal mezenkimal hücrelere neden olduğu gösterilmiştir. Bu bozulma, genişlemiş kriptler ve intestinal kök hücre kompartmanının büyümesi ile sonuçlanır. Yani mezenkimal hücreler, intestinal kök hücre kompartmanının büyümesinin kısıtlanmasında da görev yapar.

Clevers'ın grubu Lgr5+ kök hücrelerinden, mezenkimal bir niş olmaksızın, in vitro olarak, intestinal kript-villus yapıları elde edilebildiğini göstermiştir. Ancak, Lgr5+ kök hücrelerinin büyümesi için çeşitli faktörler gereklidir<sup>19</sup>. Bunların arasında, çoğunlukla mezenkimal hücrelerden sentezlenen lamininden zengin matriks ve Bmp antagonisti noggin yer alır. Ayrıca tek bir epitelyal kök hücreden gerçek bir villus oluşmaz, sadece düz bir interkript bölge oluşur. Buna göre, lamina propria mezenkimal hücreleri, villus-kript aksisinin tamamını yinlemek için gereklidir. Bu kapsamda mezenkimal bileşenler, intestinal kök hücrenin kendini yenilemesini ve farklılaşmasını dengeler. İntestinal kök hücrenin kaderini belirleyecek mezenkimal-epitelyal etkileşimleri açıklığa kavuşturmak için daha fazla çalışma gerekmektedir.

## 2.4.6. Kanser ilişkili myofibroblast, invazyon ilişkisi ve ilaç direnci

### 2.4.6a. Kanser ilişkili myofibroblast/fibroblast

Literatürde tümör hücreleri çevresinde yer alan tüm myofibroblastlara ve fibroblastlara “kanser ilişkili fibroblast” terimi kullanan çalışmalar yanı sıra; bu topografik tanımlamanın yetersiz olduğunu düşünerek sadece geri dönüşümsüz aktivasyona uğrayan fibroblastların “kanser ilişkili fibroblast” olduğunu savunanlar da mevcuttur<sup>9</sup>.

Kanser ilişkili fibroblastlar (KİF); myofibroblastlar gibi pek çok farklı hücreden orijin alabildikleri için heterojen bir popülasyondur. EMT, EnMT ya da PMT gibi epitel, endotel ve perisitten mezenkime diferansiasyonla ya da dokudaki sessiz fibroblastlardan TGF- $\beta$  sinyali ile oluşabilirler<sup>47</sup>. Aynı şekilde bu hücrelere farklılaşma yetenekleri de mevcuttur. Yamanaka ve arkadaşları yetişkin fare fibroblast kültürlerine Oct3/4, Sox2, c-Myc ve Klf4 faktörlerinin ilave ederek bu hücrelerden indüklenmiş kök hücre oluştuğunu ve fare cildine yeniden enjekte edildiğinde her üç germ yönünde farklılaşabildiklerini göstermişlerdir<sup>48</sup>. Fibroblastların bu plastisite yeteneği aynı şekilde KİF’larda da mevcuttur.

Kanser hücrelerinin “Hallmark”ı olarak Hanahan ve Weinberg tarafından tanımlanan özelliklerin KİF’lar içinde geçerli olduğu bulunmuştur<sup>2,49</sup>. Kanser hücrelerinde izlenen bu değişiklikleri 6 maddede birer örnek ile toparlamışlardır:

- 1- Büyüme sinyalleri üretmede kendine yeterlilik: H-ras onkogen aktivasyonu
- 2- Büyüme karşıtı sinyallere duyarsızlık: Retinablastom supresyonu kaybı
- 3- Apoptozdan kaçış: IGF üretimi
- 4- Sınırsız çoğalma potansiyeli: Telomeraz aktivasyonu
- 5- Angiogenезin sürdürülmesi: Kendi VEGF sinyalini üretmesi
- 6- İnvazyon ve metastaz: E-kadherin inaktivasyonu

Buradaki replikatif ölümsüzlük henüz KİF’larda tanımlanmamıştır ancak bunun dışında kanser hücrelerindeki tüm yetenekler KİF’larda da mevcuttur.

KİF, aktive fibroblast ve fibroblast tanımları ve birbirleri olan ilişkiler şu şekilde özetlenebilir. Dokuda sessiz olarak ve rezerv hücre olarak bulunan fakat ekstraselüler matriks üretimi ya da sekretuar yeteneği olmayan sadece mekanik stress durumunda

TGF- $\beta$  sinyali ile geri dönüşümlü olarak aktive fibroblasta yani myofibroblasta dönüşebilen fibroblastlar olarak tanımlanmıştır. Yara iyileşmesi gibi durumlarda fibroblastlardan oluşan bu normal aktivasyon fibroblastlarının (NAF) ise, ekstraselüler matriks üretimi, büyüme faktör sekresyonu ve kontraktilite yeteneği vardır. Görevleri bittiğinde apoptoz ile yok olabilir ya da fibroblasta geri dönüşebilirler. KİF'lar ise geri dönüşümsüz olarak aktive olmuşlardır. Sekretuar fenotipleri ileri derecede gelişmiş, bunun dışında granülasyon dokusunda "remodelling"te kullanılan matriks metaloproteinazları tümör invazyonu sırasında tümör hücrelerine öncülük etmek için kullanırlar.

Warburg etkisi olarak bilinen ve tümör hücrelerinin oksijen varlığında dahi glikoliz (glukozdan laktat oluşumunda sadece 2 ATP) ile yetinip; 36 ATP kazanılan oksidatif fosforilasyonu tercih etmemesidir. Peki Warburg etkisi tümöre ne kazandırır ve tümör neden 36 ATP yerine 2 ATP'yi tercih eder? Warburg etkisi tümörün glukoz bağımlı olmasıdır. Pozitron emisyon tomografisinde, tümör hücrelerinin artmış glukoz alımının işaretli deoksiglukoz ile saptanması Warburg etkisi ile açıklanabilir<sup>50</sup>. Bu durum anabolizmanın aktive olmasıdır. Bu sayede tümör hücreleri mevcut glikozu tümörü infiltre eden lenfositlerden ya da konak immunitesinin diğer hücrelerinden daha fazla kullanır. Glikoliz sonucu oluşan metabolitler asidoza neden olur bu da mikroçevrede invazyonu, immuniteden kaçışı sağlar. Reaktif oksijen metabolitleri oluşmamış olur ve mitokondriye bağımlı kalınmadan (oksidatif fosforilasyon enizmleri için farklı genlerin ekspresyonu düzenlenmeli) enerji üretimi sağlanmış olur. Ayrıca oluşan laktat Cori siklusuna girerek tekrar glukozla dönebilir ve tekrar kullanılabilirdiği için de bir avantajdır.

Ters Warburg etkisinde ise tümör çevresindeki stromal hücrelerde glikoliz sonucu oluşan laktat; tümör hücresinde oksidatif fosforilasyon ile yüksek enerji elde etmek için kullanılır. Bu stromal hücrede oksidatif fosforilasyon yolağının kapanması (Caveolin kaybı) ve tümör için gerekli enerji kaynağı olarak laktatın tümöre transfer edilmesi ters Warburg etkisidir. Tümör mikroçevresinin özellikle KİF'ların tümör hücrelerinin metabolizmasında önemli yeri vardır.

KİF'lar fonksiyonlarına göre alttiplere sınıflandırıldığında anti-tümöral F1 ya da tümör gelişimi ve büyümesini destekleyen protümöral F2 olarak incelenmektedir. Ayrıca anti ya da pro tümöral olmaksızın F3 sentetik grup ve ekstraselüler matriks remodeling ile ilişkili F4 grupları da araştırılmaktadır<sup>9</sup>.

#### **2.4.6b. İnvazyondaki rolleri**

E-kaderin ekspresyonu invazyonu önlemektedir<sup>51</sup>. E-kaderin ekspresyonu korunmuş invazyon yeteneği olmayan DHD/K12/TRb PROb tümör hücreleri, tümör ilişkili myofibroblastlar ile birlikte invazyon yeteneği kazandığı savunan çalışma mevcuttur. Bu çalışmada tümör hücrelerinin kendisinin değil; myofibroblastların 75 kDa'luk bir kollajenaz salgıladığını ve invazyondan sorumlu olduğunu kanıtlamıştır<sup>51</sup>.

İn vitro "co-culture" (birlikte kültüre edilen) sistemde insan kolon kanseri hücreleri ile yapılan deneyler, kanser hücreleri ve myofibroblastlar arasında ön-invaziv bir çapraz sinyal ortaya çıkarmıştır: matriselüler protein Tn-C'nin myofibroblastlar tarafından üretimi, invaziv ve invaziv olmayan durum arasında "switch" sağlamaktadır<sup>52</sup>.

Tümör hücrelerinden ziyade tümör stromasının invazyondaki rolünün araştırıldığı 120 kolorektal kanser hastasının dahil edildiği bir çalışmada, podoplanin stromal hücrelerin %30'ndan fazla boyanmasının iyi prognostik olduğu istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur. Podoplanin pozitifliği ile kanser invazyon derinliğinde azalma dikkat çekicidir<sup>53</sup>.

Normal dokularda ekspresyonu zor saptanabilen endosialinin tümörle ilişkili myofibroblastlarda, aktive perisitlerde ekspresyonun invaziv kanser durumlarında arttığı gösterilmiştir. Evre 1 -2 olan primer melanomlarda az, evre 3-4 olan metastatik melanomlarda çok endosialin ekspresyonu bulunmuştur<sup>54</sup>.

Tümör ilişkili myofibroblastlar RhoA ve Rac dengesinin kontrolü ile migrasyonu düzenler. Düşük RhoA ve yüksek Rac durumunda migratuar fenotip oluşurken, tam tersi durumda non migratuar fenotip oluşmuştur. Myofibroblastlar tarafından iki adet proinvaziv sinyal üretilmektedir. İlki RhoA inhibitörü olan tenascin C ve diğeri Rac aktivatörü olan SF / HGF'dir<sup>55</sup>.



Tümör stromasındaki myofibroblastlar ile tümör hücreleri arasındaki moleküler çapraz sinyaller incelendiğinde; myofibroblastlar tarafından EGF, TGF- $\alpha$  ve TGF- $\beta$  gibi proinvaziv sitokinlerin salgılandığı saptanmıştır<sup>7</sup>.

#### 2.4.6c. İlaç direnci

Myofibroblastlar ile ilgili son zamanlardaki en popüler konu ilaç direnci ve ön görülemeyen koşullarda intestinal kök hücre nişinin devamlılığını sağlayabilmeleridir.

Wnt; hem epitel hem de stroma kaynaklı olabilir. Stromal Wnt kaynağı subepitelyal myofibroblastlardır. Porcupine (PORCN) inhibitörlerinin hedefi Wnt üreten hücrelerdir; Wnt'in palmitollenmesini bloke ederek salgılanmalarını önler. Oral yolla alınan terapötik dozlarda PORCN inhibitörlerinin bağırsak toksisitesinin olmaması; subepitelyal hücrelerin ilaç direnci olup olmadığını akla getirmiştir.

Yapılan araştırmalarda sadece PORCN inhibitörleri değil, tamoksifen ve doksorubisin gibi ksenobiyotiklere dirençli oldukları kanıtlanmıştır. İlaç direnç mekanizmaları araştırıldığında ABC kaset taşıyıcı genlerin yüksek ekspresyonuna bağlı olarak ilaçların efluks edilebildiği gözlenmiştir<sup>10</sup>.

### 2.5. Kolonik subepitelyal ve perikriptal myofibroblastların immunohistokimyasal belirteçleri

Literatürde çok sayıda belirtecin adı geçmekle birlikte, myofibroblastlar için herkes tarafından kabul görmüş; spesivitesi ve sensitivitesi yüksek bir biobelirteç henüz tanımlanmamıştır. Literatürdeki bazı biobelirteçlerin kolonda boyanma özellikleri Resim 2.2'de izlenmektedir.

- $\alpha$ -SMA: Kas dışı aktin ( $\beta$  ve  $\gamma$ : tüm hücrelerde), düz kas aktini ( $\alpha$  ve  $\gamma$ ) ve sarkomerik aktin (kardiak ve iskelet) olmak üzere 6 izoformu tanımlanmıştır.<sup>1</sup> İntestinal stromal hücrelerin tanımlanması için Powell ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarda  $\alpha$ -SMA spesifik olmamakla birlikte iyi bir mezenkimal hücre belirteci olarak kabul edilmektedir<sup>3, 5, 56</sup>. Bununla birlikte  $\alpha$ -SMA'nın SEiMF'ları diğer mezenkimal hücrelerden (gerçek düz kas, perisit, myoepitel, interstisyel Cajal hücreleri, endotel, lenfoid dokuların fibroblastik retiküler hücreleri, testiküler myoid ve stromal hücreler) ayırmada yardımcı olmamaktadır<sup>57</sup>.

- Vimentin: Hücre iskeleti ara filamanı içeriğinin baskın komponentine göre  $\alpha$ -SMA pozitif hücreleri ayırt etmede yardımcı olduğu düşünülmektedir. Muskularis mukoza ve villus düz kası vimentin ile zayıf boyanmaktadır. Myofibroblastlar ve perisitler vimentinden zengindir ve daha güçlü boyanırlar.
- Desmin: Muskularis mukoza ve villus düz kası ara filaman olarak bol miktarda desmin içerir. Perisit ve myofibroblastların aynı hücre olabileceği bir kenara bırakılırsa; perisitler desmin pozitif iken<sup>6</sup> myofibroblastlar (genelde negatif) nadiren zayıf pozitifdir. Kullanılan antikora da bağlı olarak (monoklonal antidesmin antikoları kullanıldığı takdirde in vivo maskelenme ile myofibroblastlar negatif saptanacaktır; poliklonal olan insan desmininin C-terminal ucunu tanıyan antikor kullanıldığında ise diğer epitoplara da tanınacağı için myofibroblastlar pozitif saptanacaktır. Bununla birlikte kripte çevresindeki subepitelyal fibroblastların ise gerçek myofibroblast olduğu ve desmin negatif olduğu bilinirken; ince bağırsak villuslarını çevreleyen  $\alpha$ -SMA pozitif subepitelyal hücrelerin desmin ile zayıf pozitif oluşu; bu hücrelerin perisit olduğu görüşünü doğrulmuştur<sup>6</sup> (Tablo 2.2).

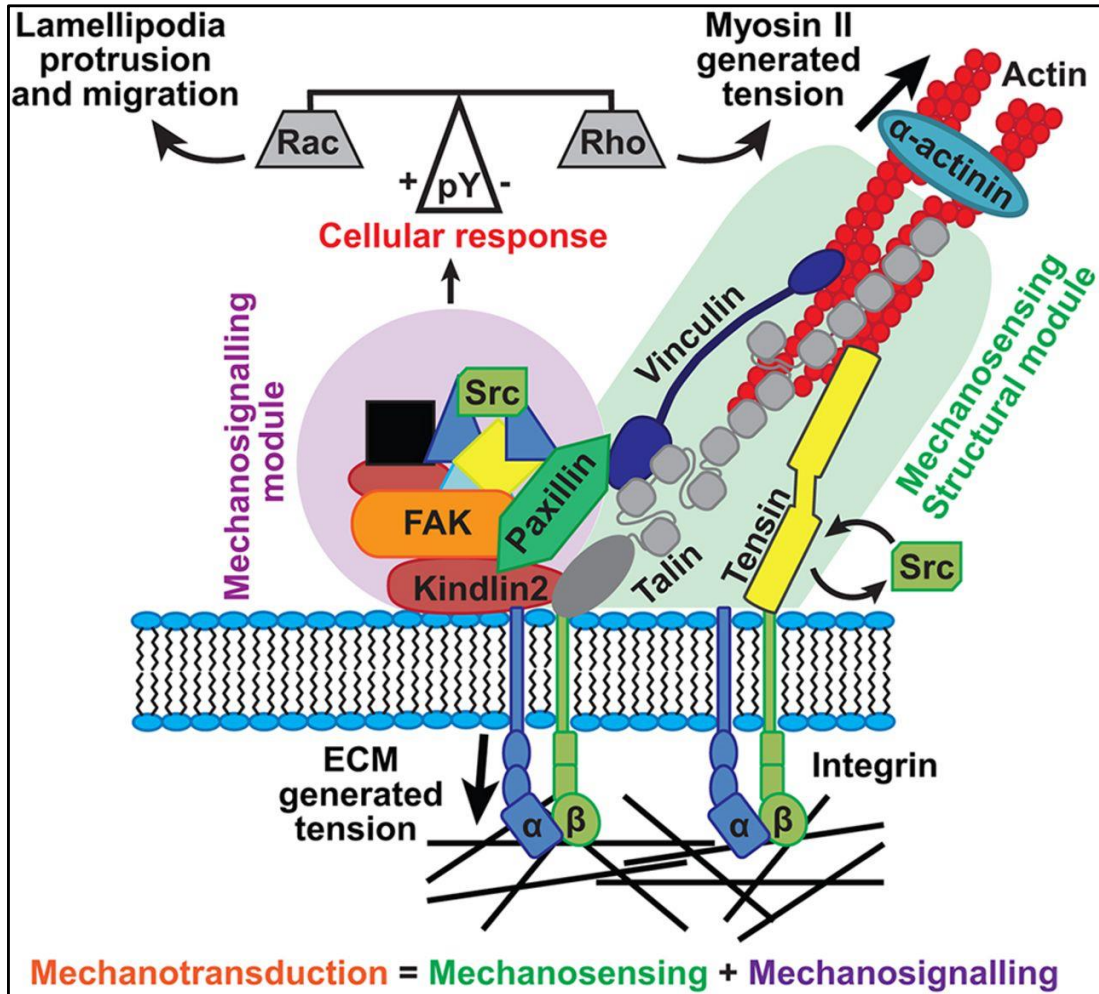
|   | Desmin | Vimentin | $\alpha$ -SMA |
|---|--------|----------|---------------|
| <b>İnce bağırsak üst subepitelyal myofibroblast</b> | ++     | +++      | +/-           |
| <b>İnce bağırsak alt subepitelyal myofibroblast</b> | +      | +++      | ++            |
| <b>İnce bağırsak perikriptal myofibroblast</b>      | -      | +++      | +++           |
| <b>Kolonik perikriptal myofibroblast</b>            | -      | +++      | +++++         |
| <b>Kolonik lamina propria myofibroblastları</b>     | -      | +++      | -             |

**Tablo 2.2.** İnce bağırsak ve kolonik fibroblastların ara filamanlar ile boyanma özellikleri.

- Prolil-4-hidroksilaz: Kollajen tip 1 matürasyon enzimidir. İki izoenzimi vardır: Tip I interstisyel mezenkim ve fibroblast gibi dokularda Tip II ise karaciğer, böbrek ve plasentada bulunur<sup>58</sup>. İmmunfloresan incelemelerde myofibroblastlar, düz kas ve fibroblastların Tip I ile pozitif; Tip II ile negatif oldukları saptanmıştır<sup>58</sup>.

- CD90 / Thy-1: Mezenkimal hücre yüzey proteindir. Fibroblastlarda, myofibroblastlarda, vasküler peristlerde, kemik iliği ve mezenkimal kök hücrelerinde, aktive endotelde saptanmıştır<sup>6, 59</sup>. Farklı organlarda CD90 ekspresyonu myofibroblast ve fibroblastlar için değişkendir. Örneğin akciğerde normalde CD90 pozitif fibroblastların; TGF- $\beta$  sinyali ile CD90 negatif myofibroblasta dönüştüğü bildirilmiştir<sup>60</sup>. İnflamatuar bağırsak hastalıklarında ise CD90 pozitif myofibroblast artışı saptanmıştır<sup>61</sup>.
- MCSP / NG2 (melanoma kondroitin sülfat proteoglikan / neuron glia2): Epidermis bazal tabakasında ve kıl folikülünde eksprese edilen bir hücre yüzey proteoglikanıdır. Faredeki karşılığı NG2 (neuron glia2) dir. Hücre adezyonu, yayılması, migrasyonu (integrin ve Rho aracılı) ile ilişkilidir. Melanomlarda invazyonda rol aldığı bilinmektedir. Ayrıca fibroblastların; büyüme faktörlerine (özellikle PDGF) cevap vermesinde aracı bir proteindir<sup>62</sup>. Fibroblastlar MCSP negatifken, myofibroblastlar, perisitler ve düz kas pozitifdir. MCSP ekspresyonu insan kolorektal kanserlerinden izole edilen stromal myofibroblastlarda saptanmıştır<sup>6</sup>.
- FSP / S100A-4 (Fibroblast spesifik protein / sitoplazmik kalsiyumu bağlayan S100 süperalesi): Epitel hücrelerinde olmayan; epitel mezenkim dönüşümünde rol oynadığı düşünülen, sitoplazmik kalsiyumu bağlayan S100 süperalesi (bu nedenle diğer adı S100A-4 olarak da bilinmektedir) üyesi filament ilişkili bir proteindir. Myokardial remodelling'teki fibroblastlar incelendiğinde; FSP'nin spesifik olmadığı, inflamatuvar ve endotel hücrelerinde de bulunduğu ancak periostinin daha spesifik olduğu kaydedilmiştir<sup>63 64</sup>.
- FAP (Fibroblast aktive edici protein): İlk olarak granülasyon dokusundaki aktive fibroblastlarda pozitif olarak saptanan ancak perikriptal myofibroblastlarda bulunmayan membran serin proteazıdır. Kolorektal adenokarsinomlardaki myofibroblastlarda pozitifdir<sup>65</sup>.
- Periostin: İlk olarak osteoblasttan sekrete edilen bir protein olarak tanımlansa da sonraları kemik iliği fibrozisi ya da astım patogenezindeki subepitelyal fibrozis gibi fibrotik süreçlerde kollajen fibrilogenезisinde görevli olduğu anlaşılan bir

ekstraselüler matriks proteindir<sup>66</sup>. İçerdiği çok sayıda domain sayesinde fibronektine, tenascin-C'ye, proteoglikanlara, BMP-1'e bağlanabilen önemli bir iskeledir<sup>67</sup>. Bu iskele BMP-1 ile etkileştiğinde; tip I kollajen çapraz bağ oluşumunda görevli lizil oksidaz ile fibronektin ve kollajen fibrilleri için sofistike bir yapı oluşturur<sup>67</sup>. Periostin normal kolonda perikriptomal myofibroblastlar ve vasküler düz kasta pozitifdir. İnflamatuvar durumlarda ekspresyonu artar, lineer boyanma ve lamina propria "mesh" paterninde boyanma izlenir<sup>68</sup>.



