dc_1040_15

Tight junction alkotórészek és mikroRNS expresszió vizsgálata humán daganatokban, különös tekintettel a májdaganatokra

Dr. Kiss András
Semmelweis Egyetem Budapest,
II. sz. Pathologiai Intézet

Budapest

2015

Rövidítések jegyzéke 5

I. BEVEZETÉS 8

I.1. Általános bevezető 8

I.2. Sejtkapcsoló struktúrák 9

I.2.1. Tight junction 9
I.2.2. Adherens junkció 11
I.2.3. Claudinok 12
I.2.4. ZO-fehérjék 15
I.2.5. Occludin 15
I.2.6. Tricellulin 16

I.3. A mikro-RNS expresszió szerepe és jelentősége a génexpresszió szabályozásában 18

I.3.1. A mikroRNS-ek és fiziológiás szerepük 18
I.3.2. A mikro-RNS-ek szerepe daganatokban 19

II. CÉLKITŰZÉSEK 20

III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK 23

III.1. Vizsgált betegcsoportok 23

III.1.1. A sejtkapcsoló struktúra alkotórészek expressziójának vizsgálata hepato-pancreato-biliáris daganatokban 23
III.1.1.1. Claudin expresszió hepatocelluláris carcinomában, fibrolamelláris carcinomában, cholangiocarcinomában és májmetasztázisokban 23
III.1.1.2. Claudin expresszió és tricellulin expresszió hepatoblastomában 24
III.1.1.3. Tricellulin expresszió hepatocelluláris carcinomában és fibrolamellaris carcinomában, valamint pancreas ductalis carcinomában 25
III.1.2. Genito-urinaris tumorok 27
III.1.2.1. Claudin expresszió nem invazív húgyhólyag tumorokban, valamint high grade és low grade húgyhólyag carcinomákban 27
III.1.2.2. Claudin, occludin és syndecan expresszió cervix daganatokban és claudin expresszió endometrium tumorokban 27
III.1.3. MikroRNS expresszió vizsgálata humán daganatokban 28
III.1.3.1. MikroRNS expresszió vizsgálata HCV asszociált májtranszplantációban és steatosisban 28
III.1.3.2. MikroRNS expresszió vizsgálata Sorafenib kezelt hepatocelluláris carcinomában 29
III.1.3.3. MikroRNS expresszió vizsgálata hepatoblastomában 30

III.2. A vizsgálatokban felhasznált módszerek rövid ismertetése 31

III.2.1. Szöveti multiblokk (tissue microarray/TMA) készítése 31
III.2.2. Immunhisztokémiai vizsgálatok 31
III.2.3. Fehérje expresszió vizsgálata Western blot analízissel 33
III.2.4. Real-time RT PCR vizsgálatok az mRNS expresszió mérésére 34
III.2.5. A miR expresszió RTqPCR vizsgálata 37
III.2.6. Statisztikai feldolgozás 38

IV. EREDMÉNYEK 39

IV.1. A sejtkapcsoló struktúra alkotórészek expressziójának vizsgálata hepato-pancreato-biliáris daganatokban 39

IV.1.1. Sejtkapcsoló struktúra alkotórészek expressziója normál májban, cirrhosisban, hepatocelluláris carcinomában és áttéti májdaganatokban 39
IV.1.1.1. Claudinok expressziós mintázatának vizsgálata normál májban, cirrhosisban és HCC-ben 39
IV.1.1.2. Claudinok fehérje expressziója colorectalis carcinomák és ductalis pancreas carcinomák májáttétjeiben, összevetve a hepatocelluláris carcinomában talált mintázattal. 43
IV.1.1.3 Az occludin és ZO-1 mRNS és fehérje expresszió vizsgálata normál májmintákban, hepatocelluláris carcinoma mintákban és colorectalis carcinomák májmetasztázisaiban 47
IV.1.2. Sejtkapcsoló struktúra alkotórészek expressziós profiljának meghatározása a normál biliáris epithel különböző szakaszain és ezen szakaszok epeúti tumoraiban 51