**Şekil 2.14.** Aktin bağımlı hücre-matriks adezyonu. "Actin-associated cell-matrix adhesions" AACMA: Talin ve vinculin yapısal modülde yer almakta olup aktin ve integrinler ile sıkı ilişkidir. Paxillin tirozin fosforilasyonu ile sinyal iletiminde rol oynar. Mekanik uyarıya hücre cevabı Rho ve Rac ile olur. 69 nolu referanstan (*Distinct focal adhesion protein modules control different aspects of mechanotransduction*) direkt alıntıdır.

- Myofibroblastların hücre-hücre adezyon yapısı fibroneksustur. Bu fokal adezyon yapısının süpermatür halidir. Aktin ilişkili hücre-matriks bileşenlerinin bir çoğu

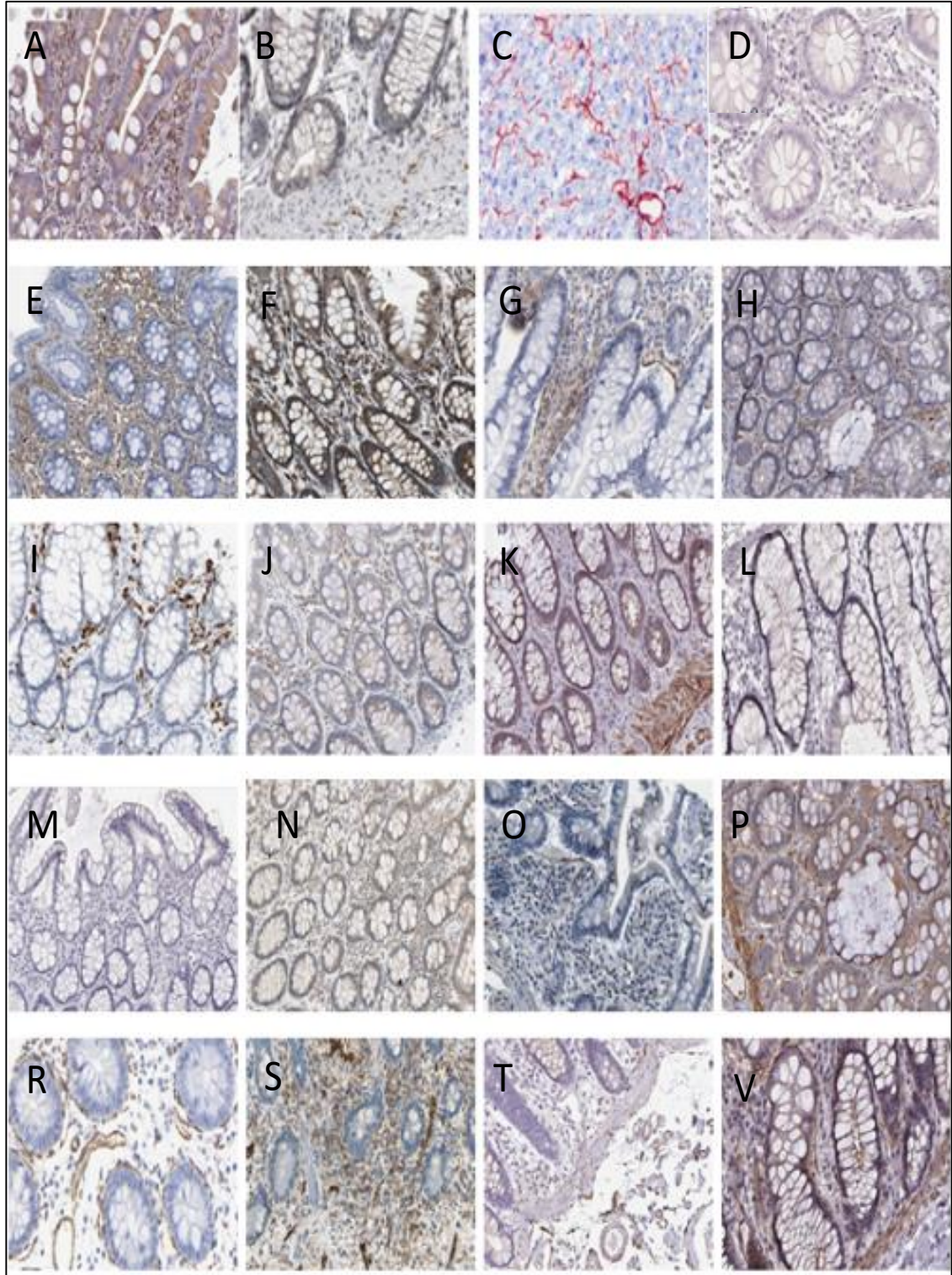
("actin-associated cell -matrix adhesions" AACMA) myofibroblastik belirteç olarak araştırılmıştır. Bunlardan başlıcaları vinculin, paksilin, fibronektin, talin ve integrinlerdir<sup>69 70</sup> (Şekil 2.14).

- Fibronektinin adezyon ve migrasyonda önemli rolü vardır ve bir çok hücrede ekspresyonu gösterilmiştir. TGF- $\beta$  sinyali ile myofibroblastik diferansiyasyon indüklenbilmesi için ortamda ekstra domain A (ED-A) splicing varyant fibronektin bulunmalıdır. VEGF (vasküler endotelial büyüme faktörü), FGF (fibroblast büyüme faktörü), PDGFR (platelet derive büyüme faktörü) gibi bir çok büyüme faktörü ile bağlanabilir ve myofibroblastik fenotip oluşumuna katkıda bulunur<sup>71</sup>.
- Vinculin, hücre-hücre adezyon proteini. Aktin filamanlarına bağlanarak mekanik stress durumunda esnek bir fokal adezyon oluşmasına katkıda bulunur<sup>72</sup>. Vinculin aktifleşmesi için bağlanma yerlerinin açılması gerekir: Talin,  $\alpha$ -actinin,  $\beta$ -catenin ve paksilin gibi bağlanma partnerleri bu aktivasyonu sağlar<sup>73</sup>. İki aşamalı myofibroblastik diferansiyasyonda; protomyofibroblasttan myofibroblasta geçişte, vinculin ve paksilin artışı olur<sup>14</sup>. Vinculin ekspresyonu yüksek olan kolorektal kanserlerde  $\beta$ -catenin membranöz pozitifliği; vinculin kaybı olanlarda ise  $\beta$ -catenin non-membranöz (sitoplazmik ya da nükleer) boyanması yanısıra E-cadherin kaybı ve vimentin ekspresyonu ile doğrulanmış EMT saptanmıştır. İkinci grup kolorektal kanserlerde metastaz daha fazla saptanmıştır. Vinculin ekspresyonu yüksek kanser hücreleri hücre hücre bağlantıları güçlü olduğu için migratuar fenotipte değildir ve bu da tedavi modaliteleri açısından yeni araştırma konusu olacaktır<sup>73</sup>.
- İntegrinler  $\alpha$  ve  $\beta$  olmak üzere alt ünitelere sahiptir ve toplam 24 farklı tipi bulunan heterodimerik transmembran proteinlerdir. Pulmoner fibroziste  $\alpha 4$  integrinler önemli iken kanser ilişkili fibroblastların ekstraselüler matriksteki proinvaziv mikroçevre oluşumunda ilişkili integrin  $\alpha 3\beta 1$  olarak bilinmektedir<sup>74</sup>.

- Tenascin-C: Ekstraselüler matriks proteindir. Normal yara iyileşme sürecinde baskılanırken; hipertrofik skarda kalıcı ekspresyonu ve nakavt farelerde Ehlers-Danlos sendromuna benzer fenotip oluştuğu bilinmektedir<sup>71</sup>. Bazı tümörlerde tenascin'in indüklediği Rho inaktivasyonu ile tümör progresyonu gözlenmiştir<sup>55</sup>.
- Epimorfin / sintaksin 2: Pankreas ve nöronlardaki vezikül "docking" protein sintaksin ailesine homolog olan membran ilişkili bir proteindir. Myofibroblastlarda epimorfin ekspresyonu arttığında Bmp4 sentezi de artmış bu da epimorfinin SEİMF'lar ile epitel arasındaki karşılıklı konuşmada önemli olduğunu göstermektedir<sup>3</sup>. Epimorfin nakavt farelerde ince bağırsak uzunluğu, kript füzyonu ve kript-epitelyal proliferasyonu artmış bulunmuştur<sup>75</sup>. Epimorfin SEİMF ve perisitlerde pozitifdir<sup>76</sup>.
- Palladin 4lg (Stress fiber controlling protein): Sitoiskeletal bir proteindir ve yokluğunda aktin liflerinin bozulduğu geçici varlığında ise aktin reorganizasyonu olduğu bilinir. Fibroblasttan myofibroblasta dönüşüm aşamasında palladin izoformlarının ekspresyonu araştırılmış ve 4lg izoformunun (140 kDa) TGF- $\beta$  ile uyarılan fibroblastlarda yeni ortaya çıktığı görülmüştür<sup>77</sup>. Palladin normal pankreas stromasında negatifken, prekanseröz lezyonlarda stromada (90 kDa) ortaya çıkmaya başlar ve invaziv pankreas karsinomunda stromadaki kanser ilişkili fibroblastlarda overekspresyonu saptanması invazyonda önemli bir protein olduğunu desteklemektedir<sup>78</sup>.
- TEM1/Endosialine/CD248 (tumor endothelial marker 1/Sialylated transmembran protein): Bir transmembran glikoproteindir. Normal dokularda mezenkimal hücrelerde (özellikle kanser ilişkili myofibroblast ve perisitlerde) ekspresyonu saptanabilse de, proinvaziv durumlarda ekspresyonunun arttığı, mezenkimal hücrelerin proliferasyonu ve migrasyonunda önemli rolü olduğu saptanmıştır<sup>54</sup>. Fibroblast aktivasyon belirteci olarak kullanılmıştır<sup>79</sup>.
- Cadherinler: Kalsiyum bağımlı adezyon molekülleridir. Fibroblastlarda N-cadherin ilk tanımlanan cadherin olsa da myofibroblast ve fibroblastlarda cadherin ekspresyonu farklılıkları net bilinmemektedir<sup>70</sup>. EMT'de fibroblastik fenotipin E-

kadherinden N-cadherin'e değişimi olur<sup>70</sup>. Cadherin 11 ise fibroblastlardaki VEGF ekspresyonu artımı ile anjiogenezi düzenler<sup>80</sup>.

- Podoplanin: Osteosit, folliküler dendritik hücre ve meme myoepitel hücreleri gibi hücrelerde normal olarak bulunan, kontraksiyon ve hücre reorganizasyonunda görevli, sialomüsin benzeri glikoprotein içeren bir transmembran proteindir. Oral skuamöz hücreli karsinomlarda kanser ilişkili fibroblast ve myofibroblastlarda podoplanin ekspresyonu tümör progresyonu ile ilişkili bulunmuştur<sup>81</sup>. Fibroblast aktivasyon belirteci olarak kullanılmıştır<sup>79</sup>.
- Caveola kolesteroldan zengin membran mikrodomenleridir. Caveolanın bir komponenti olan caveolinler tüm dokularda eksprese edilir<sup>82</sup>. Ters Warburg etkisinde tümör çevresindeki stromal hücrelerde glikoliz sonucu oluşan laktat; tümör hücresinde oksidatif fosforilasyon ile yüksek enerji elde etmek için kullanılır. Bu stromal hücrede oksidatif fosforilasyon yolağının kapanmasında Caveolin kaybı ve MCT4 (monocarboxylate transporter 4) artışı rol oynamaktadır. Meme kanserinde stromal caveolin 1 kaybı kötü prognostik bir belirteç iken, epitelial tümör hücrelerinde caveolin artışı da yine kötü prognostik belirteçtir<sup>82</sup>. Kolon karsinomlarında da stromal caveolin-1 kaybı (epitel hücrelerindeki caveolin ekspresyonu anlamlı değilken) kötü prognostik faktör olup, histolojik tip ve TNM ile ilişkili bulunmuştur<sup>83</sup>.
- Gli1: Hedgehog sinyal yolağındaki transkripsiyon faktörüdür. Ptch 1 ise bu yolağın membrandaki reseptörüdür. İn vitro çalışmalarda mezenkimal kök hücre olarak isimlendirilen, in vivo ortamda ise iğsi şekilli, perivasküler nişte yerleşimli, kök hücre belirteçlerini eksprese eden ve her 3 yöne de farklılaşma yeteneği olan hücrelere mezenkimal kök hücre benzeri hücre denir. Kalp yetmezliği ve obstruktif renal durumlarda gelişen fibroziste Gli1 pozitif perivasküler hücreler sorumlu bulunmuş ve terapötik olarak bu hücreler hedeflenmiştir<sup>45</sup>. Ptch1 ve Gli1 ekspresyonu, baskın olarak myofibroblastlar, perisitler, lamina propria ve muskularis mukoza düz kas hücrelerinde bulunur<sup>6</sup>.



**Resim 2.2.** Literatürdeki immunobelirteçlerin “The Human Protein Atlas” görüntüleri. A) Prolil-4-hidroksilaz, B) LVYE-1, C) hepatositlerde ER-TR7, D) CD90, E) fibronektin, F) Chondrotin sulfat proteoglycan4, G) PDGF, H) ICAM, I) CD80, J) CD86, K) FAP, L) SINTAKSIN-epimorfin, M) Leptin, N) Gli, O) Periostin, P) Vinculin, R) Caveolin, S) Podoplanin, T) Endosialin, V) Palladin.



Bunların dışında; literatürde myofibroblastları diğer mezenkimal hücrelerden ayırt edebilmek için negatif immunbelirteçler kullanılmaktadır. Myofibroblastlar; epitelyal sitokeratinler, düz kas farklılaşmasının terminal belirteci olan smoothelin, monosit belirteci olan CD14, endotel belirteci CD31, fibrosit belirteci olan CD34 negatiflerdir<sup>4</sup>. LYVE1 (lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor) perisit ve myofibroblastlarda negatiftir<sup>84</sup>. Myofibroblastlar düz kas myosin negatif, düz kas dışı myosin pozitiflerdir<sup>85</sup>.

## **2.6. Kolonik subepitelyal ve perikriptal myofibroblastların diğer organlardaki eşdeğer hücreleri**

Diğer organlardaki myoid özellikler gösteren fibroblastik hücreler, genelde fibrozisten sorumlu hücrelerdir. Hücre iskeleti fenotipleri buldukları organa göre değişkenlik gösterebilmektedir.

Testis stromasında (seminifer tübül etrafını saran hücrelerin dışında) stromada desmin pozitif,  $\alpha$ -SMA negatif stromal hücreler<sup>86</sup>,

Perisitler, alveolün etrafını saran düz kas özelliklerine sahip PDGFR pozitif myofibroblastları ve renal mesengial hücreler<sup>87</sup>,

Uterus stromasındaki desidualize desmin ve vimentin pozitif mezenkimal hücreler<sup>88</sup>,

Dalak ve lenf nodlarındaki (retiküler hücrelerin bir alt tipi)  $\alpha$ -SMA ve desmin pozitif myoid hücreler<sup>89</sup>,

Overde, teka eksternada özellikle ovulasyonu sağladığı düşünülen  $\alpha$ -SMA pozitif hücreler<sup>90</sup>,

Karaciğerde disse aralığında yer alan, A vitamini depolayan ve desmin pozitif olan perisinüzoidal stellat (Ito hücresi) hücreleri<sup>91</sup>,

Akciğerde (perisit harici) alveol etrafında yer alan ve vimentin,  $\alpha$ -SMA pozitifken desmin içermeyen alveolar myofibroblastlar<sup>92</sup>,

Kemik iliğinde fibrozisten sorumlu ve son yıllarda myelofibrozis tedavisinde araştırılmaya başlanan leptin reseptörü ya da Gli1 pozitif olan hücreler<sup>93, 94</sup>,

Pankreastaki GFAP, desmin ve  $\alpha$ -SMA pozitif periasiner stellat hücreler<sup>95</sup>,

Santral sinir sistemindeki kan beyin bariyerini oluşturan ve gliozisten sorumlu olan astrositler<sup>13</sup>,

Meme stromasındaki myofibroblastlar<sup>13</sup>,

Romatoid artritte eklemde pannus oluşumundan sorumlu sinovisitler<sup>13</sup>,

Egzoftalmustan sorumlu orbital myofibroblastlar<sup>13</sup>,

Kataraktan sorumlu lensteki fibroblastlar<sup>13</sup>,

Proliferatif vitroretinopatiden sorumlu retinal fibroblastlar<sup>13</sup>,

Korneal skardan sorumlu myofibroblastlar<sup>13</sup> vücuttaki myoid özellikleri olan diğer myofibroblastik hücrelerdir.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. İnsan kolon doku örneklerinin toplanması ve doku mikrodizinin hazırlanması

Bu çalışma için Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nundan 09 Ekim 2018 tarihli GO 18/963-20 sayılı onay alınmıştır (Ek 1). Çalışma kapsamında, prospektif olarak, kanser tanısı alıp cerrahi rezeksiyon yapılan 21 kolorektal kanser hastasından toplanan taze kolon mukoza/kanser örnekleri kodlanarak dondurulmuş ve ayrıca doku mikrodizini yapılabilmek için Formalin fikse parafine gömülü (FFPE) doku blokları hazırlanmıştır (Ek 2). Alınan taze örnekler -80°C'de muhafaza edilmiştir.

Ek 2'de belirtilen örneklerden hazırlanan formalin fikse parafine gömülü bloklardan (FFPE) "Recipient Block Mold Kit" ile manuel olarak, her bireyden 2 farklı neoplastik olmayan kolon mukozasını temsil eden 3'er mm çaplı mukozal dokular alınarak çoklu doku mikrodizini oluşturulmuştur (TMA-K11). TMA-K11 kodlu çoklu doku mikrodizin bloğundan pozitif yüklü lamalara 4 µm kalınlıkta alınan boyasız kesitler numaralandırılmış olup ayrıca H&E boyama yapılarak doku özelliği ve seviyeleri değerlendirilmiştir.

#### 3.2. İmmünohistokimyasal boyama ve antikorlar

İmmünohistokimyasal boyamanın bir kısmı (Desmin,  $\alpha$ -SMA, CD146 ve CD56) Leica BOND-Max otomatik boyama (Leica Microsystems, Wetzlar, Almanya) platformunda gerçekleştirilmiştir. Diğerler (TMEM-119, PR2D3, ZEB1, MMY-11 ve AOC-3) ise manuel olarak immünohistokimyasal boyama uygulanmıştır. Antikorların firma, katalog, klon, dilüsyon ve boyama özellikleri Tablo 3.1'de kısaca özetlenmiştir.

##### 3.2.1. Leica BOND-Max otomatik immünohistokimya boyaması

Kesitler 75°C'de Bond Dewax çözültisi (Leica Microsystems, Kat. No: AR9222) ile deparafinize edilmiştir. %96'lık alkol serisi ile muamelenin ardından EDTA (Leica Biosystems, Newcastle Ltd., Newcastle Upon Tyne; İngiltere; kat. no: AR9640) içinde 100°C'de 10 dakika süreyle antijen açığa çıkarma işlemi gerçekleştirilmiştir. Akabinde doku kesitleri oda sıcaklığında primer antikorlarla inkübe edilmiştir. Adımlar arasında yıkama için Tris tamponlu salin (Leica Microsystems, Kat. No: AR9590) kullanılmıştır. Ardından proteinlerin gösterilmesi için "Bond Polymer Refine Detection" kiti (Leica

Microsystems, Newcastle Ltd., Newcastle Upon Tyne; İngiltere; Kat. No: DS9800) uygulanmıştır. Kit, sırasıyla endojen peroksidaz aktivitesini blokaj için %3-4'lük hidrojen peroksit (oda sıcaklığında 13 dakika), kullanıma hazır sekonder antikor (oda sıcaklığında 9 dakika), horse radish peroksidaz-IgG polimeri (oda sıcaklığında 9 dakika), 3'-3-diaminobenzidin tetrahidroklorür(DAB) kromojen (oda sıcaklığında 7 dakika) ve karşıt boyama için hematoksilen (oda sıcaklığında 3 dakika) içermektedir.

### **3.2.2. Manuel immunohistokimyasal boyama metodu**

1. Deparafinizasyon: Bu kapsamda doku mikrodizininin elde edilen boyasız kesitler 60°C'de 1 gece boyunca deparafinize edilmiştir.
2. Rehidrasyon: Ksilen (2x10 dakika) ve dereceli (%96 EtOH, %90 EtOH ve %70 EtOH) alkol solüsyonlarından (2x5 dakika) geçirilmiştir.
3. Endojen peroksidaz blokajı: Dokuda mevcut olan endojen peroksidin özelliği %3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solüsyonu ile ortadan kaldırılmıştır.
4. Antijen Maskesinin Kaldırılması (antijen retrieval): Tespit solüsyonu antigenlerin epitop bölgelerini kapatarak antijenik özelliklerini yitirmesine sebep olup antijeni maskeleyebilir. Antijeni yeniden açığa çıkarmak için sitrat (TMEM-119) ya da EDTA (ZEB-1) kullanılmıştır.
5. Primer antikor: Daha sonra titrasyonu yapılmış primer antikor ideal dilüsyonda 1 saat süre ile oda sıcaklığında muamele edilmiştir.
6. Sekonder antikor ve streptavidin biotin peroksidaz metodu kullanılarak (UltraVision Polyvalent Rabbit-Mouse HRP Kit, Thermo Fisher) uygulanmıştır.
7. Kromojen reaksiyonu: Sekonder antikor ile reaksiyonun tamamlanması sonrasında ise işaretleme reaksiyonunun gerçekleşmesi için son aşamada DAB (3,3'-Diaminobenzidine, Thermo Fisher) kullanılarak ışık mikroskopunda reaksiyon süresi değerlendirilerek işlem tamamlanmıştır.
8. Zıt boyama: Hematoksilen (Merck) ile 5 saniye muamele edildikten sonra slaytlar ılık musluk suyunda 10 dakika yıkanmıştır.

Dehidrasyon için dereceli alkolden geçirilen slaytlar, ksilen solüsyonunda bekletildikten sonra balsam ile kapatılmıştır.