IV.1.2.1. A claudinok expressziós profiljának meghatározása a normál biliáris epithel különböző szakaszain és ezen szakaszok epeúti tumoraiban....51
IV.1.2.2. A ZO-1, occludin és E-cadherin fehérjék és citokeratin-7 expressziójának immunhisztokémiai vizsgálata az epeút rendszer különböző szakaszainak normál biliáris epitheljében és ezen szakaszok epeúti daganataiban....59
IV.1.3. A claudin-4 expresszió összehasonlító vizsgálata és differenciáldiagnosztikai értéke a máj primer malignus daganataiban....64
IV.1.4. Claudin és tricellulin expresszió hepato-pancreato-biliáris daganatokban....70
IV.1.4.1. Claudin expresszió endocrin és exocrin pancreasban....70
IV.1.4.2. Tricellulin expresszió detektálása immunfluoreszcenciával normál hasnyálmirigyben és májban, valamint HCC-ben, iCCC-ben és pancreas ductalis carcinomában.....77
IV.1.4.3. Tricellulin fehérje expresszió detektálása immunhisztokémiával normál májban és pancreasban, valamint HCC-ben, iCCC-ben és pancreas ductalis carcinomában....81
IV.1.4.4. Tricellulin fehérje expresszió vizsgálata Western blot analízissel normál hasnyálmirigyben és pancreas ductalis adenocarcinomában....90
IV.1.4.5. Tricellulin mRNS expresszió detektálása real time RT-PCR módszerrel normál májban és a máj primer malignus daganataiban, valamint normál pancreasban és pancreas ductalis carcinomában....91
IV.1.5. Claudin és tricellulin expresszió hepatoblastomában....93
IV.1.5.1. Claudin expresszió vizsgálata human hepatoblastomában....93
IV.1.5.2. Tricellulin expresszió vizsgálata human hepatoblastomában....102
Tricellulin expresszió vizsgálata epitheliális hepatoblastomában....102
A hepatoblastoma esetek klinikai utánkövetése....106
IV.2. A sejtkapcsoló struktúra alkotórészek expressziójának vizsgálata urogenitális tumorokban....108
IV.2.1. Claudin expresszió high grade és low grade húgyhólyag carcinomákban és nem invazív húgyhólyag tumorokban....108
A Low grade – High grade húgyhólyagrákos (UCC) betegek utánkövetése....120
A felületes húgyhólyagdaganattal operált betegek utánkövetése....122
IV.2.2. Claudin expresszió cervix tumorokban, valamint az endometrium daganatokban....124
IV.2.2.1. Claudin, occludin és syndecan-1 expresszió normál cervicális hámban és cervix tumorokban....124
IV.2.1.2. Claudin expresszió endometrium tumorokban....132
IV.3. MikroRNS expresszió vizsgálata HCV asszociált transzplantált májakban, steatosisban és májdaganatokban....137
IV.3.1. MikroRNS expresszió vizsgálata HCV asszociált májtranszplantációban....137
IV.3.2. A mikro-RNS expresszió vizsgálata HCV pozitív krónikus hepatitis asszociált és metabolikus eredetű steatosisban....141
IV.3.3. MikroRNS expresszió vizsgálata hepatocelluláris carcinomában és Sorafenib kezelt hepatocelluláris carcinomában....142
IV.3.4. MikroRNS expresszió vizsgálata hepatoblastomában....145
IV.3.4.1. A hepatoblastoma minták mikroRNS expressziója....145
IV.3.4.2. A HB betegek túlélése és a mikroRNS expresszió összefüggése....147
V. MEGBESZÉLÉS....149
V.1. A krónikus hepatitis, cirrhosis és hepato-pancreato-biliáris daganatok TJ expressziós mintázatának prognosztikai és prediktív jelentősége, valamint az eltérő mintázatok értelmezése ezen betegségek pathomechanizmusában....149
V.2. TJ expressziós mintázatának prognosztikai és prediktív jelentősége, valamint az eltérő mintázatok értelmezése a daganatok hisztogenezisében és pathobiológiájában urogenitális tumorokban....167
V.3. MikroRNS expressziós mintázat vizsgálata és prediktív jelentősége humán májdaganatokban és HCV hepatitisben....172
VI. ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK....184

VI. A DISSZERTÁCIÓ ANYAGÁT KÉPEZŐ SAJÁT PUBLIKÁCIÓK ÉS SCIENTOMETRIAI ADATOK 187

VI.1. A dolgozat alapját képező első és utolsó szerzős in extenso eredeti közlemények 187

VI.2. Scientometriai adatok 189

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS 190

IRODALOMJEGYZÉK 191

Rövidítések jegyzéke

ACC	Adenocarcinoma
AFP	(serum) alpha-fetoprotein
AJ	Adherens junkció
AKT	Aktivált kináz
ALT	Alanin amino-transzferáz
ANOVA	ANalysis Of VAriance
AP	Alkalikus foszfatáz
AST	Aszpartát-aminotranszferáz
Bax	Bcl-2-associated X protein
Bcl	B-cell lymphoma 2
CARBOP -VP/ADR	Karboplatin-etopozid-adriamicin
CARBOP/VP	Karboplatin és etopozid
CK-1	Casein kináz
CC	Cholangiocarcinoma
CCC	Cholangiocarcinoma
CCl4	Szén-tetraklorid
CD81	Cluster of Differentiation 81
CDDP	Ciszdiamminedikloroplatinum
CDK6	Ciklin-dependens kináz 6
cDNS	Complementary DNA
CHC	Krónikus C hepatitis
CI	Confidence interval
CIN	Cervicalis Intraepithelialis Neoplasia
CIS	Carcinoma in situ
CK-7, .	Citokeratin 7
CLDN	Claudin
CPE	Clostridium perfringens enterotoxin
CRC	Coloretalis carcinoma
CRLM	Colorectalis carcinoma májáttét
DNase	Dezoxiribonukleáz
DNS	Dezoxiribonukleinsav
EBDC	Extrahepatikus epeúti carcinoma
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
EFS	Event Free Survival / eseménymentes túlélés
EMT	Epithelialis-mesenchymalis átalakulás
EZH2	Enhancer of Zeste Homolog 2
FFPE	Formalin Fixed Paraffin Embedded / formalin-fixált paraffinba ágyazott
FLC	Fibrolamelláris hepatocelluláris carcinoma
FNAB	Fine Needle Aspiration Biopsy / vékonytű aspirációs citológiai vizsgálat
GBC	Gallbladder carcinoma / epehólyag carcinoma
GGT	Gamma-glutamil-transzferáz
GOT	Glutamát-oxálacetát-transzaminináz
GPT	Glutamát-piruvát-transzaminináz
GuK	Guanylate kinase
H&E	Haematoxilin-eosin

HB	Hepatoblastoma
HCC	Hepatocelluláris carcinoma
HCV	Hepatitis C vírus
HG UCC	High Grade Urothelialis Carcinoma
HNF-1α	Hepatocyta Nucleáris Faktor–1α
HPV	Humán papillomavírus
HSA	Hepatocyte Specific Antigen (Hep Par-1)
IBDC	Intrahepatikus epeúti carcinoma
iCCC	Intrahepatikus cholangiocarcinoma
IDP	Belső denz plakk
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemistry
IHK	Immunhisztokémia
IS	Immunszupresszió
IUP	Invertált urothelialis papilloma
JAM	Junkcionális adhézios molekula
K.O.	Knockout / kiütött
KMT	Kiújulás Mentes Túlélés
LG-UCC	Low Grade Urothelialis Carcinomában
MAGUK	Membrane-Associated Guanylate Kinase
MARVEL	MAL and Related proteins for VEsicle trafficking and membrane Link
MELD	Model For End-Stage Liver Disease
miR	Mikro-RNS
mRNS	Hírvivő RNS
NAFLD	Nonalcoholic Fatty Liver Disease
NEBD	Normál extrahepatikus epeúti hám
NGB	Normál epehólyag hám
NIBD	Normál intrahepatikus epeúti hám
NL	Normal Liver / normál máj
NR	Non-Responder
OCLN	Occludin
OD	Optikai denzitás
ODP	Külső denz plakk
onko-miR	"oncogenic" + "miRNA", cancer associated miRNA
OS	Overall Surival / teljes túlélése
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PCR	Polymerase Chain Reaction / polimeráz-láncreakció
PDAC	Pancreatic ductal adenocarcinoma
PDGFR -β	Platelet-Derived Growth Factor Receptor-β
PDZ-domén	Post synaptic density protein (PSD95)- Drosophila disc large tumor suppressor (Dlg1)- Zonula occludens-1 protein (zo-1)
PET	Pancreas Endocrin Tumor
PFS	Progresszió mentes túlélés
PIAS3	Protein Inhibitor of Activated STAT 3
PKA	Foszfokináz A
PLM	Ductalis pancreas carcinoma májáttét
pre-miR	Pre mikro-RNS

pri-miR	Primer miR
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
PUNLMP	Papillary Urinary Neoplasia of Low Malignant Potential / Alacsony malignus potenciálú papilláris urotheliális neoplasia
RBV	Ribavirin
RFS	Rekurrencia-mentes túlélés
RNS	Ribonukleinsav
RT-PCR	Real Time Polimeraz Chain Reaction
SCARB1	Scavenger Receptor Class B 1
SEM	Standard Error of Mean
SH3	SRC Homology 3 Domain
SIOPEL	International Childhood Liver Tumour Strategy Group
SL	Környező tumormentes máj
SNAIL-1	Snail Family Zinc Finger-1
snRNS	Small nuclear RNA
SREBP	Sterol Regulatory Element-Binding Proteins
STAT3	Signal Transducer and Activator of Transcription 3
SVR	Sustained viral response / tartós vírus válasz
TAMP	TJ-asszociált MARVEL proteinek
Ta-T1 stádiumú	Tumor stádium
TER	Transzmembrán elektromos ellenállás
TJ	Tight junction
TMA	Tissue Micro-Array
TRIC	Tricellulin
MRP2	Multidrug Resistance Protein 2
UP	Urothelialis papilloma
UTR	Untranslated
VEGFR-2,-3	vascular endothelial growth factor receptor-2, -3
VHL	von Hippel-Lindau
VLDL	Very-Low-Density Lipoprotein
ZO protein	Zonula occludens fehérje
ZONAB	ZO-1 associated nucleic acid-binding protein

I. Bevezetés

I.1. Általános bevezető

A humán daganatok kialakulása igen változatos genetikai eltéréseken alapszik, valamint fontos szerepet játszik benne számos egyéb tényező így pl. az őssejt populáció és a daganatoknak a környezetükhöz való viszonya (Pfaffl,2002; Tomasetti,2015; Vogelstein,2013). Ezen faktorok különbözősége még az azonos szövettani klasszifikációs csoportba sorolt daganatokra is igaz. A genetikai eltérések egy része örökletes, azonban az emberi daganatok többsége szerzett, szomatikus genetikai eltéréseken alapul, melyek kialakulását nagymértékben befolyásolják többek között a környezeti tényezők, fertőző betegségek, táplálkozás, életmód stb. A kialakuló daganatok nagymértékű genetikai és genom szintű szabályozási heterogenitása nemcsak a különböző egyének tumoraiban, hanem adott esetben egy tumoron belül is megmutatkozik. A daganatok kialakulásának és a daganatokban zajló biológiai folyamatok megértése a betegségek egyre pontosabb diagnosztikáját és egyre hatékonyabb kezelését teszi lehetővé. Ebben a hosszú évtizedek óta tartó folyamatban a pathologai diagnosztikát ma is alapvetőnek tartják, mely lehetővé teszi a homogénnek tartott betegcsoportok azonosítását és ezáltal diagnosztikus és terápiás protokollok kialakítását. A klasszikus pathologiai diagnosztika makroszkópos, majd mikroszkópos tárháza folyamatosan bővült és bővül a molekuláris biológiai technikák egyre kiterjedtebb alkalmazásával. A klinikai onkológia nagymértékű fejlődése és az ezirányú humán vizsgálatok nemcsak a benignitás/malignitás kérdésében várnak válaszokat, hanem a kezelési stratégia kialakításához szükség van a daganatok differenciáltságának és a daganat anatómiai kiterjedtségének megállapítása mellett a célterápia számára fontos genetikai eltérések azonosítására is. A humán genom projekt hatalmas segítséget nyújtott a genom működésének megértésében és az eredmények beépülése a rutin diagnosztikai folyamatba folyamatos. A génexpresszió mRNS és fehérje szintű szabályozásában a komplexitás megértése olyan kihívás, mely bőven ad feladatot a kutatók számára. Várhatóan a jelenlegi orvosbiológiai kutatási eredmények költséghatékony beépülése tovább fogja növelni a daganatok diagnosztikai hatékonyságát és a megfelelő terápiás módszer kiválasztását.

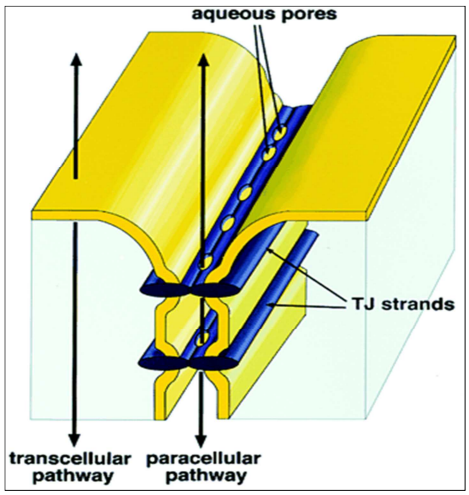
A jelen disszertáció alapvetően két kutatási területen végzett eredményeimet szeretné bemutatni. Az egyik a sejtkapcsoló struktúrák alkotórészeinek, ezen belül is a tight junction alkotórészek expressziós mintázatának vizsgálata, a másik pedig a fehérje termelődés poszt-

transzkripciós szabályozásának tanulmányozása a mikroRNS-ek expressziós mintázatának segítségével.