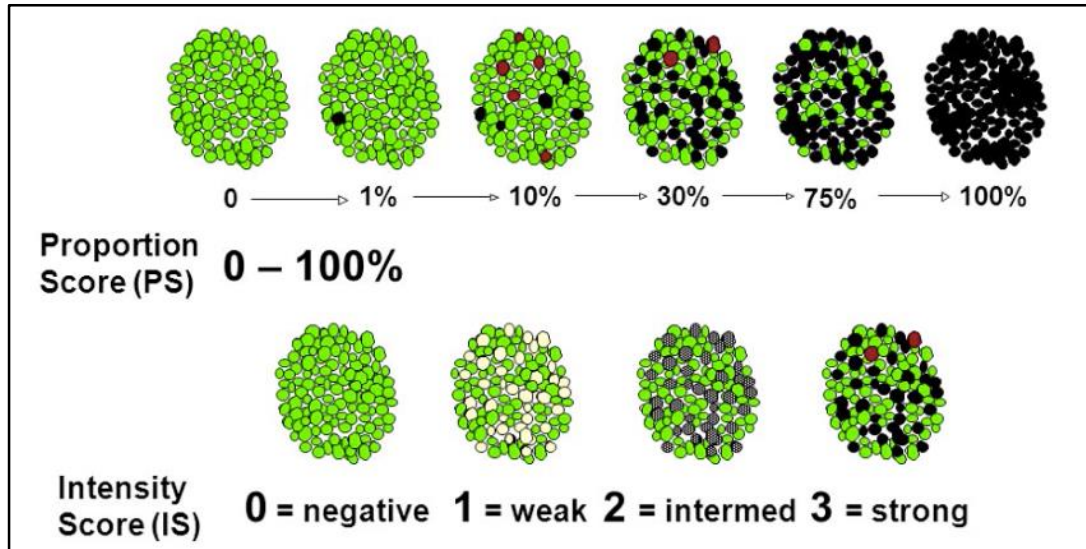
| Antikor       | Dilüsyon | Antijen retrieval | Marka | Klon      | Katalog No |
|---------------|----------|-------------------|-------|-----------|------------|
| TMEM-119      | 1/160    | Sitrat            | SIGMA | HPA051870 | HPA051870  |
| ZEB-1         | 1/100    | EDTA              | Abcam | EPR17375  | ab203829   |
| CD146         | 1/146    | EDTA              | Leica | N1238     | CD146-L-U  |
| $\alpha$ -SMA | 1/2000   | Sitrat            | Abcam | 1A4       | Ab7817     |
| Desmin        | 1/50-100 | Sitrat            | Leica | DE-R-11   | PA0032     |
| AOC3          | 1/100    | Sitrat            | R&D   | 393112    | MAB3957    |
| PR2D3         | 1/25     | Sitrat            | Abcam | NA        | Ab20255    |
| CD56          | 1/100    | EDTA              | Leica | CD564     | PA0191     |
| MYH-11        | 1/100    | Sitrat            | SIGMA | HPA015310 | HPA015310  |

**Tablo 3.1.** Çalışmada kullanılan antikorların bilgileri.

### 3.2.3. İmmunohistokimyasal Boyalı Preparatların Dijital Slayt Haline Getirilmesi ve immünohistokimyasal skora

TMA-K11 kodlu neoplastik doku içermeyen kolon mukozalarını temsil eden doku bloğundan hazırlanan H&E ve immünohistokimyasal boyama yapılan slaytlar Olympus VS 120 dijital görüntüleme sistemi yardımıyla dijital slayt haline getirilmiştir. Taranmış olan dijital slaytlar OlyVIA yazılımı ile görüntülenerek immunohistokimyasal skora konvansiyonel yöntemle yapılmıştır. Bu yöntem semikuantatif bir skora olup 2 aşamalıdır. İlk aşamada boyanan hedef hücreler hem oran skoru olarak hem de yoğunluk skoruna göre değerlendirilmiştir (Şekil 3.1). İkinci aşamada bu 2 skor çarpılarak H-skor elde edilmiştir. H-skor <50: negatif; 51-100: zayıf pozitif; 101-200 orta pozitif; 200 ve üzeri kuvvetli pozitif olarak kabul edilmiştir.

Ön literatür taraması sonucunda seçilen 9 antikor ( $\alpha$ -SMA, TMEM-119, ZEB-1, CD146, desmin, AOC3, PR2D3, MYH-11 ve CD56) neoplastik olmayan kolon mukozasında değerlendirilmiştir. Bu aşamadaki amacımız tanımlamaya çalıştığımız hedef hücremizin; bulmaya çalıştığımız antikor ile gerçekten spesifik boyanıp boyanmadığını belirlemek için; komşu stromal hücreler ile kıyaslanmaktır. Ek olarak tüm antikorlar kendi içinde  $\frac{1}{2}$  alt perikriptal,  $\frac{1}{2}$  üst perikriptal ve subepitelyal myofibroblastlar açısından değerlendirilmiştir (Ek 3 ve Tablo 4.2).



**Şekil 3.1.** Konvansiyonel immunhistokimya değerlendirme yöntemi.

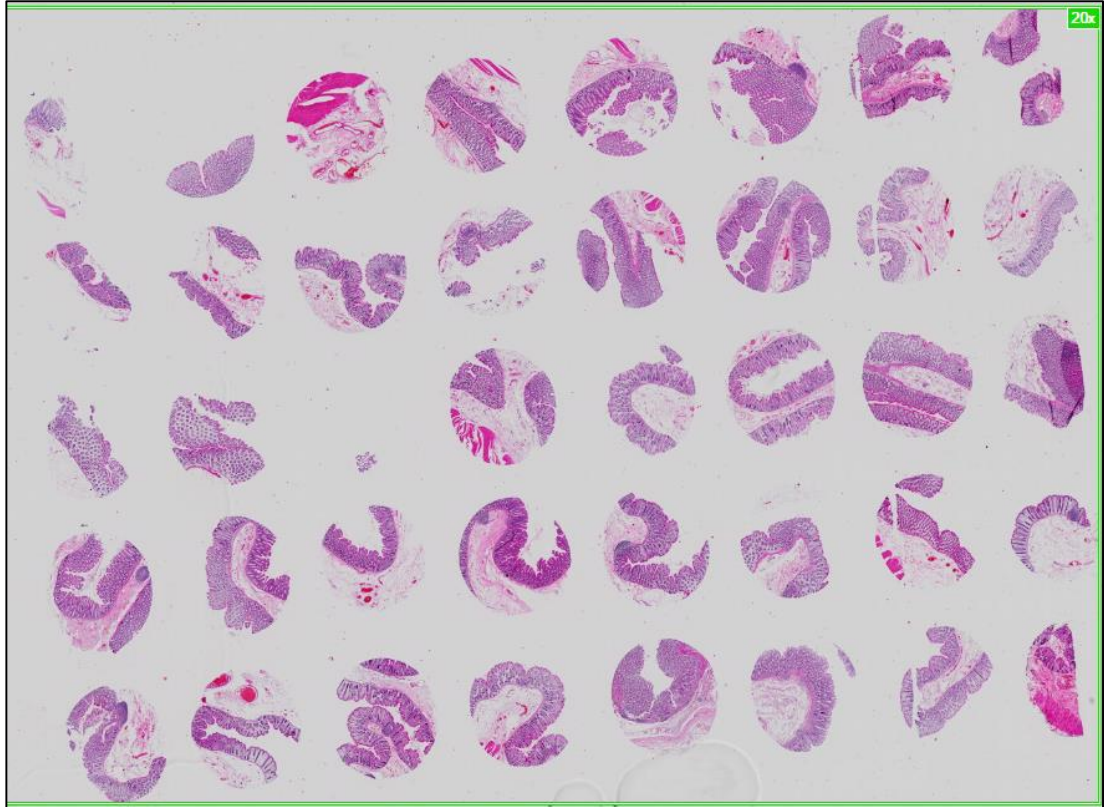
### 3.3. Kolorektal Kanser Doku Mikrodizini ve Subepitelyal Myofibroblast Belirteçleri ile Boyanma Özellikleri

Bu kapsamda Hacettepe Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalı arşiv materyalinden 2016 yılı öncesine ait doku blokları kullanılarak 28 adet kolorektal kanser olgusundan hazırlanmış olan doku mikrodizini (TMA-K5 ve TMA-K6) kullanılmıştır. Doku mikrodizini formalin fikse parafine gömülü bloklardan (FFPE) "Recipient Block Mold Kit" ile manuel olarak hazırlanmıştır. Her olgudan 5'er mm çapında tümör örnekleri kullanılmıştır. Bu mikrodizine ait bloktan pozitif yüklü lamlara 4 µm kalınlıkta alınan doku kesitleri yukarıda tanımlanan yöntemlerle TMEM-119, AOC3 ve MYH-11 ile boyanarak değerlendirilmiştir. Bu kapsamda boyanma özellikleri neoplastik stroma ve karsinom parankiminde ayrı ayrı konvansiyonel yöntem ile skorlanmıştır.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Normal mukozaya yönelik çalışmalarda elde edilen bulgular

Neoadjuvan radyokemoterapi almamış, rutin patolojik inceleme sonrası yeterli dokusu bulunan kolorektal karsinom olgularının normal kolonlarından 3 mm çapında iki ayrı örnek alınarak hazırlanan doku mikrodizinleri literatür araştırması sonucunda karar verilen antikörler (ZEB1, TMEM119, AOC3, PR2D3, MYH11, CD146, CD56) ile incelendi.



**Resim 4.1.** Neoplastik olmayan kolon mukozasından hazırlanan doku mikrodizininin (TMA-K11) H&E boyaması ve dijital slayt olarak görünümü.

#### 4.1.1 Normal kolon mukoza örneği alınan olguların klinikopatolojik bulguları

Olguların 13'ü (%65) erkek, 7'si kadın (%35)'dir. Ortalama yaş 67.95 (en genç 47, en yaşlı 81) 'dir. Olguların 13'ü (%65) sol kolon; 7'si (%35) sağ kolon yerleşimlidir.

İmmunhistokimyasal olarak sol kolon yerleşimli tümörlerde DNA hatalı eşleşme tamir gen ürünlerine yönelik yapılan incelemelerde MLH1, MSH2, MSH6 ve PMS2 ile neoplastik hücrelerde nükleer pozitif boyanma izlenmiş olup kayıp saptanmamıştır (pMMR). Sağ kolon yerleşimli 7 tümörün 3'ünde (%42.85) ise immunhistokimyasal olarak nükleer kayıp saptanmıştır (dMMR). Sol kolon yerleşimli

tümörlerin ortalama çapı 4 cm, sağ kolon yerleşimli tümörlerin ortalama çapı 6 cm'dir. Tablo 4.1'de olgulara ait özellikler verilmiştir.

| Olgu Kodu | Yaş | Cinsiyet | Tümör yerleşim yeri | En geniş tümör çapı (cm) | T  | N  | M | dMMR |
|-----------|-----|----------|---------------------|--------------------------|----|----|---|------|
| X1        | 71  | Kadın    | Sağ kolon           | 7                        | 4A | 0  | 0 | 0    |
| X2        | 78  | Erkek    | Sağ kolon           | 6.5                      | 3  | 1A | 0 | 0    |
| X3        | 73  | Kadın    | Sol kolon           | 3.5                      | 4A | 2A | 0 | 0    |
| X4        | 54  | Kadın    | Sağ kolon           | 6.5                      | 3  | 0  | 0 | 1    |
| X5        | 47  | Erkek    | Sol kolon           | 3.2                      | 3  | 1A | 0 | 0    |
| X6        | 74  | Kadın    | Sağ kolon           | 2.5                      | 1  | 0  | 0 | 0    |
| X7        | 65  | Erkek    | Sağ kolon           | 9                        | 4A | 0  | 0 | 0    |
| X8        | 75  | Erkek    | Sol kolon           | 3.5                      | 3  | 0  | 0 | 0    |
| X9        | 76  | Erkek    | Sol kolon           | 6                        | 3  | 3  | 0 | 0    |
| X11       | 68  | Erkek    | Sol kolon           | 4                        | 2  | 0  | 0 | 0    |
| X12       | 81  | Erkek    | Sol kolon           | 2                        | 3  | 0  | 0 | 0    |
| X13       | 68  | Erkek    | Sol kolon           | 6                        | 3  | 0  | 0 | 0    |
| X14       | 70  | Kadın    | Sağ kolon           | 7                        | 3  | 1B | 0 | 1    |
| X15       | 72  | Erkek    | Sağ kolon           | 4                        | 1  | 0  | 0 | 1    |
| X16       | 53  | Erkek    | Sol kolon           | 5                        | 3  | 2B | 0 | 0    |
| X17       | 78  | Kadın    | Sol kolon           | 6                        | 4  | 1  | 0 | 0    |
| X18       | 62  | Erkek    | Sol kolon           | 5                        | 3  | 0  | 0 | 0    |
| X19       | 69  | Kadın    | Sol kolon           | 3                        | 3  | 0  | 0 | 0    |
| X20       | 54  | Erkek    | Sol kolon           | 3                        | 3  | 2A | 0 | 0    |
| X21       | 71  | Erkek    | Sol kolon           | 2                        | 3  | 1C | 0 | 0    |

**Tablo 4.1.** Normal kolon mukozası kullanılan olgulara ait klinikopatolojik bilgiler.

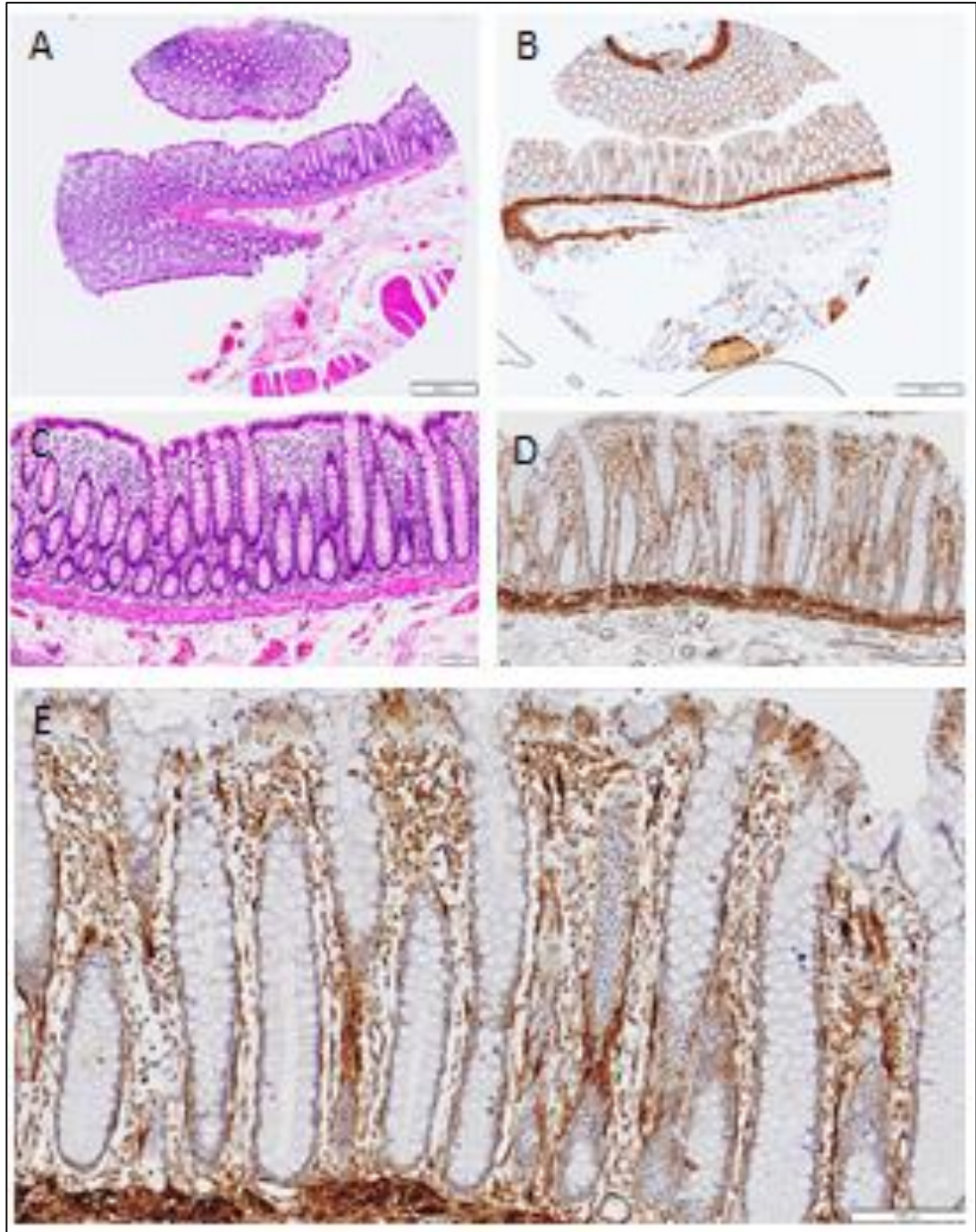
#### 4.1.2. Normal kolon mukozasında izlenen immünohistokimyasal bulgular

20 olguya Tablo da belirtilen marka, kolon ve dilusyonlarda immunohistokimyasal boyamalar uygulanmıştır ( $\alpha$ -SMA, TMEM-119, ZEB-1, Tip4 Kollajen, CD10, CD146, desmin, CD31, CD34, AOC3, PR2D3, Myh-11, CD56). Tüm antikorlar ile ilgili bilgiler tablo 4A2` de özetlenmiştir.

**$\alpha$ -SMA:** Literatürde yaygın olarak kullanılan ancak spesifik olmaması nedeniyle kolonik subepitelyal ve perikriptal myofibroblast çalışmalarında tatmin edici olmadığı bilinmektedir. Literatür ile uyumlu olarak, vakaların hepsinde  $\alpha$ -SMA ile subepitelyal ve perikriptal myofibroblastlar kuvvetli pozitifdir. Bunun yanında muskularis mukoza, lenfatik lakteali çevreleyen düz kas, perivasküler hücreler ve



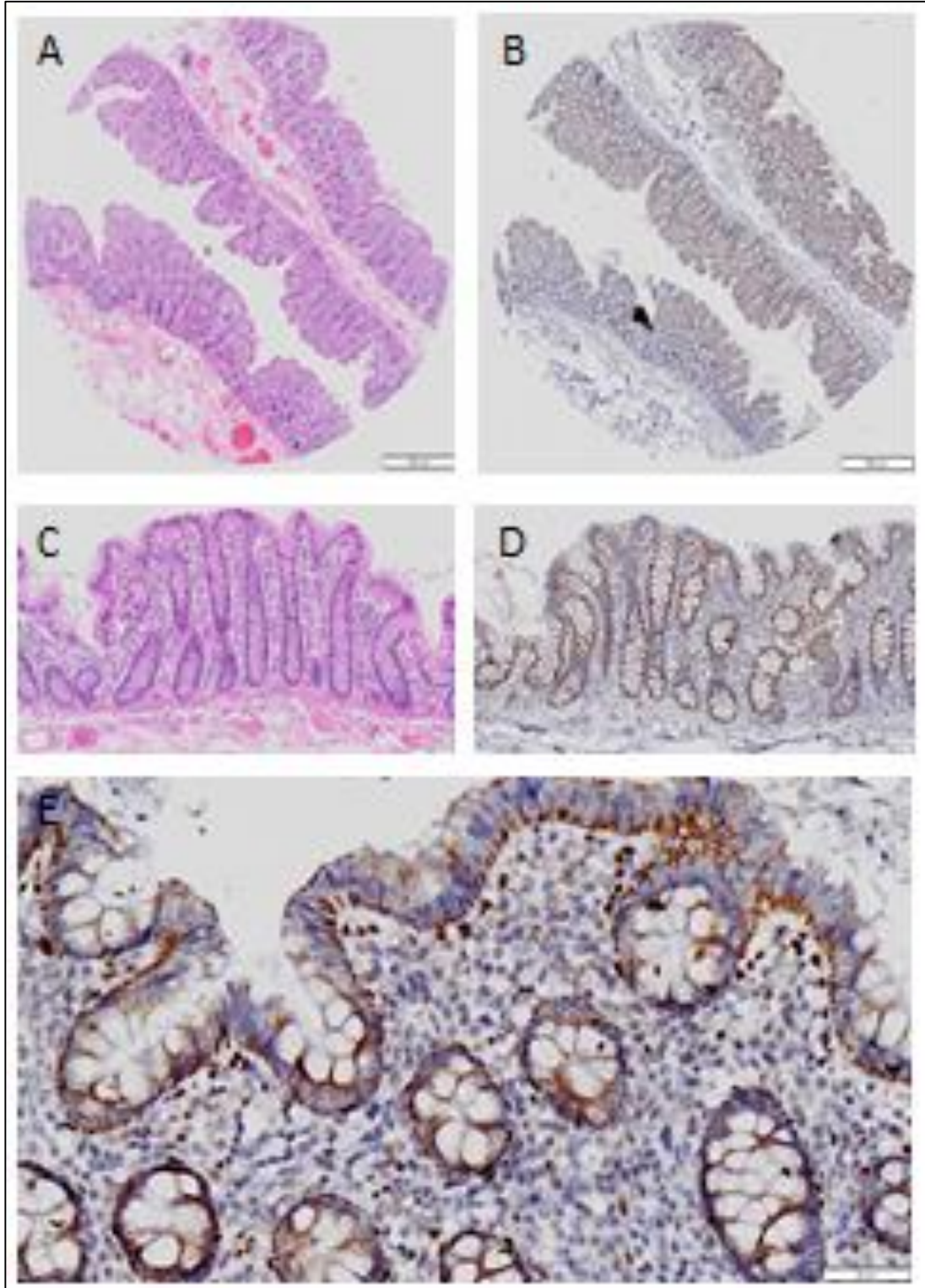
lamina propriadaki diğer mezenkimal hücreler de kuvvetli pozitif boyanma izlenmiştir (Resim 4.2).



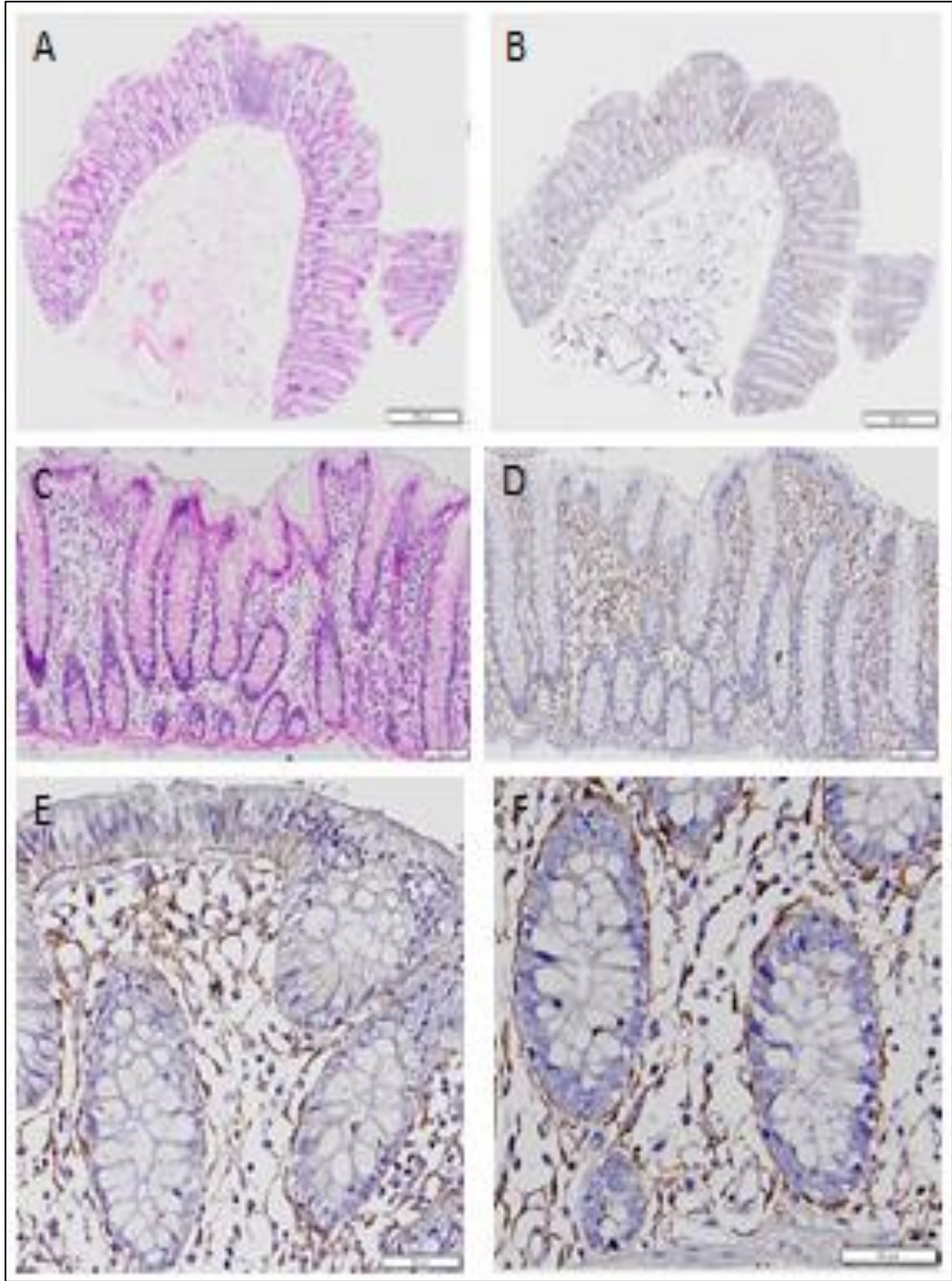
**Resim 4.2.** X17 kodlu dokuya ait H&E ve  $\alpha$ -SMA boyamaları a) 2x H&E, b) 2x  $\alpha$ -SMA c) 9x H&E, d) 9x  $\alpha$ -SMA e) 14x  $\alpha$ -SMA. Subepitelyal myofibroblastlarda boyanma izlenmezken,  $\frac{1}{2}$  üst ve  $\frac{1}{2}$  alt perikriptal myofibroblastlar aynı yoğunlukta  $\alpha$ -SMA ile pozitif boyanmıştır. Ayrıca muskularis mukoza, mezenkimal hücreler, lakteali çevreleyen düz kas ve perivasküler hücreler de kuvvetli pozitifdir.

**ZEB-1:** EMT genlerinin düzenlenmesinde görevli olduğu bilinen ve transkripsiyon ko-aktivatörü ve ko-represörü olarak çalışan bir proteindir. Transkripsiyon faktörü olması nedeniyle nükleer boyanması doğaldır. Olguların %65'inde epitelial hücrelerde bazalde, sitoplazmik pozitivite (+2) dikkati çekmiştir. Bu atipik bulgu dışında subepitelial ve perikriptal myofibroblastlar +1/+2 nükleer pozitif boyanmıştır. Muskularis mukoza genel olarak negatiftir, nadiren +1 pozitif boyanmıştır. Endotel hücreleri +3 pozitifdir. Lamina propriada yer alan mezenkimal hücrelerin bir kısmı +1 nükleer pozitifdir. Ayrıca perivasküler hücreler ve lenfatik lakteali çevreleyen düz kas hücreleri negatiftir. Nükleer bir belirteç olması ve seçici boyanma göstermesi subepitelial ve perikriptal myofibroblastları saptamadaki avantajlarıdır. Epitelde izlenen sitoplazmik boyanmanın spesifik mi artifisyel mi olup olmadığı ileri araştırma gerektirmektedir(Resim 4.3).

**TMEM-119:** Mikroglial bir belirteç olduğu bilinen TMEM-119 ile subepitelial alanda lineer boyanma izlenmiştir. Subepitelial alanda izlenen bu ince, ancak kuvvetli; genel olarak kesintili yer yer devamlı olan lineer boyanma ve muskularis mukozanın negatif oluşu bu antikorun diğer belirteçlere olan üstünlüğüdür. Perikriptal myofibroblastlar genel olarak +2 ve +3 şiddetinde pozitif boyanmış olmakla birlikte alt ½ perikriptal myofibroblastlar TMEM-119 ile daha yüksek oranda +3 pozitif iken üst ½ perikriptal myofibroblastlar daha çok +2 pozitif daha az sıklıkla +3 pozitif boyanmıştır. Lamina propriada izlenen  $\alpha$ -SMA pozitif mezenkimal hücrelerin bir kısmı TMEM-119 ile pozitifdir. Perivasküler hücreler ve lenfatik lakteali çevreleyen hücreler +2/+3 pozitifdir (Resim 4.4).

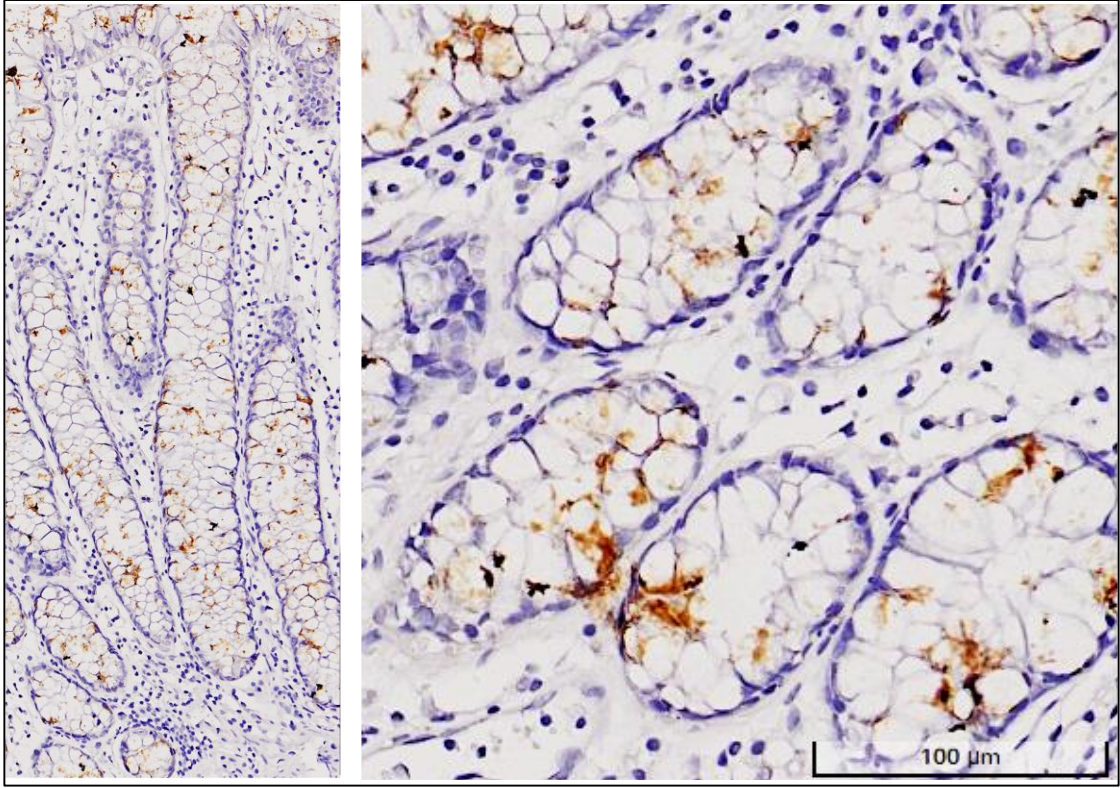


**Resim 4.3.** X19 kodlu olguya ait H&E ve ZEB-1 boyamaları a) 2x H&E, b) 2x ZEB-1 c) 10x H&E, d) 10x ZEB-1 e) 14x ZEB-1. Subepitelyal myofibroblastlarda ender nükleer boyanma mevcuttur,  $\frac{1}{2}$  üst ve  $\frac{1}{2}$  alt perikriptal myofibroblastlar eşit oranda ile nükleer pozitif boyanmıştır. Ayrıca muskularis mukoza genelde negatiftir,  $\alpha$ -SMA pozitif mezenkimal hücrelerin az bir kısmı nükleer ZEB-1 eksprese etmektedir. Lakteali çevreleyen düz kas ve perivasküler hücreler genelde negatiftir.



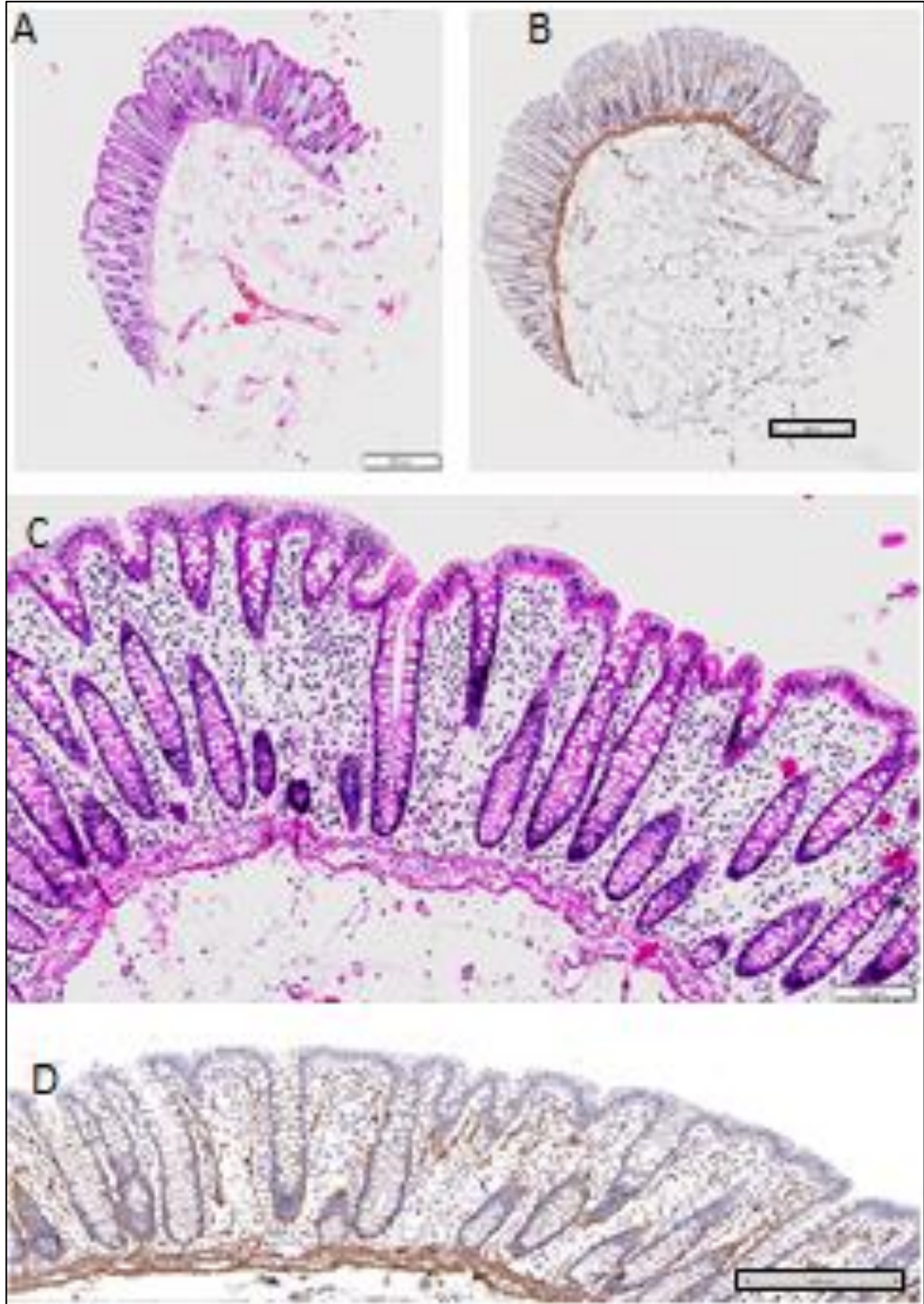
**Resim 4.4.** X12 kodlu olguya ait H&E ve TMEM-119 boyamaları a) 2x H&E, b) 2x TMEM-119 c) 10x H&E, d) 10x TMEM-119 e) 20x TMEM-119. Subepitelyal myofibroblastlarda yaygın lineer boyanma mevcuttur,  $\frac{1}{2}$  üst ve  $\frac{1}{2}$  alt perikriptal myofibroblastlar pozitif boyanmıştır. Muskularis mukoza negatiftir,  $\alpha$ -SMA pozitif mezenkimal hücrelerin bir kısmı, lenfatik lakteali çevreleyen ve perivasküler hücreler pozitifdir.

**PR2D3:** Richman ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da belirtildiği üzere, bu tezde de PR2D3 antikoru ile FFPE dokularda negatif sonuç alınmıştır (Resim 4.5).



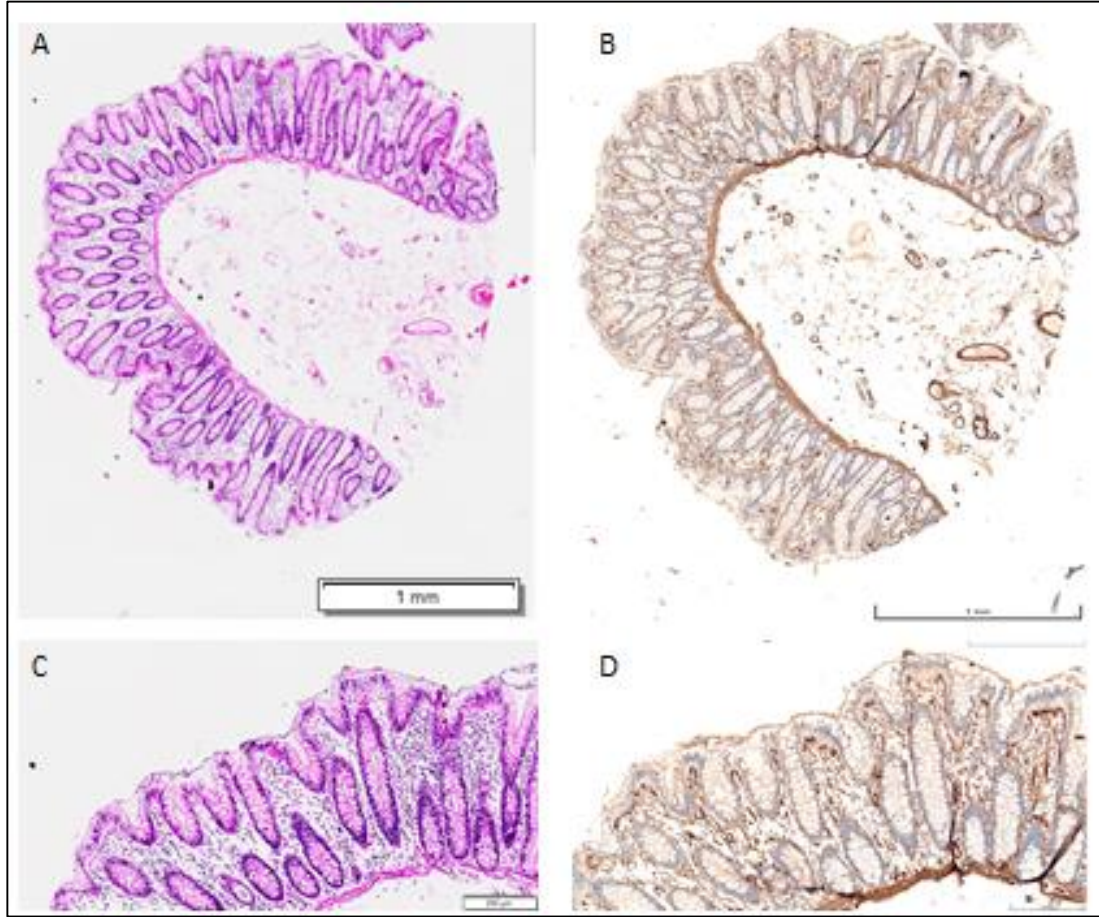
**Resim 4.5.** PR2D3 ile FFPE kolon mukozasında boyanma negatif.

**AOC3:** Subepitelyal myofibroblastlar genel olarak negatifken, alt ½ ve üst ½ perikriptal myofibroblastlar her zaman kuvvetli ve yüksek oranda AOC3 pozitifdir. Bununla birlikte yine  $\alpha$ -SMA ile paralel şekilde muskularis mukoza, lamina propria mezenkimal hücreleri ve lenfatik lakteali çevreleyen hücreler de AOC3 ile +3 pozitifdir (Resim 4.6).



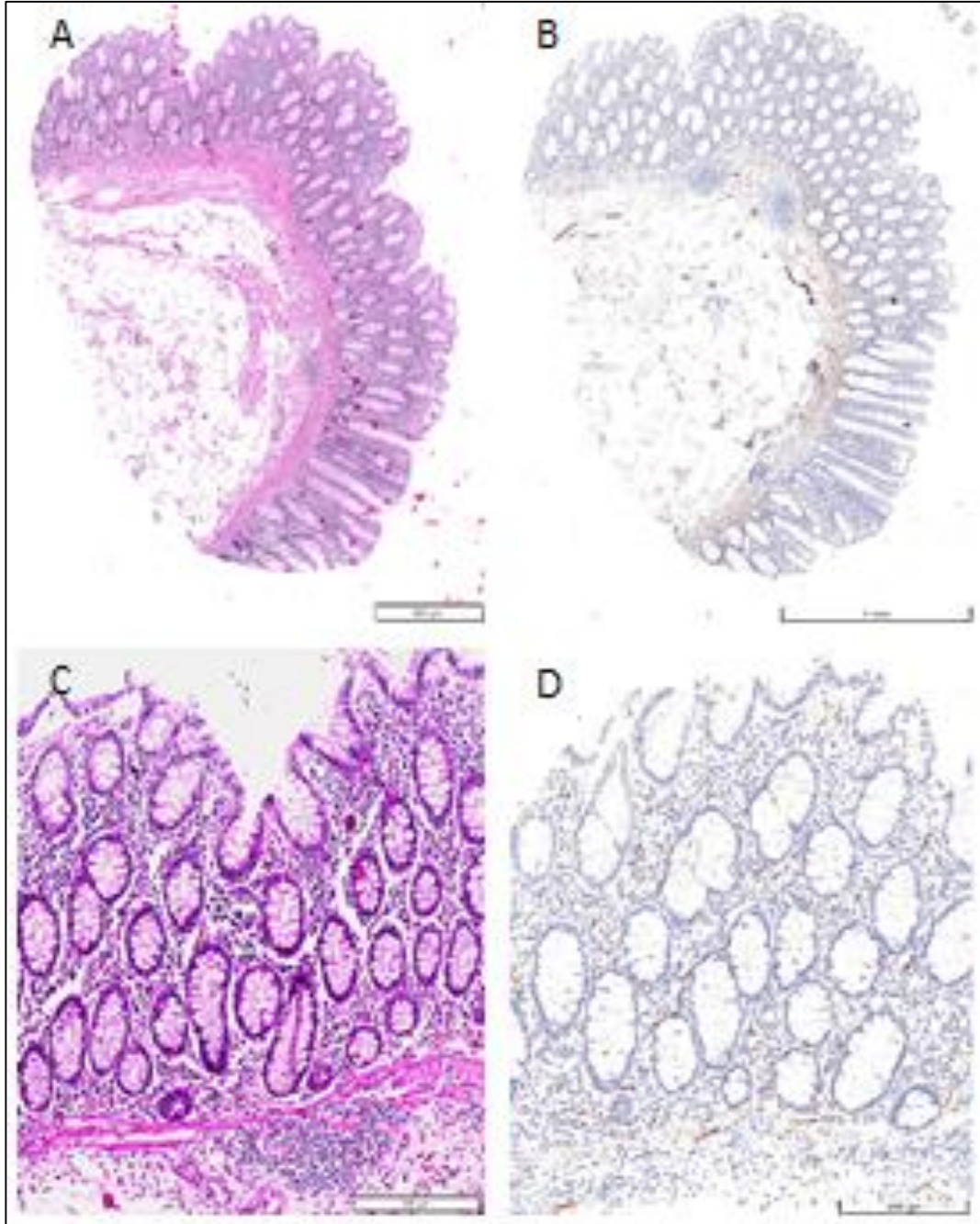
**Resim 4.6.** X5 kodlu olguya ait H&E ve AOC3 boyamaları a) 2x H&E, b) 2x AOC3 c) 8x H&E, d) 8x AOC3. Subepitelyal myofibroblastlarda boyanma izlenmezken,  $\frac{1}{2}$  üst ve  $\frac{1}{2}$  alt perikriptal myofibroblastlar aynı yoğunlukta AOC3 ile +3 pozitif boyanmıştır. Ayrıca muskularis mukoza, mezenkimal hücreler, lakteali çevreleyen düz kas ve perivasküler hücreler de kuvvetli pozitifdir.