I.2. Sejtkapcsoló struktúrák

I.2.1. Tight junction

A tight junction (TJ), más néven zonula occludens az epithelialis vagy endothelialis sejtek membránjainak sejtkapcsoló struktúrája, mely a sejtek basolateralis vagy apicalis részén helyezkedik el. Olyan molekulakomplexumról van szó, mely nemcsak mechanikai kapcsoló feladattal bír, hanem az intercelluláris térben szabályozza a paracellularis transzportfolyamatokat és a permeabilitást. Újabban a sejten belüli jelátvitel szabályozásában betöltött szerepére is vannak adatok (Balda,2009; Matter,2003). A tubuláris képletek sejtjeiben a TJ típusú sejtkapcsoló struktúrák a hámsejtek apicalis részén, övszerűen mutathatóak ki, elektron mikroszkóposan a „patent szerű" kapcsolódási pontok, „kissing point" -ok láthatók (Tsukita,2008), (Tsukita,2000)

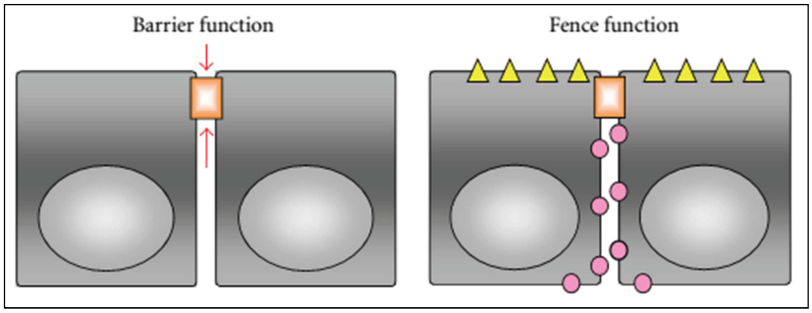


1. ábra A tight junction elhelyezkedése és szabályozó szerepe a hámsejtek között. Tsukita S, Furuse M. Pores in the wall: claudins constitute tight junction strands containing aqueous pores. J Cell Biol, 2000, 149: 13-16.

A TJ egyben a sejtek polaritását is biztosítja, funkcionálisan pedig az apicalis és basolateralis sejtfelszín közötti lateralis diffúziót, az apicalis membránfelszínen a receptor mediált endocytosist, valamint a basolateralis membránon az exocytosist befolyásolja (Forster,2008).

A TJ-nak a szöveti terek, belértve az intercelluláris és intracelluláris terek elhatárolásában kulcsszerepe van (2. ábra). A para- és transzcellularis transzportfolyamatok szabályozott komplexitása és változtathatósága számos szerv normál és pathologiás működésében (vese, belek) tettenérhető, és sokszor a szervek integritásának megőrzésében (vér-agy gát), adott esetben az immunrendszer elől való elzártságának fenntartásában (vér-here gát) elengedhetetlen. A kóros lateralis diffúzió a belekben hasmenéshez vezethet, vagy a kerítés funkció elvesztése a spermiumok érésének gátlását, vagy pusztulását okozhatja (Chiba,2012; Luettig,2015).

dc_1040_15



2. ábra A TJ 'határoló' és 'kerítés/szűrő' tulajdonsága. Ichikawa-Tomikawa N, Sugimoto K et al. Possible involvement of tight junctions, extracellular matrix and nuclear receptors in epithelial differentiation. J Biomed Biotechnol. 2011;2011:253048.

Eddig több, mint 40 fehérjét azonosítottak a TJ-ban (Fredriksson,2015). A TJ gerincének fehérjekomplexét a sejtmembránon áthurkolódó integráns és citoplazmatikus fehérjék adják. Az integráns fehérjék funkcionálisan és szerkezetileg két csoportra oszthatóak fel: egyfelől az emlősökben eddig 27 azonosított fehérjéből álló claudin-család, másfelől az occludint, tricellulint és marveld3 fehérjét is magába foglaló csoport, a TJ-asszociált MARVEL proteinek (TAMP) családja.

A TJ fehérjék változatos biológiai szereppel bírnak. A határoló és szűrő funkció alapján egyes fehérjék dominánsan lezáró funkciót látnak el, így például a CLDN-1, -3, -5, -11, -14, -19 és tricellulin. Mások a szelektív kation- (CLDN-2, -10b és -15), illetve anionpermeabilitásban (CLDN-10a és -17) töltenek be szerepet, míg a CLDN-2 a vízáteresztőképességet szabályozza (Luettig,2015). Ezáltal a zonula occludens fontos feladatot tölt be az intra- és extracelluláris terek közt fennálló ozmotikus egyensúly fenntartásában.

További fontos struktúrfehérje a JAM, mely egyszálú fehérje, két immunglobulin-szerű motívumuk okán az IgG-családhoz is tartozik (Van Itallie,2013). A tight junction asszociált citoplazmatikus fehérjék közé tartoznak a ZO proteinek: ZO-1, ZO-2 és ZO-3, melyek az aktin közti kapcsolatot biztosítják (Van Itallie,2014).

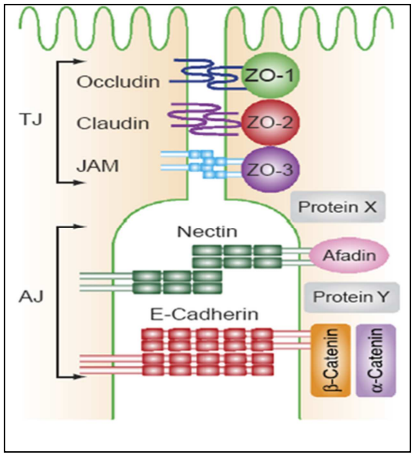
A TJ molekuláris szerkezetének feltárása során fény derült ezen struktúrák változatos szerepére, melyek számos sejtfolyamatot szabályoznak, így többek között a sejtproliferáció során egyes szignáltranszdukciós útvonalak aktivitását, a folyadékfelszívódás és szekréció mértékét (a CLDN-16 és -19 például a magnézium felszívódásában játszik szerepet) (Yu,2015), vagy a gyulladásos folyamatokban a szövetközi térben a kóros folyadékkiáramlást (Luettig,2015). A sejtbiológiai folyamatok kóros szabályozása folytán a sejtkapcsoló struktúrák morfológiai és funkcinális megváltozása szerepet játszik a carcinogenesisben, a tumorprogresszióban, és ezáltal a metastasisképzésben is. Ismert, hogy a TJ és fehérjéi lényeges szerepet játszanak az epithelialis-mesenchymalis átalakulás (EMT) folyamatában, mely szerep lehet fiziológiás (embryológiai, fejlődéstani), vagy pathologiás (fibrosis, daganatképződés) (Klymkowsky,2009).

A polarizáltság elvesztése és a sejtek kiszabadulása a sejtkapcsoló struktúrákból logikus történése a tumor progressziónak, az inváziónak, és következményesen a metasztázis képződésnek. Mindazonáltal a TJ leépülése, a sejtkapcsolat lazává válása nem az összes TJ fehérje alkotórész csökkent expresszióját jelenti, hanem megváltozik az expressziós mintázat és összességében daganattípusonként eltérő mintázat jellemző. Egyes alkotórészek termelődése lecsökken, míg mások termelődése fokozódik. A carcinogenesisben és tumor progresszióban tehát egyes alkotórészek túltermelődése, vagy csökkent expressziója egymás mellett létezik, és végső soron az expressziós mintázat megváltozása jellemez egy állapotot (Gonzalez-Mariscal,2008; Lal-Nag,2009). Másfelől fontos megállapítás volt, hogy a TJ-k a korábbi elképzelésekkel ellentétben dinamikusan változó struktúrák, ezáltal az egyes szövetek áteresztőképessége, valamint egyéb funkciója, vagy ultrastruktúrális felépítése sem statikus, változik a különböző kóros folyamatok során (Balda,2009).

I.2.2. Adherens junkció

Az adherens junkció (AJ) a TJ-hoz hasonlóan két hámsejt között képez kapcsoló struktúrát, de a TJ-hoz képest basalis irányban helyezkedik el, és citoplazmatikus oldala aktin filamentumokhoz kapcsolódik (3. ábra). Az adherens junkciónak van folyamatos, sejtek között körbefutó formája, melyet zonula adherensnek nevezünk, és van pontszerű formája is, mely az extracelluláris mátrixhoz kapcsolódik, ez az adhéziós plakk. AZ AJ a sejtek közti kapcsolat fenntartása mellett több intracellularis jelátviteli útvonal működésében tölt be szerepet (McEwen,2012). Az AJ sejtkapcsolódásban játszott funkciójának egyik alapvető molekulacsaládja a cadherinek (Troyanovsky,2012). Ezek szintén transzmembrán fehérjék és a szomszédos sejtek cadherinjeinvel képeznek homodimereket. AZ AJ másik lényeges lényeges molekulacsaládja a cateninek (Troyanovsky,2012). Az α-catenin, a β- vagy γ-catenin indirekt módon kötődik a cadherinekhez és egyben kapcsolódik az actin citoszkeletonhoz.

dc_1040_15

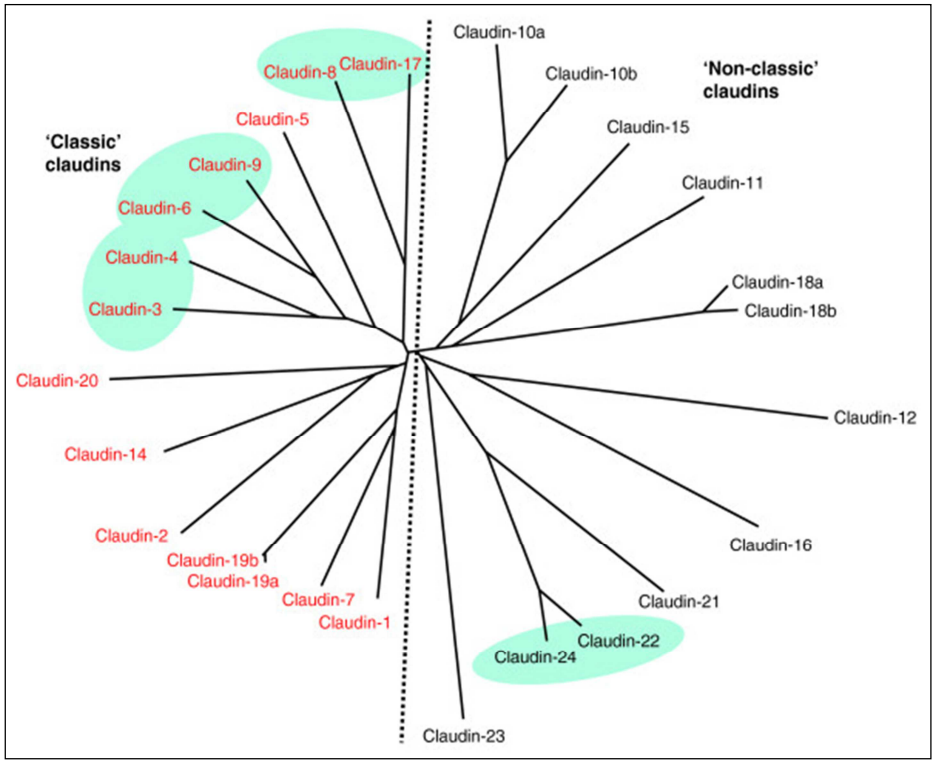


3. ábra A tight junction (TJ) és adherens junkció (AJ) egymáshoz viszonyított helyzete. Miyoshi J, Takai Y. Molecular perspective on tight-junction assembly and epithelial polarity. Adv Drug Deliv Rev. 2005 Apr 25;57(6):815-55.