**CD146:**  $\alpha$ -SMA ve AOC3 ile paralel bir ekspresyon profili olmakla birlikte daha düşük kuvvette pozitiflik saptanmıştır. Subepitelyal myofibroblastlar için negatif, alt  $\frac{1}{2}$  ve üst  $\frac{1}{2}$  perikriptal myofibroblastlar benzer kuvvette (+2) pozitifdir. Muskularis mukoza, lamina propria  $\alpha$ -SMA pozitif mezenkimal hücreleri, lenfatik laktealleri çevreleyen hücreler ve perivasküler hücreler kuvvetli pozitifdir (Resim 4.7).



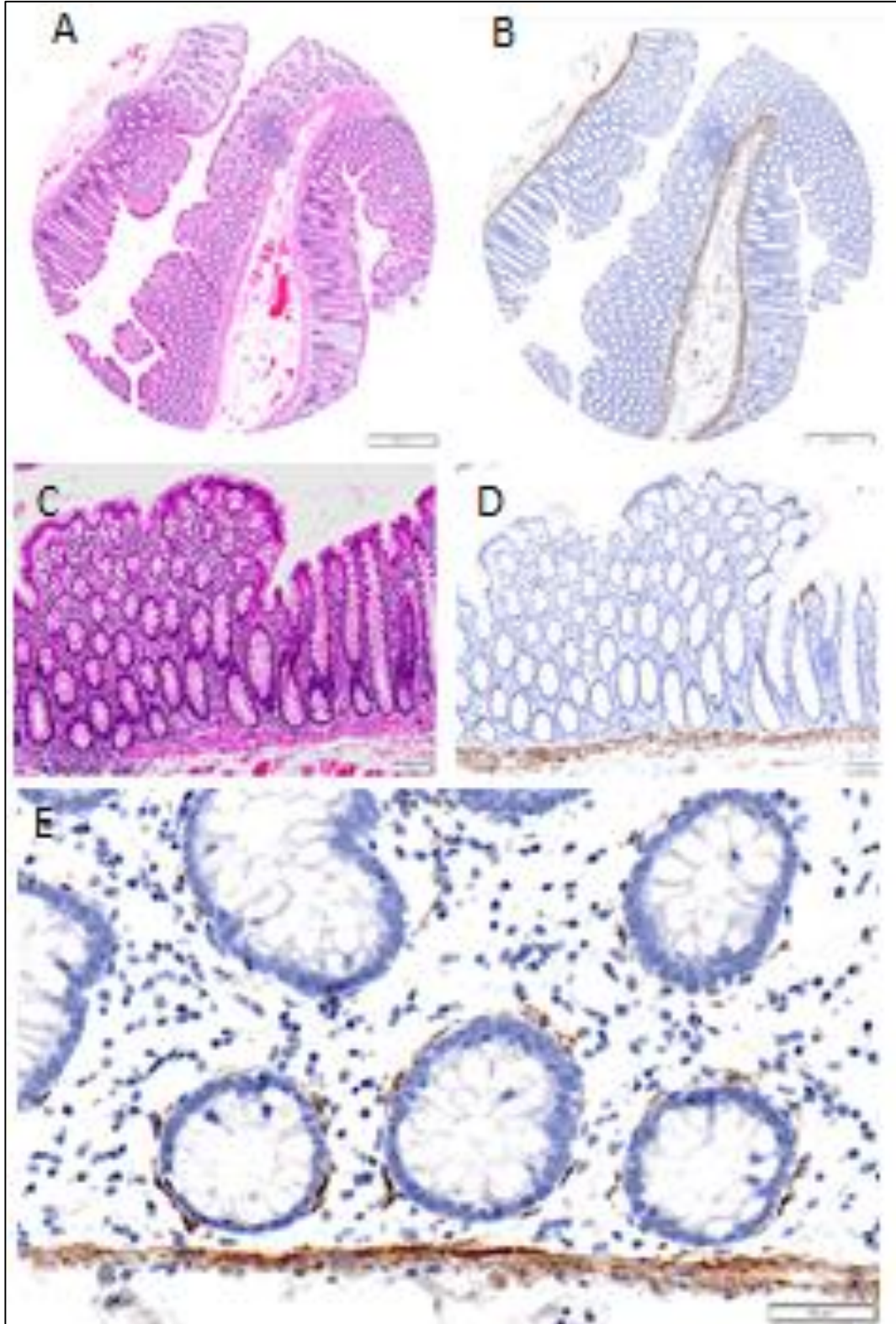
**Resim 4.7.** X12 kodlu olguya ait H&E ve CD146 boyamaları a)2x H&E, b) 2x CD146 c)4x H&E, d) 4x CD146. Subepitelyal myofibroblastlarda boyanma izlenmezken,  $\frac{1}{2}$  üst ve  $\frac{1}{2}$  alt perikriptal myofibroblastlar aynı yoğunlukta CD146 ile +3 pozitif boyanmıştır. Ayrıca muskularis mukoza, mezenkimal hücreler, lakteali çevreleyen düz kas ve perivasküler hücreler de kuvvetli pozitifdir.

**CD56:** Kolonik myofibroblastlar için literatürde tanımlanmamış olmakla birlikte vakaların %20'sinden azında perikriptal myofibroblastlarda +2/+3 pozitif boyanma izlenmiştir. Muskularis mukozada non spesifik zayıf pozitiflik mevcuttur. Subepitelyal myofibroblastlar negatiftir. Perivasküler hücreler ve lenfatik laktealleri çevreleyen hücreler pozitifdir (Resim 4.8).



**Resim 4.8.** X19 kodlu olguya ait H&E ve CD56 boyamaları a) 2x H&E, b) 2x a-CD56 c) 5x H&E, d) 5x CD56. Subepitelyal myofibroblastlar negatif, ½ üst ve ½ alt perikriptal myofibroblastlar ise +1 pozitif boyanmıştır. Ayrıca muskularis mukoza genelde negatiftir, aSMA pozitif mezenkimal hücrelerde ender olarak CD56 pozitiftir. Lakteali çevreleyen düz kas ve perivasküler hücreler de +1 pozitiftir.





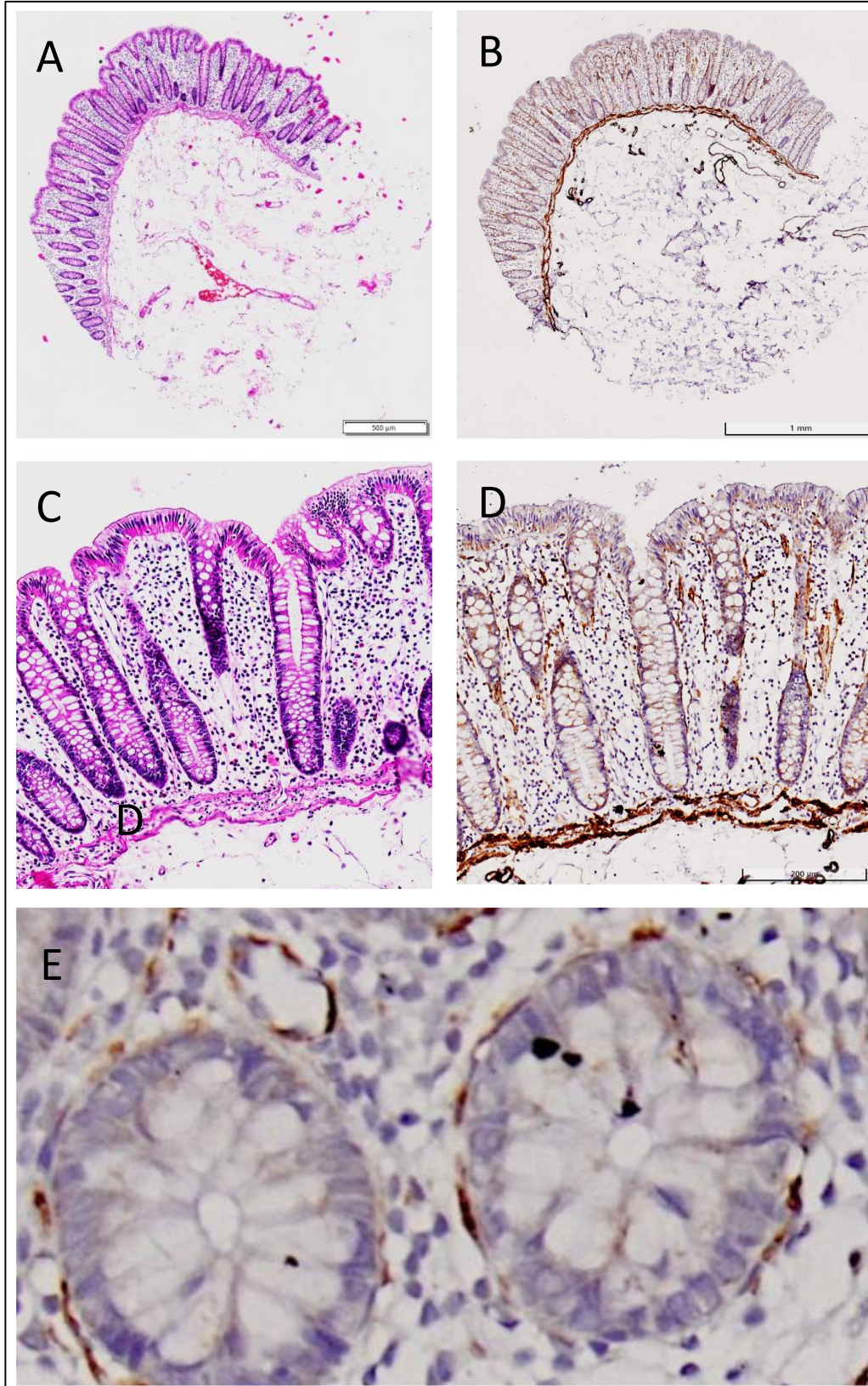
**Resim 4.9.** X17 kodlu olguya ait H&E ve desmin boyamaları a) 2x H&E, b) 2x desmin c)7x H&E, d) 7x desmin e) x14 nolu olguya ait desmin boyaması: Subepitelyal,  $\frac{1}{2}$  üst ve  $\frac{1}{2}$  alt perikriptal myofibroblastlar genelde desmin negatiftir. Muskularis mukoza desmin pozitifdir.  $\alpha$ -SMA pozitif mezenkimal hücreler, lakteali çevreleyen düz kas ve perivasküler hücreler de desmin negatiftir.

**Desmin:** Literatür ile uyumlu olarak subepitelyal ve perikriptomal myofibroblastlar desmin negatif bulunmuştur. Sadece bir vakada (%5) +1 pozitif boyanma izlenmiştir. Muskularis mukoza +3 pozitifdir. Yine literatür ile uyumlu olarak lenfatik laktealleri ve vasküler yapıları çevreleyen hücreler pozitifdir. Lamina propria  $\alpha$ -SMA pozitif hücreler desmin negatiftir (Resim 4.9)

**MYH11:** Muskularis mukoza ve perisitler MYH11 ile +3 pozitifdir. Subepitelyal myofibroblastlar negatiftir. Alt ve üst perikriptomal myofibroblastlar MYH11 ile +2 pozitifdir (Resim 4.10).

|                   | SMA | TMEM-119 | ZEB-1 | Desmin | AOC3 | CD146 | MYH11 | CD56      |
|-------------------|-----|----------|-------|--------|------|-------|-------|-----------|
| Mm                | +3  | 0        | 0/+1  | +3     | +3   | +3    | +3    | 0/+1      |
| Se Mf             | 0   | +2/+3    | 0/+1  | 0      | 0    | 0     | 0     | 0         |
| ½ Üst Pk MF       | +3  | +2/+3    | +1/+2 | 0      | +3   | +2/+1 | +2    | +1 +2 / 0 |
| ½ Alt Pk MF       | +3  | +3/+2    | +1/+2 | 0/+1   | +3   | +2/+1 | +2    | +1 +2 / 0 |
| Damar cevresi     | +3  | +3/+2    | 0     | +3     | 0    | 0     | +3    | 3         |
| Kapiller& Lakteal | +3  | +3/+2    | 0     | +3     | 0    | 0     | +3    | 3         |
| Network*          | +3  | +2       | 0     | 0      | +3   | +3    | +3    | +1        |
| Epit. Sit. **     | 0   | 0        | +2    | 0      | 0    | 0     | 0     | 0         |
| Endotel           | 0   | 0        | +3    | 0      | 0    | 3     | 0     | 0         |

**Tablo 4.2.** Subepitelyal ve perikriptomal myofibroblastları  $\alpha$ -SMA pozitif mezenkimal hücrelerden ayırmak için kullanılacak immunohistokimyasal belirteçler. Kısaltmalar: Mm: muskularis mukoza, Se Mf:subepitelyal myofibroblast, Pk Mf:perikriptomal myofibroblast, \*üst lamina propria “network”/ “mesh” tarzı boyanma, \*\*epitelde bazalde sitoplazmik boyanma.



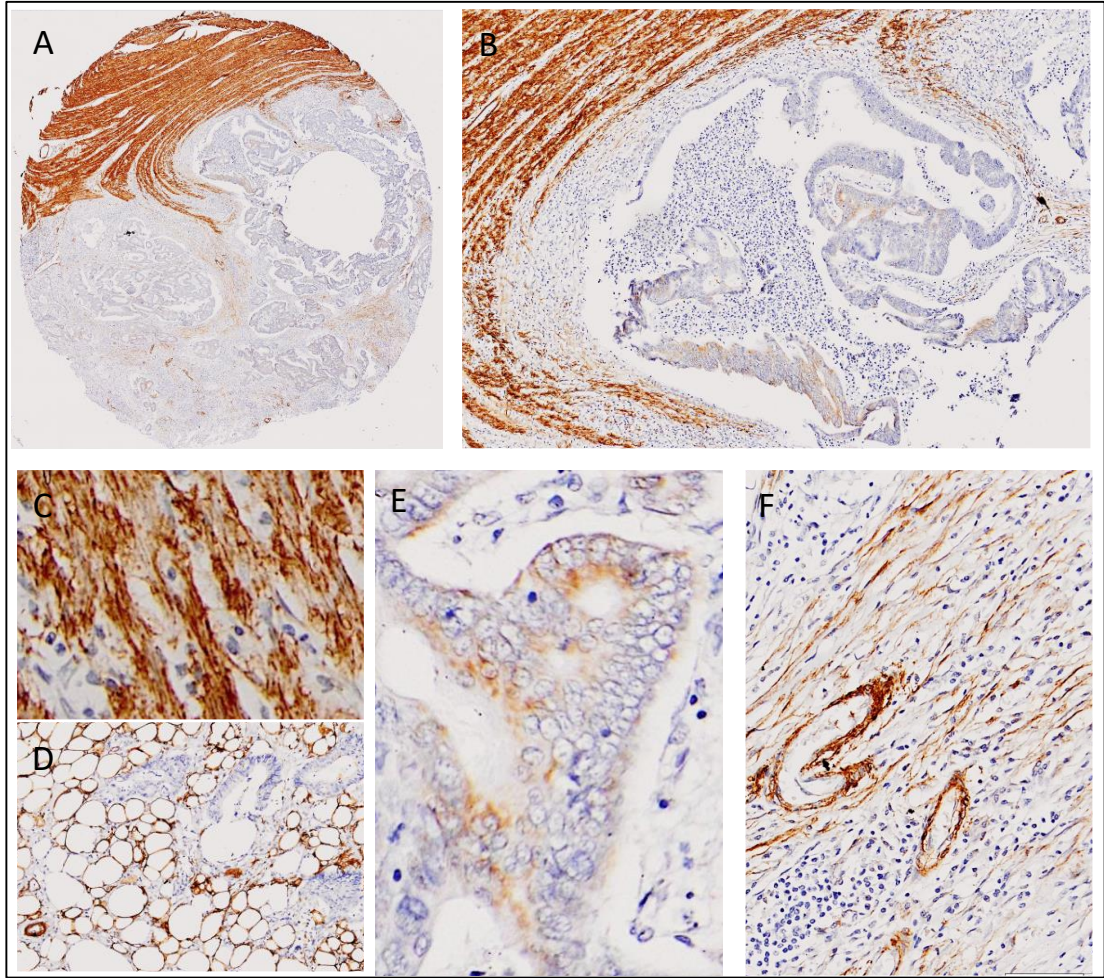
**Resim 4.10.** X5 kodlu dokuya ait MYH11 immünboyaması. A) HE 2x B) MYH11 2x C) HE 4x D) MYH11 4X E) MYH11 40X perikriptal myofibroblast pozitifliği.

## 4.2. Neoplastik süreçlerde kolonik subepitelyal ve perikriptal myofibroblastik belirteçlerin ifadesi

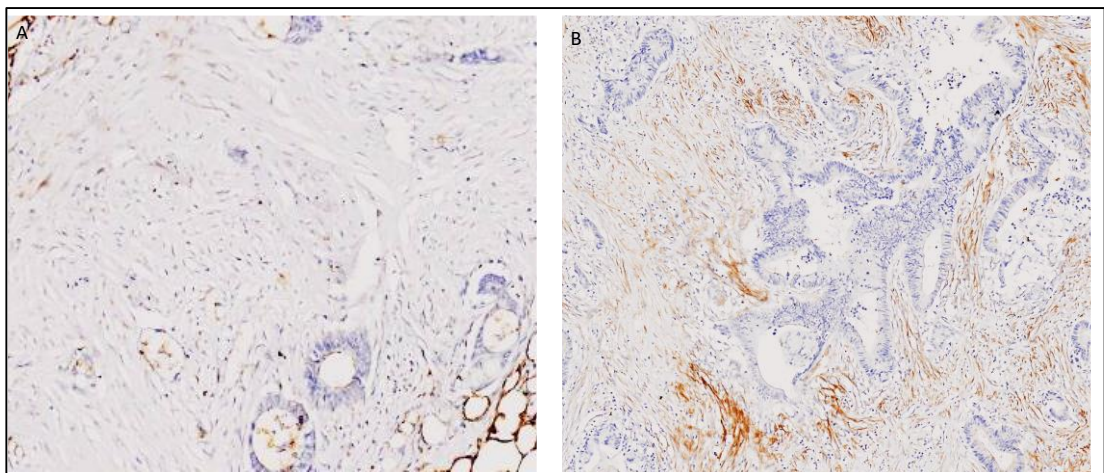
2016 yılı öncesine ait doku blokları kullanılarak 28 adet kolorektal kanser olgusundan hazırlanmış olan doku mikrodizinlerinden elde edilen kesitlere AOC3, TMEM-119 ve MYH11 immunboyamaları uygulanıp, Olympus VS 120 dijital görüntüleme sistemi yardımıyla dijital slayt haline getirilmiştir. Taranmış olan dijital slaytlar OlyVIA yazılımı ile görüntülenerek immunohistokimyasal skorlanmıştır. Normal kolon mukozasındaki benzer olarak konvansiyonel yöntem ile değerlendirilmiştir.

Tümör epitel hücrelerinde kayda değer boyanma saptanmamıştır. Sadece üç vakada tümör hücrelerinin yaklaşık %5'inde sitoplazmada +1 pozitif boyanma izlenmiştir. Tümöre eşlik eden desmoplastik stromada ise değerlendirme yapılırken oran skoru ayrıca not edilmiştir. Daha önce literatürdeki yayınlara baktığımızda (podoplanin ve caveolin-1 değerlendirmelerinde) stromal hücrelerdeki kayıp için dikkate alınan "cut of" değeri %30 olarak belirlenmiştir<sup>83,53</sup>. Ek 4'te belirtilen skorlama sistemi bu eşik değer doğrultusunda sadeleştirilerek Tablo 4.3 da özetlenmiştir. Bu üç antikorun birlikte değerlendirildiğinde 8 farklı durum olasılığı mevcuttur. En sık izlenen durum (vakaların %64.70'inde 11/17'sinde) AOC3 ve MYH11 stromal kaybı mevcutken TMEM119 ile stromal hücrelerin %30'undan fazlasında ekspresyonun korunmuş olduğu senaryo 3'tür. Her üç antikor ile ekspresyon kaybı ("triple" negatif) veya her üç antikorun %30'dan çok stromada ekspresyonunun korunduğu ("triple" pozitif) durum saptanmamış olmakla birlikte vaka sayısı az ve bazı olgularda doku tükendiği için net bir şey söylemek mümkün değildir (Tablo 4.4).

**AOC3:** Vakaların %75'inde (21/28) AOC3 stromal kaybı (%30'dan az) saptanmıştır. %21.42'sinde AOC3 stromada tamamen (6/28) negatiftir. Literatürde bildirildiği üzere endotel ve adipositlerde AOC3 ekspresyonu saptanmıştır<sup>97</sup>. Tümör hücrelerinde AOC3 negatiftir. Resim 4.11 ve Resim 4.12.

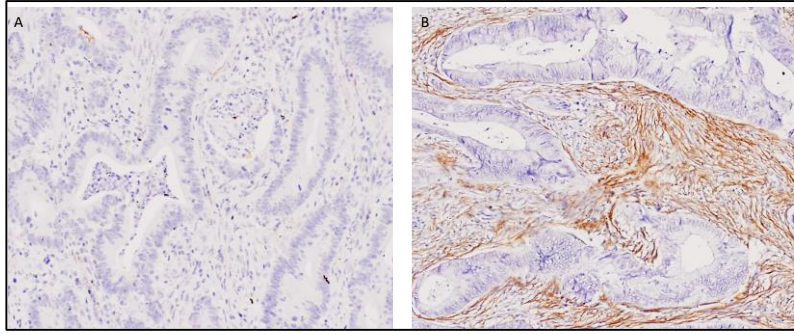


**Resim 4.11.** K6 16 nolu AOC3 doku boyaması A) 2x B) Tumor desmoplastik stroma ve muskularis propria C) Muskularis propria AOC3 ile +3 kuvvetli pozitif D) Adipositlerde AOC3 +3 pozitif E) Tumor apikal sitoplazması AOC3 ile +1 pozitif F) Damar +3 pozitifliği ile stromada %30 oranında +2 pozitifliği kıyaslanması.