I.2.3. Claudinok

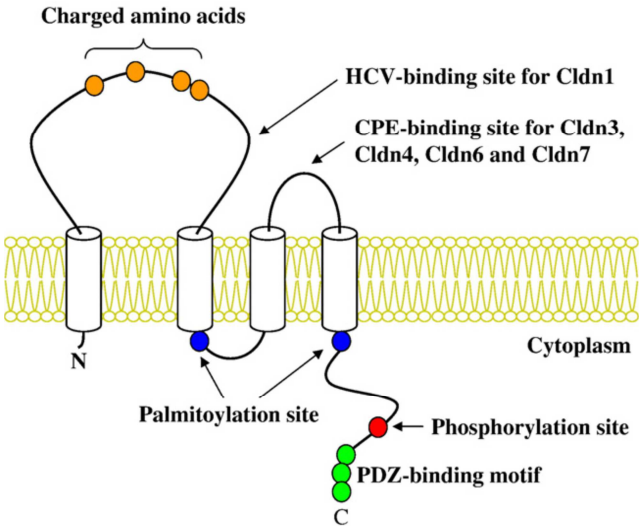
A napjainkig megismert tág értelemben vett molekulacsalád 27 féle claudinból (CLDN) (Mineta,2011) áll és a legelsőket 1998-ban írták le (Tsukita,1998). Az első claudin fehérjéket és loklizációjukat (CLDN-1 és -2) Furuse és Tsukita és munkatársaik azonosították (Tsukita,1998; Tsukita,2000; Tsukita,2001). Magát a claudinokat kódoló géncsaládot pedig 1999-ben azonosította Morita (Morita,1999). A gének a családon belül eltérő 12-70 %-os szekvencia-homológiát mutatnak. A nagyfokú szerkezetbeli hasonlóság felveti a TJ struktúrában betöltött hasonló funkció lehetőségét, de a különbözőség a funkció komplexitására is utal egyben. A leírt altípusok expressziós mintázata számos sejt és szövet esetében mind a normál sejtekben/szövetekben, mind pedig a kóros állapotokban jellegzetes mintázattal rendelkezik. Ez mind a mennyiségi paraméterekre, mind pedig a lokalizációra igaz.

Jelenleg a 24 régebben azonosított claudin (claudin-1-24) altípus mellé sorolt 3 újabb, hasonlóságot mutató claudinnal (claudin-25-27) kibővített család tagjait filogenetikailag a ’klasszikus CLDN’ és a ’nem klasszikus CLDN’ csoportba lehet besorolni (Lal-Nag,2009) (4. ábra).



4. ábra A humán claudin fehérjék filogenetikai osztályozása. Lal-Nag M, Morin PJ. The claudins. Genome Biol. 2009;10(8):235.

A claudinok négy transzmembrán domainből és két extracellularis hurokból épülnek fel, a fehérje N- és C- terminalisa intracellularisan található (5. ábra). A claudinok altípusai a harmadik és negyedik transzmembrán egység genetikai variabilitásában különböznek (Lal-Nag,2009). Az első extracellularis hurok 50 aminosavból áll, dominálóan hidrofób, míg a második hurok kisebb, 20 aminosavból áll.



5. ábra A claudinok térbeli felépítése és az alkotórészek funkciója.

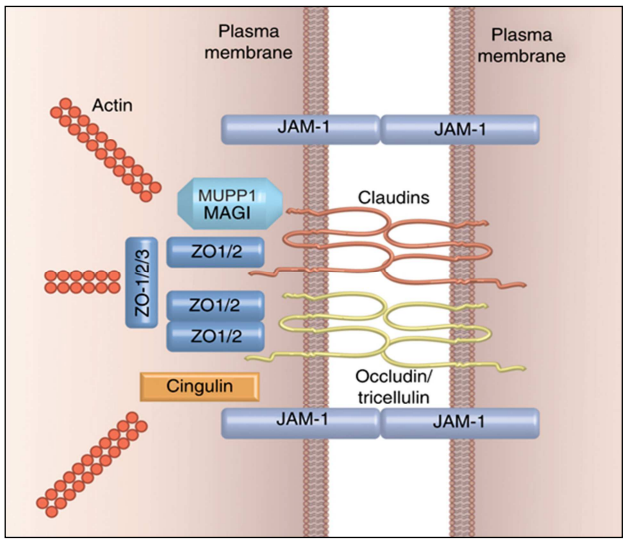
A claudinokat négy transzmembrán domén, az intracelluláris régiók, valamint az extracelluláris domének alkotják. Az extracelluláris hurkok receptorként funkcionálhatnak és további fehérjékkel is kapcsolódhatnak (Chiba,2008).