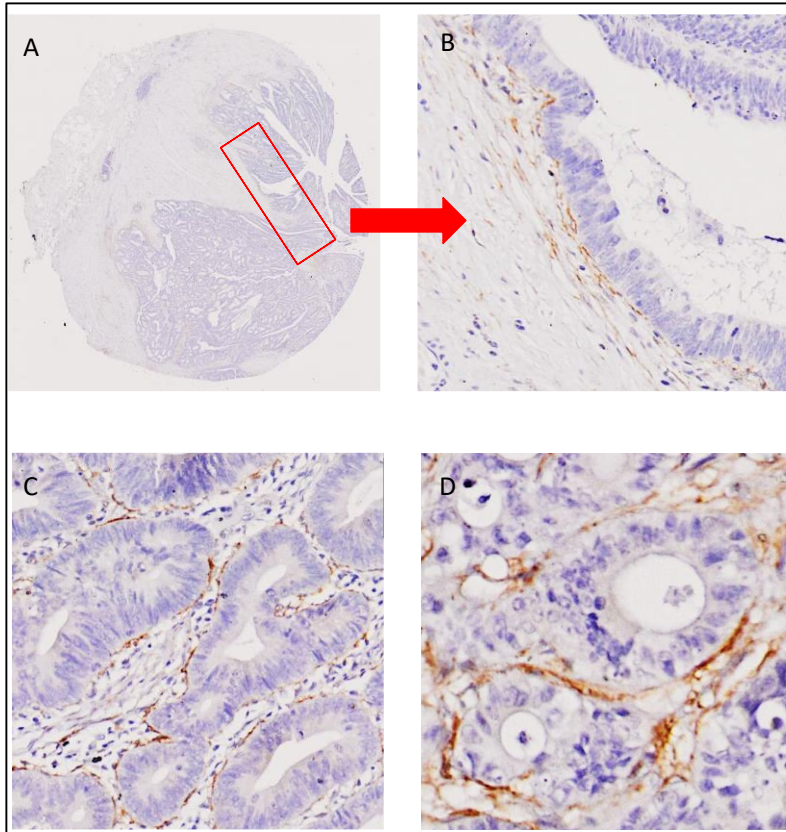


**Resim 4.12.** Kolon karsinomu desmoplastik stromasında AOC3 ekspresyonu A) K5 15 nolu dokuda AOC3 stromal kaybı B) K5 13 nolu dokuda stromada AOC3 ekspresyonu.

**TMEM-119:** Vakaların %70.83'ünde (17/24) TMEM119 ekspresyonu stromanın %30'undan fazlasında korunmuştur. %29.16'sında TMEM119 ekspresyon kaybı saptanmıştır(Resim 4.12). Ayrıca 4 vakada tümör ile çevre doku arasında subepitelyal lineer boyanma (invazyonu sınırlayan bazal membran benzeri boyanma (Resim 4.13) dikkati çekmiştir.

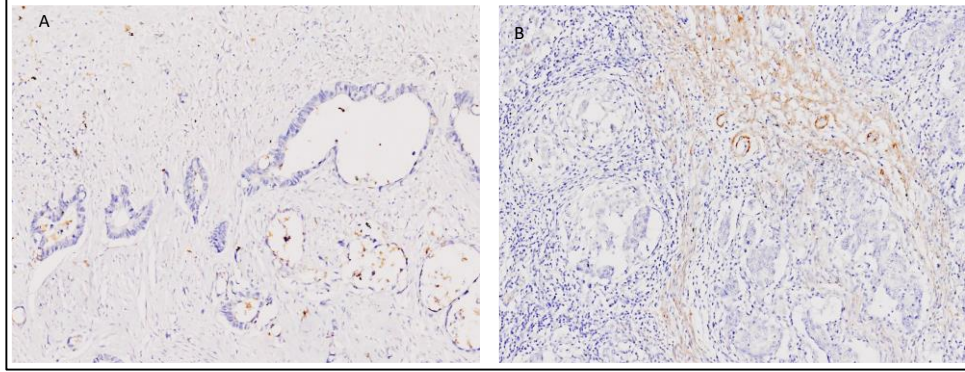


**Resim 4.13.** TMEM119 kolon karsinomu desmoplastik stroma ekspresyonu A) K6 27 nolu dokuda TMEM119 stromada kayıp B) K6 21 nolu dokuda TMEM119 stromada %30'un üzerinde +3 pozitiflik.



**Resim 4.14.** TMEM119 boyanma paternleri. A ve B) K6 29 nolu dokuda TMEM119 ile tümörü sınırlandıran bazal membran benzeri lineer boyanma C) K6 22 nolu doku tumor çevresinde subepitelyal TMEM119 pozitifliği D) K5 9 nolu doku TMEM119 subepitelyal/bazal membran benzeri / nest benzeri boyanma.

**MYH11:** Olguların %94.44'ünde (17/18) desmoplastik stroma MYH11 ekspresyon kaybı saptanmıştır. %5.55'inde (1/18) MYH11 ekspresyonu stromanın %30'undan fazlasında pozitifdir.



**Resim 4.15.** MYH11 desmoplastik stromada ekspresyonu A) K5 15 nolu dokuda MYH11 kaybı B) K6 19 nolu dokuda MYH11 ile stromada %50 +2 pozitiflik.

| Antikor | TM | Stromal Ekspresyon Oranı | DS | A  | E  |
|---------|----|--------------------------|----|----|----|
| AOC3    | 0  | 21 olgu <%30 (6 olgu %0) | +2 | +3 | +3 |
|         |    | 7 olgu >%30              |    |    |    |
| TMEM119 | 0  | 7 olgu <%30              | +3 | 0  | +3 |
|         |    | 17 olgu >%30             |    |    |    |
| MYH-11  | 0  | 1 olgu >%30              | +3 | 0  | +3 |
|         |    | 17 olgu <%30             |    |    |    |

**Tablo 4.3.** Bağımsız olarak her üç antikorun kolon kansinomlarında ekspresyonu: Kısaltmalar: TM:tümör epitelyal hücreleri, DS:Desmoplastik stroma, A:Adiposit, E:endotel

|           | AOC3          | TMEM119          | MYH11          | Vaka Sayısı |
|-----------|---------------|------------------|----------------|-------------|
| Senaryo 1 | AOC3 kayıp    | TMEM119 kayıp    | MYH11 kayıp    | 2           |
| Senaryo 2 | AOC3 kayıp    | TMEM119 kayıp    | MYH11 korunmuş | 0           |
| Senaryo 3 | AOC3 kayıp    | TMEM119 korunmuş | MYH11 kayıp    | 11          |
| Senaryo 4 | AOC3 kayıp    | TMEM119 korunmuş | MYH11 korunmuş | 1           |
| Senaryo 5 | AOC3 korunmuş | TMEM119 kayıp    | MYH11 kayıp    | 0           |
| Senaryo 6 | AOC3 korunmuş | TMEM119 kayıp    | MYH11 korunmuş | 1           |
| Senaryo 7 | AOC3 korunmuş | TMEM119 korunmuş | MYH11 kayıp    | 2           |
| Senaryo 8 | AOC3 korunmuş | TMEM119 korunmuş | MYH11 korunmuş | 0           |

**Tablo 4.4.** AOC3, TMEM119 ve MYH11 ekspresyon ilişkisi. Her üç antikor ile değerlendirilebilen kolon kanseri olgu sayısı (n) 17'dir.

## 5. TARTIŞMA

Son zamanlarda özellikle KİF terimi ile birlikte myofibroblastların tümör mikroçevresindeki bir hücre olmaktan çok, neoplastik sürecin başladığı andan itibaren aktif rolü olan hücreler olduğu anlaşılmıştır. Bu konuda yapılan araştırmalara yeni bir soluk da ilaç direnç mekanizmalarının myofibroblastlarda keşfedilmesi ile olmuştur. Bu tezin amacı karsinogenezde pek çok önemli rolü yeni yeni anlaşılan bu hücreleri daha yakından tanımak ve yeni araştırmalarda bu hücreleri doğru şekilde tanımlamada kullanılacak biobelirteçler belirlemektir. Myofibroblastlar her organda heterojen ara filament ekspresyonu sergilemektedir ve köken aldıkları hücreler de farklılık göstermektedir. Kolonda yaptığımız incelemeler sonucunda; Hsia ve arkadaşları ile uyumlu olarak; AOC3 ve MYH-11 ile subepitelyal ve perikriptal myofibroblastların saptanabildiğini doğruladık. Bunun dışında TMEM-119 ile de kolonik subepitelyal ve perikriptal myofibroblastların pozitif olduğunu literatürde ilk kez biz göstermiş olduk. Ayrıca ZEB-1 ile (daha ileri araştırma yapılması gerekmele birlikte) myofibroblastların bir kısmında kuvvetli pozitif boyanma EMT ile dinamik süreci yansıttığı olduğu düşünülmüştür. CD56 ile olan daha kısıtlı boyanma myofibroblastların plastisite yetenekleri ve gerektiğinde bu hücrelerin immunprofillerinin değişebileceğini düşündürmektedir. Daha ayrıntılı olarak bu biobelirteçleri aşağıda tartışılmıştır.

**PR2D3:** Kolonik perikriptal myofibroblastlara spesifik olarak Richman ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. Fibroblastlarda olmadığı ve desmin, flamin ve myosin koekspresyonu gösteren kontraktıl ve sekretuar özellikleri olan hücre grubu olarak gözlemlenmiştir. Kardiyak veya iskelet kası ile reaksiyon göstermeyen membranda yerleşimli 140 kDa büyüklüğünde IgG tipinde bir antikordur. Sadece kolondaki değil umbilikal korddaki ve karaciğerdeki myofibroblastik özellikler gösteren hücrelerde de ekspresyonu mevcuttur<sup>96</sup>. PR2D3 boyanması FFPE dokularda myofibroblastları tanımlamak için uygun değildir.

**AOC3/VAP1 (Bakır içeren amin oksidaz-3 / Vasküler adezyon proteini):** AOC3 geni 17. Kromozomda lokalizedir. 170-180 kDa büyüklüğünde sialize homodimerik transmembran glikoproteini olan, bakır içeren semikarbazid duyarlı amin oksidaz olan



VAP1'i sentezler. Egzojen ve endojen aminlerin oksidatif deaminasyonunu katalize eden semikarbazid duyarlı bakır içeren bir oksidazdır(örnek lizil oksidaz). Endotelde, adipositlerde hücre membranında yerleştiği bilinmekle birlikte; metaloproteinazlarca yıkımı ile soluble VAP-1 oluşur ve dolaşımdaki seviyesinin romatoid artrit, inflamatuvar bağırsak hastalıkları ve inflamatuvar karaciğer hastalıklarında arttığı görülmüştür<sup>97</sup>. Karaciğer fibrozisinden sorumlu Disse aralığındaki  $\alpha$ -SMA ve CD90 pozitif hücrelerde VAP-1 ekspresyonunun arttığı gözlemlenmiştir. AOC3 nakavt farelerde ve anti-VAP-1 antikoru ile tedavi edilmiş farelerde fibrozisin az olduğu kanıtlanmıştır<sup>98</sup>. Öte yandan kolorektal karsinomlarda soluble VAP-1 seviyesi ile ilgili çalışmalar birbiri ile çelişmektedir. Kontrol grubunda serum VAP-1 seviyesi düşük; kolorektal karsinom grubunda serum VAP-1 seviyesi yüksek bulunmuştur. Kolorektal karsinom grubunda hastalık evresi ilerledikçe ve venöz invazyon, lenf nodu tutulumu ve karaciğer metastazı gibi durumlarda serum VAP-1 seviyesinin anlamlı olarak daha düşük olduğu gözlemlenmiştir<sup>99</sup>. Serum VAP-1 seviyesinin ilk çalışmada ELİSA ile ölçüldüğü ve ancak immunflorometrik analiz ile ölçüldüğü takdirde kolorektal karsinomu olan bireylerdeki serum soluble VAP-1 seviyesinin kontrol grubuna kıyasla daha düşük olduğu sonucuna varılmıştır<sup>100</sup>. Bu Western blot tekniği ile de doğrulanmıştır. VAP-1'in immunhistokimyasal metod ile normal kolonda muskularis mukoza ve damarda ekspresyonu tanımlanmış ancak kolorektal karsinomlarda tümör hücrelerinde negatif veya nadiren zayıf sitoplazmik pozitiflik bildirilmiştir. İmmunfloresan incelemede VAP-1'in perisitlerde eksprese olduğu gösterilmiştir<sup>100</sup>. Hsia ve arkadaşları ise AOC3'ün PR2D3 ile aynı determinantı tanıdığını ve bu sayede aktive fibroblastlar ile kolonik perikriptal myofibroblastların ayırt edilebileceğini göstermiştir. NKX2-3 (NK2 transcription factor-related, locus 3) ve LRRC17 (Leucine-rich repeat-containing 17) genlerinin myofibroblastlarda upregüle olurken ciltten edilen fibroblastlarda downregülasyonu saptanmıştır. SHOX2 (Short stature homeobox 2) ve TBX5 (T-box 5) geninin fibroblastlarda upregülasyonu ve myofibroblastlarda saptanmaması da bu dört genin myofibroblastik ve fibroblastik ayırmada yardımcı olduğunu göstermiştir. AOC3 ekspresyonu ince bağırsak ve kolon arasında dahi farklılık gösterebilir. Myofibroblastların heterojen bir popülasyon olduğu ve normal dokulardaki

farklılıklarının tümör gruplarına da yansıdığı vurgulanmıştır. Örneğin meme kanseri ve cilt skuamöz hücreli karsinomlarında  $\alpha$ -SMA pozitif myofibroblastlarda AOC3 ekspresyonu yoktur. Ancak uterin serviks karsinomlarında  $\alpha$ -SMA ekspresyonu olmaksızın AOC3 pozitif grup saptanmıştır<sup>101</sup>.

**ZEB1 (zinc finger E-box-binding homeobox 1 / deltaEF1):** ZEB ailesi iki üye içermektedir: ZEB-1 (deltaEF1) ve ZEB-2 (SIP1:Smad-interacting protein-1). Embriyogenezde nöral krest hücrelerinin migrasyonunda görevlidirler. ZEB-1 null fareler majör iskelet anomalileri nedeniyle perinatal ölüren; ZEB-2 null farelerde nöral tüp defekti gelişmiştir<sup>102</sup>. ZEB-1 TCF-8 geni tarafından kodlanan transkripsiyon faktörüdür<sup>103</sup>. TGF- $\beta$  tarafından aktive edildiği bilinmektedir. Epitelyal hücreler birbirleri ile ve bazal membran ile (örneğin integrinler aracılığı ile) bağlantıları olan hücreler iken bu bağlantıların kaybı ile, kortikal aktin filamanlarının organizasyonu ve myofibroblastik özellikler kazanımı ile daha mobil bir hücre grubu olan mezenkimal hücrelere dönüşebilme yeteneğine sahiptirler. Bu plastisite endotelial hücrelerde de mevcuttur. Embriyonik gelişimde fizyolojik olarak görülebilen EMT; tümör gelişiminde agresiflik, invazyon ve metastaz ile ilişkilendirilmiştir. EMT'yi düzenleyen bir çok transkripsiyon faktörü (SNAIL, SOX9, PRX1, TWIST1 vb) olmakla birlikte ZEB1 anahtar rol oynamaktadır. TGF- $\beta$  sinyali MAP kinaz üzerinden SNAIL ise direkt olarak ZEB1 ekspresyonu indüklenir<sup>104</sup>. ZEB1 özellikle E-kaderin down regülasyonu ve N-kaderin up regülasyonu ile epitel mezenkimal dönüşümü sağlar. EMT dışında ZEB, kas gelişiminde negatif regülatuar olarak görev almaktadır<sup>105</sup>. E-box (enhancer box) alt grubuna bağlanarak, MEF-2 'yi inhibe eder ancak ilerleyen dönemde biriken bHLH (basic helix-loop-helix family) sayesinde ZEB E-box etkileşimi bozulur ve böylelikle ZEB kas gelişiminde zamansal olarak değişen bir regülasyon yapmış olur<sup>105</sup>. ZEB-1'in sadece EMT ile ilgili genler değil apoptoz ilişkili genler üzerine de etkisi mevcuttur. Kortikal nöronlarda iskemik durumlarda ZEB-1 birikimi proapoptotik TAp73 (p53 homologu olan p73'ün tüm boyut izoformu) represyonu ile hücrenin apoptozdan kaçmasını sağlar<sup>106</sup>. ZEB-1 null hücre pasajlarında erken replikatif senescence (erken replikatif yaşlanma) farkedilmiştir. Cdkn2a olarak da bilinen Ink4a yolağının ZEB-1 mutasyonunda aktive olduğu düşüncesiyle yapılan PCR çalışmasında ZEB-1

mutasyonu sonucunda gelişen erken replikatif yaşlanmanın, Ink4a bağımsız olduğu sonucuna varılmıştır<sup>107</sup>. Kolon kanserinde kemoterapiye rezistan hücre hatları incelendiğinde ZEB-1 ekspresyonunun yüksek olduğu saptanmıştır<sup>108</sup>. Kanser genom atlası KCNQ1OT1 ifadesi yüksek olan kolorektal karsinom grubunda sağkalımın düşük olduğu bilinmektedir. ZEB-1 KCNQ1OT1'in upregülasyonunu düzenleyen bir transkripsiyon faktörüdür<sup>109</sup>. Kolorektal, gastrik, hepatoselüler ve pankreas karsinomlarını içeren (13 makalenin dahil edildiği yaklaşık 1600 hasta grubunda) bir meta-analizde ZEB-1'in genel sağkalım için önemli bir gösterge olduğu ve prognostik olarak kullanılabileceği bildirilmiştir<sup>110</sup>.

**TMEM-119 (Transmembrane protein 119) (osteoblast induction factor: Obif):**

Datasetler üzerinden sistemik bir ön araştırma yapılarak belirlenen aday belirteçler arasından; beyindeki mikrogliya hücrelerinde RNA ekspresyon seviyesi yüksek olan TMEM119'un makrofajlarda eksprese olmadığı ve mikrogliaya özgün olduğu kanıtlanmıştır<sup>111</sup>. Egzojen BMP2 yokluğunda TMEM119'un BMP2 indüksiyonu yaparak myoblastların osteoblastlara diferansiasyonunu indüklediği ve kemik rejenerasyonunda önemli olduğu bilinmektedir<sup>112</sup>. Osteoblast diferansiasyonunda önemli olduğu bilinen TMEM119'un; osteosarkom gelişiminde rolü olup olmadığı merak edilmiş ve normal osteoblastlara kıyasla osteosarkoma ait data setlerinde istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek TMEM119 mRNA ekspresyonu olduğu farkedilmiştir. TMEM119 immunhistokimyasal olarak ekspresyonu düşük ve yüksek olarak iki grubu ayrıldığında; TMEM119 ekspresyonu yüksek olan osteosarkom hastalarında, uzak metastaz ve tümör boyutu artmış iken genel sağkalım düşüktür. TMEM119 nakavtında tümör gelişimi önlenmiş, migrasyon ve invazyon yeteneği azalmıştır. Ayrıca Bcl2 (antiapoptotik) seviyelerinde önemli bir düşüşe; kaspaz-8 ve kaspaz-9 (proapoptotik) proteinlerinde bir artışa neden olmuştur<sup>113</sup>. Benzer şekilde TMEM119 gastrik karsinomlarda normal mide mukozasına kıyasla yüksek bulunmuş olup, TMEM119 susturulduğunda apoptozisin indüklendiği (Bax/Bcl2 oranı ve kaspaz 3 artışı ile) görülmüştür<sup>114</sup>. STAT sinyal yolağı büyüme ve farklılaşma gibi fizyolojik süreçlerde geçici olarak aktive olmaktadır. Sürekli abnormal STAT aktivasyonu gastrik kanserlerde kötü prognoz ile ilişkilidir. TMEM119 yüksek

ekspresyonu olan gastrik kanserlerde STAT3 yolağı ve bu yolağın aşığı basamaklarının MMP2 ve MMP9 aktivasyonu yanısıra VEGF artışı izlenmiştir. STAT3 bloğı ile VEGF seviyeleri, metastaz ve invazyon azalmıştır<sup>115</sup>. Biri ERG pozitif prostat kanser grubu diğeri memenin filloides tümörleri olmak üzere kanser gelişimi ve progresyonu sırasında ekspresyonu artan genleri belirlemek amacıyla mRNA seviyelerini incelendiğı iki araştırmada TMEM119 overekspresyonu gözlenmiştir. Ancak her iki araştırma grubunda da TMEM119 ile ilgili patogenezi ayrıntılandırılmamıştır<sup>116,117</sup>.

**MYH11 (myosin heavy chain 11-smooth muscle myosin):** MYH11 geni tarafından düz kas myosin ailesinden myosin ağır zincir grubuna ait bir protein olan Myosin-11 kodlanmaktadır<sup>118</sup>. Mezenkimanjioblastlar pek çok dokuya (osteo, kondro ve adipositik hücreler yanısıra damar düz kası ve perisitlere) dönüşebilme yeteneğı olan CD146 ve NG2 pozitif hücrelerdir. PDGF, FGF2 ve TGF- $\beta$  sinyalleri ile vasküler mezenkimal kök hücre, immatür perisit veya immatür vasküler düz kas hücrelerine ve sonra da perisit ve vasküler düz kas hücrelerine diferansiye olabilirler. Vasküler düz kas hücrelerinin kalponin ve MYH11 pozitifken; perisitlerin NG2 , CD274(PD-L1), VCAM ve DLK1 pozitif olduğı gösterilmiştir <sup>119</sup>. Ayrıca SEİMF'ların ilk olarak AOC3 ve PR2D3 ile pozitif olduğı ve sonrasında ise MYH11 (yayınlanmamış data) ekspresyonu gösterilmiştir<sup>101</sup>. Zebra balığında yapılan çalışmalarda Myh11 mutasyonu sonucunda (bir çeşit fonksiyon kazandıran mutasyon) sadece posterior intestinde invaziv tümör gelişimi saptanmıştır. Anterior intestinde gelişmemesi Myh11 ekspresyonunun bağırsağın farklı bölgelerinde değıştiğı ve ileri araştırmaya ihtiyaç olduğunu düşündürmüştür<sup>120</sup>. Somatik MYH11 mutasyonu mikrosatellit instabil kolorektal karsinom ile ilişkili iken; germline mutasyonu Peutz-Jeghers Sendromu ile ilişkilidir<sup>121</sup>. Herediter non polipozis koli sendromundaki adenomlarda MYH11 mutasyonu yokken karsinomlarda MYH11 mutasyonunun saptanması MYH11 tümörogenezdeki önemini vurgulamaktadır<sup>122</sup>. Kolorektal karsinomlarda MYH-11 gen ekspresyon seviyeleri düşük olan grup kötü prognoz ile ilişkili bulunmuştur. Kan basıncının kontrolünde aktin ve myosin arasındaki sürekli etkileşim rol oynamaktadır. Sendromik olmayan aort anevrizmalarında yapılan araştırmalarda bu iki yapı taşıını kodlayan sırası ile ACTA

ve MYH11 genlerindeki mutasyonlar keşfedilmiştir<sup>123</sup>. CBFb-MYH11 hibrid proteini myeloid dfieransasyonu bloklayarak AML gelişiminde rol oyanamaktadır<sup>124</sup>.