A többi TJ alkótórészhez való kapcsolódásban az első extracellularis huroknak van fő feladata, és a claudinok jellemzően homodimereket képeznek, de egyes altípusok heterodimerizációra is képesek (Lal-Nag,2009; Van Itallie,2014; Van Itallie,2011). A nagy, N-terminalis végi hurok által képesek a claudinok egymással ’cis-’, míg a kisebb, C-terminalis közeli hurokkal ’trans-’ kapcsolatban más CLDN-fehérjéhez kapcsolódni. Ez az összetett, különböző claudinokból álló cis/trans fehérjehalmaz biztosítja a sejtek közti mechanikai összeköttetést, valamint a sejtek közti térben történő folyadékáramlást és a benne oldott anyagok tömeg és töltés szelektív szelekcióját. A szervek vezetékeiben, tubulusaiban kritikus szerepe van a folyadékterek izolációjának (lásd epevezeték, pancreas vezeték), illetve a szuperszelektív szűrő és transzport mecahnizmusoknak. A TJ általános feladata a sejtadhesio biztosítása, a szöveti sttruktúra orientáltságának fenntartása, emellett az intercellularis rések izolálása, határolása, és a paracellularis folyadék és a benne oldott ionok, molekulák transzportjának a szabályozása. Végső soron a mechanikus és szabályozó funkciókon keresztül a szöveti homeosztázis biztosítása (Rosenthal,2010). A TJ-nek a claudinok mennyiségi és minőségi kölönbözősége által biztosított variabilitása sokféle biológiai funkciót tesz lehetővé. Az alkotórészek mennyiségi és minőségi összetettségének változása sokszor kórjelzője a sejtek, szövetek kóros átalakulásának, egyben a funkció megváltozásának. A CLDN-1 knock out egérmodell mutatja a TJ határoló, barrier funkciójának jelentőségét. Az egér ugyan kifejlődik, de 1 nappal már kritikus mértékű vízvesztés miatt kiszáradás lép fel (Furuse,2009; Furuse,2002). A különféle claudinok szövetspecifikus jelentőségét mutatja, hogy míg az endothel kapcsolódásban fontos CLDN-5 kiütése esetén a megszületés után közvetlenül agyvérzést kapnak az egerek, addig a CLDN-16 expresszió elvesztése a vesét érinti súlyosan, hypomagnesaemia és nephrocalcinosis jön létre (Nadarajah,2014; Tamura,2014).

A claudinok daganatterápiás felhasználhatóságát először az a tény vetette fel, hogy a CLDN-3 és -4 a Clostridium perfringens enterotoxinnak (CPE) a receptora. A toxin bekötődése után a CLDN-3 és -4 fehérje komplexének térszerkezete megváltozik, depolimerizálódik, és a létrejövő pórusok a membránpermeabilitás fokozódását eredményezik. Ez felvetette, hogy olyan daganatokon, ahol ezen claudinok nagy mennyiségben expresszálódnak, a toxint a daganatsejtek elpusztítására lehetne használni. Tágabb értelemben bármely magasan expresszálódó claudin, mint sejtfelszínre kiérő molekula lehet tumor terápia célpontja, amennyiben a felismerő antitesthez terápiás szert, radiofarmakont, vagy citotoxikus szert kötünk (Offner,2005). A megfelelő terápiás modalitás kifejlesztése napjainkban is intenzív kutatás tárgya (Fukasawa,2015; Yamashita,2015), (Li,2014; Li,2014).

I.2.4. ZO-fehérjék

A ZO proteinek a MAGUK (membrane-associated guanylate kinase) fehérje család tagjai; három PDZ-doménből és egy-egy SH3 és GuK doménből állnak (6. ábra), (Pan,2011). **A** ZO-fehérjék PDZ-doménjéhez kapcsolódik több claudin is, valamint a JAM proteinek saját PDZ-kötő hellyel bírnak és így kapcsolódnak a ZO-1 C-terminalisához. A ZO fehérjék szerepet játszanak a sejt-remodellingben, és az embryonális szöveti differenciációban . Ez olyan lényeges funkció, hogy a ZO proteinek hiányakor a hámsejtek között nem alakul ki funkcióképes TJ (Katsuno,2008). A ZO-1 a ZONAB (ZO-1 associated nucleic acid-binding protein) segítségével képes egyes sejtciklust szabályozó fehérjék, például az ErbB-2 promoter aktivitását, ezáltal az endogén ErbB-2 expressziót befolyásolni, másrészt a PCNA-hoz és cyclinD1-hez való közvetlen kapcsolódás révén is befolyásolhatják a sejtciklust (Balda,2000). A ZO-2 a c-Myc-el komplexet alkotva a cyclinD1 promoterét szabályozhatja, mely az expresszió csökkenését eredményezi a sejtciklus G1/S fázisában (Huerta,2007).



6. ábra ZO-fehérjék elhelyezkedése és kapcsolatuk egyéb TJ-alkotórészekkel. Niessen CM. Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function. J Invest Dermatol. 2007 Nov;127(11):2525-32.

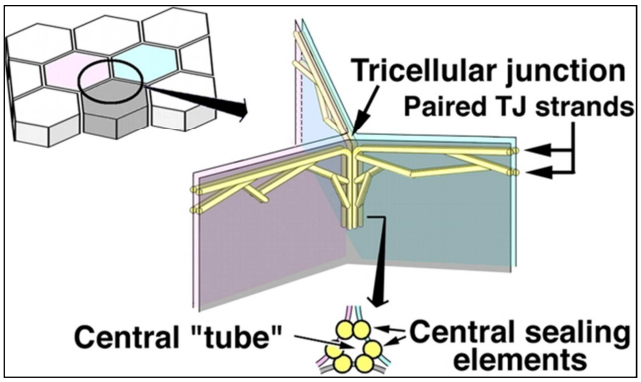
I.2.5. Occludin

Az occludin volt az első leírt, 65 kDa molsúlyú transzmembrán TJ-alkotórész (Furuse,1993). Ezen fehérje fokozott termelődése a sejtmembrán elektromos ellenállásának növekedését eredményezi. Érdekes módon occludin K.O. egerekben fokozódott egyes kationok membrán permeabilitása, de a TJ látszólag megfelelő szerkezetet vett el, azonban számos fejlődési rendellenesség alakult ki: hereatrófia, infertilitás, csontfejlődési rendellenességek, növekedési zavarok, gyomornyálkahártya-hyperplasia. A carcinogenesisben és tumor progresszióban az occludin több pathologiás állapotban szerepet kap. A konstitutívan aktív Ras/Raf-1 jelátviteli úvonal hatására az occludin transzkripciója csökken, és a CLDN-1 és -2, valamint a ZO-1

expressziója is mérséklődik. A VHL-tumorszuppresszor gén kiesése során az occludin és CLDN-1 termelődése csökken (Li,2000; Wang,2007).