**CD56 / NCAM (Neural cell adhesion molecule):** CD56 immunglobüin süper ailesinden ve alternatif splicing ile çeşitli izoformları olduğu bilinen bir hücre yüzey glikoproteinidir. Ca bağımsız homofilik adezyon yanısıra ekstraselüler matriks proteinleri ya da FGFR'ine bağlanma yeteneği de mevcuttur<sup>125</sup>. Golgiden derive NCAM içeren veziküller kinesin1 aracılı transport ile sitozolden hücre membranına hareket eder(NCAM aktivasyonu)<sup>125</sup>. CD56 ilk, embriyoda nöronal agregasyonda görevli olan, erişkinde ise sinir hücrelerinde ve glial hücrelerde bulunan hücre yüzey komponenti olarak tanımlanmıştır. Sonraları sinir dışı dokularda da ekspresyonu gösterilmiştir: NK (natural killer) hücreleri, Leydig hücreleri, iskelet kası (aksonlar ile arasındaki sinaptogenezde) ve karaciğerdeki perisinüzoidal stellat hücrelerde<sup>126</sup>. Ito hücre tümörü (spongiotic perisitoma)yı tanımlayan çalışmada da CD56 ekspresyonu gösterilmiştir<sup>127</sup>. CD56 ekspresyonu intraabdomial neoplazilerde araştırılmış GİST (gastrointestinal stromal tümör) 'lerin yaklaşık %20'sinde pozitif bulunmuştur. Ayrıca vaka sayısı az olmakla birlikte leiomyosarkom, leiomyom,schwannom, granüler hücreli tümör, MPSKT (malign periferik sinir kılıfı tümörü), malign PEComa, düşük dereceli myofibroblastik sarkom gibi diğer pek çok non-nörojenik tümörde de CD56 ekspresyonu saptanmıştır<sup>128</sup>.

**CD146 (MCAM: melanoma cell adhesion molecule):** CD146 kalsiyum bağımsız hücre adezyon (heterofilik) molekülüdür. İmmunglobulin süperaillesinden bir membran glikoproteinidir. Meme karsinomlarında CD146 kaybı olur ve overekspresyon durumunda koheziv büyüme paterni gösteren küçük tümör gelişimi izlenmiştir. Ancak melanomlarda CD146 overekspresyonu tümör gelişimi ve progresyonu ile koreledir. Ayrıca intermedier trofoblastlarda eksprese olarak plasentanın implantasyon sırasında uterin düz kastaki reseptörüne bağlar ve implantasyonu sınırlar<sup>129</sup>. Over seröz karsinomlarında tümör hücrelerinde CD146 ekspresyonu bağımsız negatif prognostik faktör olarak bulunmuştur ve kemorezistans ile yüksek korelasyon dikkati çekmiştir<sup>130</sup>. Donuk omuzdaki fibrotik süreçte CD248 ve palladin ile beraber CD146'nın fibroblast aktivasyonunu göstermek amacıyla

kullanılmıştır<sup>79</sup>. CD146 STAT3 aktivasyonu ile E-kadherin ekspresyonunu inhibe eder ve ERK aracılığı ile N-kadherin ekspresyonunu indükler. E-kadherin N-kadherin “switch” i sayesinde EMT’de önemli rol oynamaktadır<sup>131</sup>.

**Neoplastik gelişim sürecinde myofibroblastların rolü:** Normal kolon stromasında baskın hücre grubu vimentin+,  $\alpha$ -SMA - ve SMM-fibroblastlar iken sadece perikriptal alanda myofibroblastlar izlenmektedir. Ancak polip stromasında baskın stromal hücre vimentin+,  $\alpha$ -SMA + ve SMM+ myofibroblastlardır<sup>132 133</sup>. Yapılan çalışmalarda IL1a'nin indüklediği protein kinaz C aktivasyonu ile reaktif oksijen ürünlerinin artması nükleusta COX-2 promotörü üzerine etkilidir. Ancak bu tek başına tüm patogeneze sorumlu değildir ki bu nedenle reaktif oksijen ürünü oluşumunun engellenmesi ya da Protein Kinaz C inaktivasyonu Cox-2 seviyesini düşürmeye yetmemektedir. Ancak FAP hastalarında Cox-2 inhibitörü ilaçların alınması IL1a aracılı Cox-2 ekspresyonunu bloke ederek polip gelişimini önlemektedir ve bu süreçte myofibroblastların asıl hücre oldukları düşünülmektedir<sup>134</sup>. Normal kolon adenom ve adenokarsinomlar Cox-2 ekspresyonu incelendiğinde, subepitelyal myofibroblastların normal kolon mukozasında Cox-2 eksprese ettiği neredeyse tüm vakalarda izlenmiştir. Ancak adenomada Cox-2 ekspresyonu granülasyon dokusunu oluşturan tüm hücrelerde iken adenokarsinomlarda stromal myofibroblast harici tümör hücrelerinde de Cox-2 ekspresyonu saptanmıştır<sup>133</sup>. Ayrıca mide hiperplastik poliplerinde de stromal myofibroblastlarda Cox-2 ekspresyonu saptanmıştır<sup>135</sup>. TIMP-1 (Tissue inhibitor of matrix metalloproteinases 1) metaloproteinazların proteolitik aktivitesini önler. Ayrıca antiapoptotik olduğu ve malign transformasyonda rol oynadığı bilinmektedir. Adenomatöz poliplere kıyasla adenokarsinomlarda, invazyon bölgesindeki myofibroblastlarda mRNA seviyesinde artış ve immunohistokimyasal olarak da korelasyon dikkati çekmiştir<sup>136</sup>. Normal kolonda stromal BMPRII (BMP type II receptor) epitelyal büyümeyi inhibe etmede görevlidir. BMPRII inaktivasyonu epitelde proliferasyona apoptoz inhibisyonuna ve polip formasyonuna yol açar. Bu da stromal hücrelerin; sadece tümör invazyonu ya da metastazı aşamasında değil başlangıcında da önemli rol oynadığını kanıtlar<sup>137</sup>. APC mutant farelerde Epimorfin delesyonunda polip gelişimi HGF azalması ve TGF- $\beta$  artışı ile önlenmiştir (sayı ve boyut

azalmış)<sup>138</sup>. Normal kolon myofibroblastları ile poliplerdeki myofibroblastlar kıyaslandığında poliplerden izole edilen myofibroblastların farklı bir protein içerdiği görülmüştür (yeterli tanımlanmamış). Ayrıca indirekt olarak PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) aktivitesini artırarak kanser hücrelerinin proliferasyonunu sağladığı gözlemlenmiştir<sup>139</sup>. Epimorfin, pankreas ve nöronlardaki vezikül-docking protein sintaksin ailesine homolog olan membran ilişkili bir proteindir (diğer adı sintaksin 2'dir). Myofibroblastlarda epimorfin ekspresyonu arttığında Bmp4 sentezi de artmış bu da epimorfinin SEİMF'lar ile epitel arasındaki karşılıklı konuşmada önemli olduğunu göstermektedir<sup>3</sup>. Epimorfin nakavt farelerde ince bağırsak uzunluğu, kript füzyonu ve kript-epitelyal proliferasyonu artmış bulunmuştur<sup>75</sup>. Epimorfin delesyonu ince bağırsakta polip gelişimini SMAD2/3 ve TGF- $\beta$  -b sinyal artışı ve HGF (hepatocyte growth factor) azalışı ile önler<sup>75</sup>. Epimorfin SEİMF ve perisitlerde pozitifdir<sup>76</sup>.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Myofibroblastlar köken aldıkları farklı hücreler nedeniyle ve içerdikleri ara filamanların çeşitliliği ve kombinasyonları nedeniyle heterojen bir popülasyondur. Ayrıca buldukları organa göre de farklı biyobelirteçler eksprese etmektedirler. Yapılan bu çalışma kapsamında; literatürde ilk kez TMEM-119'un kolonik subepitelyal ve perikriptal myofibroblastlara özgün olduğunu kanıtlamış olduk.

EMT yolağı ile myofibroblast oluşumu bilinmektedir. Kolonik subepitelyal ve perikriptal myofibroblastların bir kısmının nükleer ZEB-1 pozitif oluşu bunu destekler niteliktedir. Epitelde izlenen sitoplazmik ZEB-1 pozitifliği ileri araştırma gerektirmektedir. CD146 da E-kaderin'in N-kaderin'e değişimi ile EMT'de rol alan adezyon molekülüdür ve kolonik subepitelyal ve perikriptal myofibroblastlarda pozitifdir. CD146 E-kaderin N-kaderin değişimi ile EMT de rol oynayan bir heterofilik adezyon molekülü olup  $\alpha$ -SMA ve AOC3 ile benzer olmakla birlikte daha zayıf olarak perikriptal myofibroblastlarda pozitifdir.

PR2D3 literatürdekine benzer olarak FFPE dokularda reaksiyon vermemektedir. Taze dokularda ifadesinin değerlendirilmesi gerekmektedir.

AOC3 kolonik myofibroblastları fibroblastlardan ayırt etmede kullanılabildiği literatürde bildirilmiştir. Bu çalışma kapsamında da bulgularımız bu gözlemleri desteklemektedir. Ayrıca kolorektal karsinomlarda AOC3 ekspresyonunun stromal hücrelerdeki kaybı; myofibroblastların karsinogenezdeki rolü olabileceğini işaret etmektedir.

Kolonik subepitelyal ve perikriptal myofibroblastların bir alt grubunda CD56 ekspresyonu mevcuttur. Heterojen doğadaki myofibroblast popülasyonunun CD56 ekspresyonunun da heterojen olması şaşırtıcı değildir. Ancak bu farklılığın aydınlatılması için (myofibroblastların plastisitesi: nöronal farklılaşma?) ileri araştırmalar gerekmektedir.

MYH11 normal kolon mukozasında subepitelyal alandaki myofibroblastlarda negatif olmakla birlikte alt ve üst myofibroblastlarda +2 pozitifdir ve kolorektal karsinomlarda genelde AOC3 ile korele olarak stromada ekspresyon kaybı dikkati



çekmiştir. Ayrıca mezenterik yağ dokuda AOC3 pozitifliği, bu belirtecin yağ dokuyu da boyadığını göstermiştir.

Sonuç olarak bu çalışmada; normal kolon mukozasında TMEM-119 ve AOC3 ekspresyonu gösteren kolonik subepitelyal ve perikriptal myofibroblastların invaziv kolorektal karsinomlarda stromada kayıp gösterdiği saptanmıştır. Kolonik myofibroblastların ZEB1 ve CD56 ekspresyon profillerine yönelik ileri araştırma yapılması gerekmektedir. Son zamanlarda KİF, ilaç direnci ya da tümör progresyonu çalışmalarında myofibroblastları tanımlamada kullanılacak TMEM119 antikorunu bu tezde saptanmıştır. Ayrıca  $\alpha$ -SMA dışında farklı immünohistokimyasal biyobelirteçlerin kolonik subepitelyal hücrelerde saptanması sayesinde bu hücrelerin değişik hastalık durumlarındaki rollerinin daha detaylı araştırılabilmesinin yolu açılmıştır.

**KAYNAKLAR**

- [1] Mills SE: Histology for Pathologist. 4th ed. USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2012.
- [2] Tommelein J, Verset L, Boterberg T, Demetter P, Bracke M, De Wever O: Cancer-associated fibroblasts connect metastasis-promoting communication in colorectal cancer. *Front Oncol* 2015, 5:63.
- [3] Powell DW, Pinchuk IV, Saada JI, Chen X, Mifflin RC: Mesenchymal cells of the intestinal lamina propria. *Annu Rev Physiol* 2011, 73:213-37.
- [4] Eyden B: The myofibroblast: phenotypic characterization as a prerequisite to understanding its functions in translational medicine. *J Cell Mol Med* 2008, 12:22-37.
- [5] Powell DW, Adegboyega PA, Di Mari JF, Mifflin RC: Epithelial cells and their neighbors I. Role of intestinal myofibroblasts in development, repair, and cancer. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 2005, 289:G2-7.
- [6] Mifflin RC, Pinchuk IV, Saada JI, Powell DW: Intestinal myofibroblasts: targets for stem cell therapy. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 2011, 300:G684-96.
- [7] De Wever O, Demetter P, Mareel M, Bracke M: Stromal myofibroblasts are drivers of invasive cancer growth. *Int J Cancer* 2008, 123:2229-38.
- [8] Shiga K, Hara M, Nagasaki T, Sato T, Takahashi H, Takeyama H: Cancer-Associated Fibroblasts: Their Characteristics and Their Roles in Tumor Growth. *Cancers (Basel)* 2015, 7:2443-58.
- [9] Kalluri R: The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* 2016, 16:582-98.
- [10] Chee YC, Pahnke J, Bunte R, Adsool VA, Madan B, Virshup DM: Intrinsic Xenobiotic Resistance of the Intestinal Stem Cell Niche. *Dev Cell* 2018, 46:681-95 e5.
- [11] Yen TH, Wright NA: The gastrointestinal tract stem cell niche. *Stem Cell Rev* 2006, 2:203-12.
- [12] Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G, Hinz B: The myofibroblast in wound healing and fibrosis: answered and unanswered questions. *F1000Res* 2016, 5.
- [13] Powell DW: Myofibroblasts: paracrine cells important in health and disease. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 2000, 111:271-92; discussion 92-3.
- [14] Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA: Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002, 3:349-63.
- [15] Joseph NM, Mukoyama YS, Mosher JT, Jaegle M, Crone SA, Dormand EL, Lee KF, Meijer D, Anderson DJ, Morrison SJ: Neural crest stem cells undergo multilineage differentiation in developing peripheral nerves to generate endoneurial fibroblasts in addition to Schwann cells. *Development* 2004, 131:5599-612.

- [16] Wilm B, Ipenberg A, Hastie ND, Burch JB, Bader DM: The serosal mesothelium is a major source of smooth muscle cells of the gut vasculature. *Development* 2005, 132:5317-28.
- [17] Brittan M, Wright NA: Stem cell in gastrointestinal structure and neoplastic development. *Gut* 2004, 53:899-910.
- [18] Wang YC, Chen Q, Luo JM, Nie J, Meng QH, Shuai W, Xie H, Xia JM, Wang H: Notch1 promotes the pericyte-myofibroblast transition in idiopathic pulmonary fibrosis through the PDGFR/ROCK1 signal pathway. *Exp Mol Med* 2019, 51:35.
- [19] Sato T, Vries RG, Snippert HJ, van de Wetering M, Barker N, Stange DE, van Es JH, Abo A, Kujala P, Peters PJ, Clevers H: Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* 2009, 459:262-5.
- [20] Lahar N, Lei NY, Wang J, Jabaji Z, Tung SC, Joshi V, Lewis M, Stelzner M, Martin MG, Dunn JC: Intestinal subepithelial myofibroblasts support in vitro and in vivo growth of human small intestinal epithelium. *PLoS One* 2011, 6:e26898.
- [21] Lei NY, Jabaji Z, Wang J, Joshi VS, Brinkley GJ, Khalil H, Wang F, Jaroszewicz A, Pellegrini M, Li L, Lewis M, Stelzner M, Dunn JC, Martin MG: Intestinal subepithelial myofibroblasts support the growth of intestinal epithelial stem cells. *PLoS One* 2014, 9:e84651.
- [22] Truffi M, Sorrentino L, Monieri M, Fociani P, Mazzucchelli S, Bonzini M, Zerbi P, Sampietro GM, Di Sabatino A, Corsi F: Inhibition of Fibroblast Activation Protein Restores a Balanced Extracellular Matrix and Reduces Fibrosis in Crohn's Disease Strictures Ex Vivo. *Inflamm Bowel Dis* 2018, 24:332-45.
- [23] Lenti MV, Di Sabatino A: Intestinal fibrosis. *Mol Aspects Med* 2019, 65:100-9.
- [24] Shih DQ, Zheng L, Zhang X, Zhang H, Kanazawa Y, Ichikawa R, Wallace KL, Chen J, Pothoulakis C, Koon HW, Targan SR: Inhibition of a novel fibrogenic factor T11a reverses established colonic fibrosis. *Mucosal Immunol* 2014, 7:1492-503.
- [25] Bamias G, Filidou E, Goukos D, Valatas V, Arvanitidis K, Panagopoulou M, Kouklakis G, Daikos GL, Ladas SD, Kolios G: Crohn's disease-associated mucosal factors regulate the expression of TNF-like cytokine 1A and its receptors in primary subepithelial intestinal myofibroblasts and intestinal epithelial cells. *Transl Res* 2017, 180:118-30 e2.
- [26] Andoh A, Bamba S, Brittan M, Fujiyama Y, Wright NA: Role of intestinal subepithelial myofibroblasts in inflammation and regenerative response in the gut. *Pharmacol Ther* 2007, 114:94-106.
- [27] Grillo AR, Scarpa M, D'Inca R, Brun P, Scarpa M, Porzionato A, De Caro R, Martines D, Buda A, Angriman I, Palu G, Sturniolo GC, Castagliuolo I: TAK1 is a key modulator of the profibrogenic phenotype of human ileal myofibroblasts in Crohn's disease. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 2015, 309:G443-54.

- [28] Fujii M, Nishida A, Imaeda H, Ohno M, Nishino K, Sakai S, Inatomi O, Bamba S, Kawahara M, Shimizu T, Andoh A: Expression of Interleukin-26 is upregulated in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2017, 23:5519-29.
- [29] Pinchuk IV, Beswick EJ, Saada JI, Boya G, Schmitt D, Raju GS, Brenmoehl J, Rogler G, Reyes VE, Powell DW: Human colonic myofibroblasts promote expansion of CD4+ CD25high Foxp3+ regulatory T cells. *Gastroenterology* 2011, 140:2019-30.
- [30] Beswick EJ, Grim C, Singh A, Aguirre JE, Tafoya M, Qiu S, Rogler G, McKee R, Samedi V, Ma TY, Reyes VE, Powell DW, Pinchuk IV: Expression of Programmed Death-Ligand 1 by Human Colonic CD90(+) Stromal Cells Differs Between Ulcerative Colitis and Crohn's Disease and Determines Their Capacity to Suppress Th1 Cells. *Front Immunol* 2018, 9:1125.
- [31] Riegler M, Castagliuolo I, So PT, Lotz M, Wang C, Wlk M, Sogukoglu T, Cosentini E, Bischof G, Hamilton G, Teleky B, Wenzl E, Matthews JB, Pothoulakis C: Effects of substance P on human colonic mucosa in vitro. *Am J Physiol* 1999, 276:G1473-83.
- [32] Furuya K, Sokabe M, Furuya S: Characteristics of subepithelial fibroblasts as a mechano-sensor in the intestine: cell-shape-dependent ATP release and P2Y1 signaling. *J Cell Sci* 2005, 118:3289-304.
- [33] Desaki J, Shimizu M: A re-examination of the cellular reticulum of fibroblast-like cells in the rat small intestine by scanning electron microscopy. *J Electron Microscop* (Tokyo) 2000, 49:203-8.
- [34] Guldner FH, Wolff JR, Keyserlingk DG: Fibroblasts as a part of the contractile system in duodenal villi of rat. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 1972, 135:349-60.
- [35] Furuya S, Furuya K: Roles of substance P and ATP in the subepithelial fibroblasts of rat intestinal villi. *Int Rev Cell Mol Biol* 2013, 304:133-89.
- [36] Furuya S, Furuya K: Subepithelial fibroblasts in intestinal villi: roles in intercellular communication. *Int Rev Cytol* 2007, 264:165-223.
- [37] Roulis M, Flavell RA: Fibroblasts and myofibroblasts of the intestinal lamina propria in physiology and disease. *Differentiation* 2016, 92:116-31.
- [38] Saada JI, Pinchuk IV, Barrera CA, Adegboyega PA, Suarez G, Mifflin RC, Di Mari JF, Reyes VE, Powell DW: Subepithelial myofibroblasts are novel nonprofessional APCs in the human colonic mucosa. *J Immunol* 2006, 177:5968-79.
- [39] Saada JI, Barrera CA, Reyes VE, Adegboyega PA, Suarez G, Tamerisa RA, Pang KF, Bland DA, Mifflin RC, JF DIM, Powell DW: Intestinal myofibroblasts and immune tolerance. *Ann N Y Acad Sci* 2004, 1029:379-81.
- [40] Pinchuk IV, Saada JI, Beswick EJ, Boya G, Qiu SM, Mifflin RC, Raju GS, Reyes VE, Powell DW: PD-1 ligand expression by human colonic myofibroblasts/fibroblasts regulates CD4+ T-cell activity. *Gastroenterology* 2008, 135:1228-37, 37 e1-2.
- [41] Ackers I, Malgor R: Interrelationship of canonical and non-canonical Wnt signalling pathways in chronic metabolic diseases. *Diab Vasc Dis Res* 2018, 15:3-13.

- [42] MacDonald BT, Tamai K, He X: Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell* 2009, 17:9-26.
- [43] Wang RN, Green J, Wang Z, Deng Y, Qiao M, Peabody M, Zhang Q, Ye J, Yan Z, Denduluri S, Idowu O, Li M, Shen C, Hu A, Haydon RC, Kang R, Mok J, Lee MJ, Luu HL, Shi LL: Bone Morphogenetic Protein (BMP) signaling in development and human diseases. *Genes Dis* 2014, 1:87-105.
- [44] Hu L, Lin X, Lu H, Chen B, Bai Y: An Overview of Hedgehog Signaling in Fibrosis. *Molecular Pharmacology* 2015, 87:174-82.
- [45] Kramann R, Schneider RK, DiRocco DP, Machado F, Fleig S, Bondzie PA, Henderson JM, Ebert BL, Humphreys BD: Perivascular Gli1+ progenitors are key contributors to injury-induced organ fibrosis. *Cell Stem Cell* 2015, 16:51-66.
- [46] Madison BB, Braunstein K, Kuizon E, Portman K, Qiao XT, Gumucio DL: Epithelial hedgehog signals pattern the intestinal crypt-villus axis. *Development* 2005, 132:279-89.
- [47] Alkasalias T, Moyano-Galceran L, Arsenian-Henriksson M, Lehti K: Fibroblasts in the Tumor Microenvironment: Shield or Spear? *Int J Mol Sci* 2018, 19.
- [48] Takahashi K, Yamanaka S: Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006, 126:663-76.
- [49] Hanahan D, Weinberg RA: The hallmarks of cancer. *Cell* 2000, 100:57-70.
- [50] Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB: Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 2009, 324:1029-33.
- [51] Dimanche-Boitrel MT, Vakaet L, Jr., Pujuguet P, Chauffert B, Martin MS, Hammann A, Van Roy F, Mareel M, Martin F: In vivo and in vitro invasiveness of a rat colon-cancer cell line maintaining E-cadherin expression: an enhancing role of tumor-associated myofibroblasts. *Int J Cancer* 1994, 56:512-21.
- [52] Desmouliere A, Chaponnier C, Gabbiani G: Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. *Wound Repair Regen* 2005, 13:7-12.
- [53] Yamanashi T, Nakanishi Y, Fujii G, Akishima-Fukasawa Y, Moriya Y, Kanai Y, Watanabe M, Hirohashi S: Podoplanin expression identified in stromal fibroblasts as a favorable prognostic marker in patients with colorectal carcinoma. *Oncology* 2009, 77:53-62.
- [54] Christian S, Winkler R, Helfrich I, Boos AM, Besemfelder E, Schadendorf D, Augustin HG: Endosialin (Tem1) is a marker of tumor-associated myofibroblasts and tumor vessel-associated mural cells. *Am J Pathol* 2008, 172:486-94.
- [55] De Wever O, Nguyen QD, Van Hoorde L, Bracke M, Bruyneel E, Gespach C, Mareel M: Tenascin-C and SF/HGF produced by myofibroblasts in vitro provide convergent pro-invasive signals to human colon cancer cells through RhoA and Rac. *FASEB J* 2004, 18:1016-8.
- [56] Powell DW, Mifflin RC, Valentich JD, Crowe SE, Saada JI, West AB: Myofibroblasts. II. Intestinal subepithelial myofibroblasts. *Am J Physiol* 1999, 277:C183-201.

- [57] Eyden B: The myofibroblast, electron microscopy and cancer research. *Int J Cancer* 2009, 125:1743-5; author reply 6.
- [58] Nissi R, Autio-Harmanen H, Marttila P, Sormunen R, Kivirikko KI: Prolyl 4-hydroxylase isoenzymes I and II have different expression patterns in several human tissues. *J Histochem Cytochem* 2001, 49:1143-53.
- [59] Rege TA, Hagood JS: Thy-1 as a regulator of cell-cell and cell-matrix interactions in axon regeneration, apoptosis, adhesion, migration, cancer, and fibrosis. *FASEB J* 2006, 20:1045-54.
- [60] Hagood JS, Prabhakaran P, Kumbla P, Salazar L, MacEwen MW, Barker TH, Ortiz LA, Schoeb T, Siegal GP, Alexander CB, Pardo A, Selman M: Loss of fibroblast Thy-1 expression correlates with lung fibrogenesis. *Am J Pathol* 2005, 167:365-79.
- [61] Dionne S, Restellini S, Koenekoop J, Salvador Escribano P, Piccirillo C, Charlebois P, Liberman A, Stein B, Duchatellier C, Seidman E: Characterization of myofibroblasts isolated from the intestine of patients with inflammatory bowel disease [version 1; peer review: 1 approved, 1 approved with reservations]. *F1000Research* 2019, 8.
- [62] Legg J, Jensen UB, Broad S, Leigh I, Watt FM: Role of melanoma chondroitin sulphate proteoglycan in patterning stem cells in human interfollicular epidermis. *Development* 2003, 130:6049-63.
- [63] Kong P, Christia P, Saxena A, Su Y, Frangogiannis NG: Lack of specificity of fibroblast-specific protein 1 in cardiac remodeling and fibrosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2013, 305:H1363-72.
- [64] Sugimoto H, Mundel TM, Kieran MW, Kalluri R: Identification of fibroblast heterogeneity in the tumor microenvironment. *Cancer Biol Ther* 2006, 5:1640-6.
- [65] Wen Y, Wang CT, Ma TT, Li ZY, Zhou LN, Mu B, Leng F, Shi HS, Li YO, Wei YQ: Immunotherapy targeting fibroblast activation protein inhibits tumor growth and increases survival in a murine colon cancer model. *Cancer Sci* 2010, 101:2325-32.
- [66] Hamilton DW: Functional role of periostin in development and wound repair: implications for connective tissue disease. *J Cell Commun Signal* 2008, 2:9-17.
- [67] Kudo A, Kii I: Periostin function in communication with extracellular matrices. *J Cell Commun Signal* 2018, 12:301-8.
- [68] Kikuchi Y, Kashima TG, Nishiyama T, Shimazu K, Morishita Y, Shimazaki M, Kii I, Horie H, Nagai H, Kudo A, Fukayama M: Periostin is expressed in pericryptal fibroblasts and cancer-associated fibroblasts in the colon. *J Histochem Cytochem* 2008, 56:753-64.
- [69] Stutchbury B, Atherton P, Tsang R, Wang DY, Ballestrem C: Distinct focal adhesion protein modules control different aspects of mechanotransduction. *J Cell Sci* 2017, 130:1612-24.
- [70] Hinz B, Gabbiani G: Cell-matrix and cell-cell contacts of myofibroblasts: role in connective tissue remodeling. *Thromb Haemost* 2003, 90:993-1002.

- [71] Klingberg F, Hinz B, White ES: The myofibroblast matrix: implications for tissue repair and fibrosis. *J Pathol* 2013, 229:298-309.
- [72] Golji J, Mofrad MR: The interaction of vinculin with actin. *PLoS Comput Biol* 2013, 9:e1002995.
- [73] Li T, Guo H, Song Y, Zhao X, Shi Y, Lu Y, Hu S, Nie Y, Fan D, Wu K: Loss of vinculin and membrane-bound beta-catenin promotes metastasis and predicts poor prognosis in colorectal cancer. *Mol Cancer* 2014, 13:263.
- [74] DiPersio CM, Van De Water L: Integrin Regulation of CAF Differentiation and Function. *Cancers (Basel)* 2019, 11.
- [75] Vishy CE, Swietlicki EA, Gazit V, Amara S, Heslop G, Lu J, Levin MS, Rubin DC: Epimorphin regulates the intestinal stem cell niche via effects on the stromal microenvironment. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 2018, 315:G185-G94.
- [76] Andoh A, Fujino S, Hirai Y, Fujiyama Y: Epimorphin expression in human colonic myofibroblasts. *Int J Mol Med* 2004, 13:57-61.
- [77] Ronty MJ, Leivonen SK, Hinz B, Rachlin A, Otey CA, Kahari VM, Carpen OM: Isoform-specific regulation of the actin-organizing protein palladin during TGF-beta1-induced myofibroblast differentiation. *J Invest Dermatol* 2006, 126:2387-96.
- [78] Brentnall TA, Lai LA, Coleman J, Bronner MP, Pan S, Chen R: Arousal of cancer-associated stroma: overexpression of palladin activates fibroblasts to promote tumor invasion. *PLoS One* 2012, 7:e30219.
- [79] Akbar M, McLean M, Garcia-Melchor E, Crowe LA, McMillan P, Fazzi UG, Martin D, Arthur A, Reilly JH, McInnes IB, Millar NL: Fibroblast activation and inflammation in frozen shoulder. *PLoS One* 2019, 14:e0215301.
- [80] Orlandini M, Oliviero S: In fibroblasts Vegf-D expression is induced by cell-cell contact mediated by cadherin-11. *J Biol Chem* 2001, 276:6576-81.
- [81] Inoue H, Tsuchiya H, Miyazaki Y, Kikuchi K, Ide F, Sakashita H, Kusama K: Podoplanin expressing cancer-associated fibroblasts in oral cancer. *Tumour Biol* 2014, 35:11345-52.
- [82] Qian XL, Pan YH, Huang QY, Shi YB, Huang QY, Hu ZZ, Xiong LX: Caveolin-1: a multifaceted driver of breast cancer progression and its application in clinical treatment. *Onco Targets Ther* 2019, 12:1539-52.
- [83] Zhao Z, Han FH, Yang SB, Hua LX, Wu JH, Zhan WH: Loss of stromal caveolin-1 expression in colorectal cancer predicts poor survival. *World J Gastroenterol* 2015, 21:1140-7.
- [84] Akamatsu T, Arai Y, Kosugi I, Kawasaki H, Meguro S, Sakao M, Shibata K, Suda T, Chida K, Iwashita T: Direct isolation of myofibroblasts and fibroblasts from bleomycin-injured lungs reveals their functional similarities and differences. *Fibrogenesis Tissue Repair* 2013, 6:15.

- [85] Benzonana G, Skalli O, Gabbiani G: Correlation between the distribution of smooth muscle or non muscle myosins and alpha-smooth muscle actin in normal and pathological soft tissues. *Cell Motil Cytoskeleton* 1988, 11:260-74.
- [86] Skalli O, Ropraz P, Trzeciak A, Benzonana G, Gillessen D, Gabbiani G: A monoclonal antibody against alpha-smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation. *J Cell Biol* 1986, 103:2787-96.
- [87] Lindahl P, Betsholtz C: Not all myofibroblasts are alike: revisiting the role of PDGF-A and PDGF-B using PDGF-targeted mice. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1998, 7:21-6.
- [88] Glasser SR, Julian J: Intermediate filament protein as a marker of uterine stromal cell decidualization. *Biol Reprod* 1986, 35:463-74.
- [89] Toccanier-Pelte MF, Skalli O, Kapanci Y, Gabbiani G: Characterization of stromal cells with myoid features in lymph nodes and spleen in normal and pathologic conditions. *Am J Pathol* 1987, 129:109-18.
- [90] Czernobilsky B, Shezen E, Lifschitz-Mercer B, Fogel M, Luzon A, Jacob N, Skalli O, Gabbiani G: Alpha smooth muscle actin (alpha-SM actin) in normal human ovaries, in ovarian stromal hyperplasia and in ovarian neoplasms. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1989, 57:55-61.
- [91] Yokoi Y, Namihisa T, Kuroda H, Komatsu I, Miyazaki A, Watanabe S, Usui K: Immunocytochemical detection of desmin in fat-storing cells (Ito cells). *Hepatology* 1984, 4:709-14.
- [92] Kapanci Y, Ribaux C, Chaponnier C, Gabbiani G: Cytoskeletal features of alveolar myofibroblasts and pericytes in normal human and rat lung. *J Histochem Cytochem* 1992, 40:1955-63.
- [93] Peled A, Zipori D, Abramsky O, Ovadia H, Shezen E: Expression of alpha-smooth muscle actin in murine bone marrow stromal cells. *Blood* 1991, 78:304-9.
- [94] Kramann R, Schneider RK: The identification of fibrosis-driving myofibroblast precursors reveals new therapeutic avenues in myelofibrosis. *Blood* 2018, 131:2111-9.
- [95] Apte MV, Haber PS, Applegate TL, Norton ID, McCaughan GW, Korsten MA, Pirola RC, Wilson JS: Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas: identification, isolation, and culture. *Gut* 1998, 43:128-33.
- [96] Richman PI, Tilly R, Jass JR, Bodmer WF: Colonic pericrypt sheath cells: characterisation of cell type with new monoclonal antibody. *J Clin Pathol* 1987, 40:593-600.
- [97] Pannecoeck R, Serruys D, Benmeridja L, Delanghe JR, van Geel N, Speeckaert R, Speeckaert MM: Vascular adhesion protein-1: Role in human pathology and application as a biomarker. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2015, 52:284-300.
- [98] Weston CJ, Shepherd EL, Claridge LC, Rantakari P, Curbishley SM, Tomlinson JW, Hubscher SG, Reynolds GM, Aalto K, Anstee QM, Jalkanen S, Salmi M, Smith DJ, Day



CP, Adams DH: Vascular adhesion protein-1 promotes liver inflammation and drives hepatic fibrosis. *J Clin Invest* 2015, 125:501-20.

[99] Toiyama Y, Miki C, Inoue Y, Kawamoto A, Kusunoki M: Circulating form of human vascular adhesion protein-1 (VAP-1): decreased serum levels in progression of colorectal cancer and predictive marker of lymphatic and hepatic metastasis. *J Surg Oncol* 2009, 99:368-72.

[100] Ward ST, Weston CJ, Shepherd EL, Hejmadi R, Ismail T, Adams DH: Evaluation of serum and tissue levels of VAP-1 in colorectal cancer. *BMC Cancer* 2016, 16:154.

[101] Hsia LT, Ashley N, Ouaret D, Wang LM, Wilding J, Bodmer WF: Myofibroblasts are distinguished from activated skin fibroblasts by the expression of AOC3 and other associated markers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016, 113:E2162-71.

[102] Gheldof A, Hulpiou P, van Roy F, De Craene B, Berx G: Evolutionary functional analysis and molecular regulation of the ZEB transcription factors. *Cell Mol Life Sci* 2012, 69:2527-41.

[103] Schmalhofer O, Brabletz S, Brabletz T: E-cadherin, beta-catenin, and ZEB1 in malignant progression of cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2009, 28:151-66.

[104] Lamouille S, Xu J, Derynck R: Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014, 15:178-96.

[105] Postigo AA, Dean DC: ZEB, a vertebrate homolog of *Drosophila* Zfh-1, is a negative regulator of muscle differentiation. *EMBO J* 1997, 16:3935-43.

[106] Browne G, Sayan AE, Tulchinsky E: ZEB proteins link cell motility with cell cycle control and cell survival in cancer. *Cell Cycle* 2010, 9:886-91.

[107] Liu Y, El-Naggar S, Darling DS, Higashi Y, Dean DC: Zeb1 links epithelial-mesenchymal transition and cellular senescence. *Development* 2008, 135:579-88.

[108] Kim AY, Kwak JH, Je NK, Lee YH, Jung YS: Epithelial-mesenchymal Transition is Associated with Acquired Resistance to 5-Fluorouracil in HT-29 Colon Cancer Cells. *Toxicol Res* 2015, 31:151-6.

[109] Bian Y, Gao G, Zhang Q, Qian H, Yu L, Yao N, Qian J, Liu B, Qian X: KCNQ10T1/miR-217/ZEB1 feedback loop facilitates cell migration and epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer. *Cancer Biol Ther* 2019, 20:886-96.

[110] Chen B, Chen B, Zhu Z, Ye W, Zeng J, Liu G, Wang S, Gao J, Xu G, Huang Z: Prognostic value of ZEB-1 in solid tumors: a meta-analysis. *BMC Cancer* 2019, 19:635.

[111] Satoh J, Kino Y, Asahina N, Takitani M, Miyoshi J, Ishida T, Saito Y: TMEM119 marks a subset of microglia in the human brain. *Neuropathology* 2016, 36:39-49.

[112] Tanaka K, Inoue Y, Hendy GN, Canaff L, Katagiri T, Kitazawa R, Komori T, Sugimoto T, Seino S, Kaji H: Interaction of Tmem119 and the bone morphogenetic protein pathway in the commitment of myoblastic into osteoblastic cells. *Bone* 2012, 51:158-67.

- [113] Jiang ZH, Peng J, Yang HL, Fu XL, Wang JZ, Liu L, Jiang JN, Tan YF, Ge ZI: Upregulation and biological function of transmembrane protein 119 in osteosarcoma. *Exp Mol Med* 2017, 49:e329.
- [114] Zheng P, Wang W, Ji M, Zhu Q, Feng Y, Zhou F, He Q: TMEM119 silencing inhibits cell viability and causes the apoptosis of gastric cancer SGC-7901 cells. *Oncol Lett* 2018, 15:8281-6.
- [115] Zheng P, Wang W, Ji M, Zhu Q, Feng Y, Zhou F, He Q: TMEM119 promotes gastric cancer cell migration and invasion through STAT3 signaling pathway. *Onco Targets Ther* 2018, 11:5835-44.
- [116] Gasi Tandefelt D, Boormans JL, van der Korput HA, Jenster GW, Trapman J: A 36-gene signature predicts clinical progression in a subgroup of ERG-positive prostate cancers. *Eur Urol* 2013, 64:941-50.
- [117] Jones AM, Mitter R, Poulsom R, Gillett C, Hanby AM, Tomlinson IP, Sawyer EJ, Phyllodes Tumour C: mRNA expression profiling of phyllodes tumours of the breast: identification of genes important in the development of borderline and malignant phyllodes tumours. *J Pathol* 2008, 216:408-17.
- [118] Matsuoka R, Yoshida MC, Furutani Y, Imamura S, Kanda N, Yanagisawa M, Masaki T, Takao A: Human smooth muscle myosin heavy chain gene mapped to chromosomal region 16q12. *Am J Med Genet* 1993, 46:61-7.
- [119] Kumar A, D'Souza SS, Moskvina OV, Toh H, Wang B, Zhang J, Swanson S, Guo LW, Thomson JA, Slukvin, II: Specification and Diversification of Pericytes and Smooth Muscle Cells from Mesenchymal Angioblasts. *Cell Rep* 2017, 19:1902-16.
- [120] Wallace KN, Dolan AC, Seiler C, Smith EM, Yusuff S, Chaille-Arnold L, Judson B, Sierk R, Yengo C, Sweeney HL, Pack M: Mutation of smooth muscle myosin causes epithelial invasion and cystic expansion of the zebrafish intestine. *Dev Cell* 2005, 8:717-26.
- [121] Alhopuro P, Phichith D, Tuupainen S, Sammalkorpi H, Nybondas M, Saharinen J, Robinson JP, Yang Z, Chen LQ, Orntoft T, Mecklin JP, Jarvinen H, Eng C, Moeslein G, Shibata D, Houlston RS, Lucassen A, Tomlinson IP, Launonen V, Ristimaki A, Arango D, Karhu A, Sweeney HL, Aaltonen LA: Unregulated smooth-muscle myosin in human intestinal neoplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, 105:5513-8.
- [122] Vickaryous N, Polanco-Echeverry G, Morrow S, Suraweera N, Thomas H, Tomlinson I, Silver A: Smooth-muscle myosin mutations in hereditary non-polyposis colorectal cancer syndrome. *Br J Cancer* 2008, 99:1726-8.
- [123] Pannu H, Tran-Fadulu V, Papke CL, Scherer S, Liu Y, Presley C, Guo D, Estrera AL, Safi HJ, Brasier AR, Vick GW, Marian AJ, Raman CS, Buja LM, Milewicz DM: MYH11 mutations result in a distinct vascular pathology driven by insulin-like growth factor 1 and angiotensin II. *Hum Mol Genet* 2007, 16:2453-62.
- [124] Sammalkorpi H, Alhopuro P, Niittymaki I, Orntoft TF, Hokland P, Karhu A, Aaltonen LA: Mutation analysis of MYH11 in acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* 2008, 49:1829-31.

- [125] Leshchyns'ka I, Sytnyk V: Intracellular transport and cell surface delivery of the neural cell adhesion molecule (NCAM). *Bioarchitecture* 2015, 5:54-60.
- [126] Nakatani K, Seki S, Kawada N, Kobayashi K, Kaneda K: Expression of neural cell adhesion molecule (N-CAM) in perisinusoidal stellate cells of the human liver. *Cell Tissue Res* 1996, 283:159-65.
- [127] Kaiserling E, Muller H: Neoplasm of hepatic stellate cells (spongiotic pericytoma): a new tumor entity in human liver. *Pathol Res Pract* 2005, 201:733-43.
- [128] Agaimy A, Wunsch PH: Distribution of neural cell adhesion molecule (NCAM/CD56) in gastrointestinal stromal tumours and their intra-abdominal mesenchymal mimics. *J Clin Pathol* 2008, 61:499-503.
- [129] Shih IM: The role of CD146 (Mel-CAM) in biology and pathology. *J Pathol* 1999, 189:4-11.
- [130] Onisim A, Vlad C, Simon I, Dina C, Achimas Cadariu P: The role of CD146 in serous ovarian carcinoma. *J BUON* 2019, 24:1009-19.
- [131] Ma Y, Zhang H, Xiong C, Liu Z, Xu Q, Feng J, Zhang J, Wang Z, Yan X: CD146 mediates an E-cadherin-to-N-cadherin switch during TGF-beta signaling-induced epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Lett* 2018, 430:201-14.
- [132] Adegboyega PA, Mifflin RC, DiMari JF, Saada JI, Powell DW: Immunohistochemical study of myofibroblasts in normal colonic mucosa, hyperplastic polyps, and adenomatous colorectal polyps. *Arch Pathol Lab Med* 2002, 126:829-36.
- [133] Adegboyega PA, Oloade O, Saada J, Mifflin R, Di Mari JF, Powell DW: Subepithelial myofibroblasts express cyclooxygenase-2 in colorectal tubular adenomas. *Clin Cancer Res* 2004, 10:5870-9.
- [134] Di Mari JF, Mifflin RC, Adegboyega PA, Saada JI, Powell DW: IL-1alpha-induced COX-2 expression in human intestinal myofibroblasts is dependent on a PKCzeta-ROS pathway. *Gastroenterology* 2003, 124:1855-65.
- [135] Bamba H, Ota S, Arai S, Ban S, Shimizu M, Imai Y, Kawamoto C, Yoshida Y, Fujiwara K: Expression of cyclooxygenase-2 in human hyperplastic gastric polyps. *J Exp Clin Cancer Res* 2003, 22:425-30.
- [136] Holten-Andersen MN, Hansen U, Brunner N, Nielsen HJ, Illemann M, Nielsen BS: Localization of tissue inhibitor of metalloproteinases 1 (TIMP-1) in human colorectal adenoma and adenocarcinoma. *Int J Cancer* 2005, 113:198-206.
- [137] Beppu H, Mwizerwa ON, Beppu Y, Dattwyler MP, Lauwers GY, Bloch KD, Goldstein AM: Stromal inactivation of BMPRII leads to colorectal epithelial overgrowth and polyp formation. *Oncogene* 2008, 27:1063-70.
- [138] Swietlicki EA, Bala S, Lu J, Shaker A, Kularatna G, Levin MS, Rubin DC: Epimorphin deletion inhibits polyposis in the Apcmin/+ mouse model of colon carcinogenesis via decreased myofibroblast HGF secretion. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 2013, 305:G564-72.

[139] Chen AL, Soman KV, Rychahou PG, Luxon BA, Evers BM: Proteomic analysis of colonic myofibroblasts and effect on colon cancer cell proliferation. *Surgery* 2005, 138:382-90.