I.2.6. Tricellulin

A sejtkapcsoló struktúrákon belül megkülönböztetjük a két sejtet összekapcsoló bicellularis TJ struktúrákat, és az utóbbi években jobban megismert tricellularis, azaz három sejt találkozási pontjában kimutatható TJ-t (7. ábra) (Ikenouchi,2005).

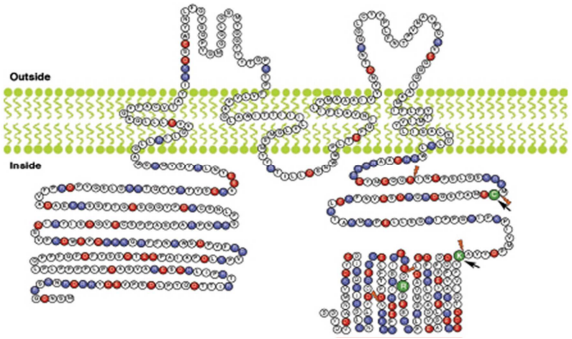


7. ábra A tricellulárus kapcsolódási pont szerkezete. Ikenouchi J, Furuse M, Furuse K, Sasaki H, Tsukita S, Tsukita S. Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. J Cell Biol. 2005 Dec 19;171(6):939-45.

A tricellulint, mint a tricelluláris junctiók fő alkotóelemét az occludin és marveld3 proteinekkel együtt a TAMP (TJ-associated membrane proteins) – fehérjék MARVEL (MAl and Related proteins for VEsicle trafficking and membrane Link) – családjába klasszifikálták. Ezen fehérjék egyes funkciókban osztoznak, azonban lényeges eltéréseket is mutatnak (Gunzel,2012).

A tricellulin felépítése: A tricellulin (TRIC) egy 63.6 kDa molsúlyú, 555 aminosavból felépülő fehérje, mely a claudinokhoz és az occludinhoz hasonlóan négy transzmembrán doménnek és két extracellulris hurokkal és intracellularis terminalisokkal rendelkezik (8. ábra). A tricellulin C-terminális végének utolsó 130 aminosava azonos az occludin C-terminálisával, ezáltal a két fehérje 32% szekvencia homológiát mutat (Chiba,2008). Riazuddin és munkatársai 4 izoformát tudtak elkülöníteni, a TRIC-a ezek közül a leghosszabb, 7 exonból és 558 aminosavból áll, 64 kDa molsúllyal rendelkezik. A TRIC-a1 a TRIC-a-hoz hasonló, de a TRIC-a 3. exonja hiányzik, 62 kDa moltömegű. A TRIC-b még rövidebb, 458 aminosavból áll, 52 kDa molsúlyú protein, míg a TRIC-c mindössze két transzmembrán doménből álló, 442 aminosav hosszú splice-variáns (Riazuddin,2006).

dc_1040_15



8. ábra A tricellulin felépítése. Kondoh M, Yagi K. Tight junction modulators: promising candidates for drug delivery. Curr Med Chem. 2007;14(23):2482-8.

Fiziológiásan mind az occludin, mind pedig a TRIC szerin/threonin- és egyes tirozin-kinázok által foszforilált állapotban van. Az occludin C-terminálisának foszforilációját a casein kináz (CK)-1 és -2 (szerin/threonin- kinázok csoportja) végzi, azonban a TRIC foszforilálói eddig ismeretlenek. Ezen szabályozási folyamat kóros állapotát tartják fontosnak egyes gyulladásos bélbetegségekben, valamint szerepet játszhat a carcinogenesisben (Ikenouchi,2005). A tricellulin egyik fontos feladata szintén a transepithelialis barrier fenntartása. A TRIC-K.O. sejtekben a transzmembrán elektromos ellenállás (TER) csökkenését és a paracellularis permeabilitás fokozódását észlelték (Furuse,2009; Tsukita,2008; Tsukita,2009). A TER a lezáró, sealing funkció egyik jól mérhető markere. Ha a TER nő, akkor egyidejűleg csökken egyes ionok és makromolekulák transzmembrán permeabilitása, tehát a tricellulin a TER fenntartásában is részt vesz. A TRIC fehérje expresszióját számos normál és daganatos szövettípusban dokumentálták: humán tüdőcarcinoma (Soini,2012), humán Corti-szerv lamina cochlearisa (Riazuddin,2006), MDCK II – sejtvonal (Krug,2009), humán csírasejtek, Sertoli-sejtek (Hermo,2010), humán gyomorcarcinoma sejtvonal (Masuda,2010), humán tonsilla squamosus sejtes carcinoma (Kondoh,2011), egér vékonybél, gyomor, vese (Ikenouchi,2005). Leírták, hogy az occludin-KO sejtekben a TRIC a tricelluláris junkcióban nem azonosítható, de a bicelluláris TJ-ban kimutatható, ezáltal felmerül, hogy átveheti az occludin egyes funkcióit. Emellett a tricelluláris junkció fontos feladata a makromolekula áramlásának szabályozása, mely a tricelluláris junkció pórusának relatív nagy méretét tekintve lehetőséget nyújt a gyógyszermolekulák transzportjának befolyásolására (Kondoh,2007; Krug,2014; Krug,2009). Ebben a tekintetben lényeges lehet, hogy jól differenciált pancreas ductalis adenocarcinoma sejtvonalakban az extracellularis kalcium-szint befolyásolta a tricellulin expressziót, érdekes módon mind a hypocalcaemia, mind a hypercalcaemia fokozta a TRIC fehérje termelődést (Van Itallie,2011). Emellett egyes TRIC-mutációk a claudinok mutációjához hasonlóan szerepet játszanak a familiáris siketség egyes formáinak kifejlődésében (Riazuddin,2006).

Összességében elmondható, hogy az irodalmi adatok szerint a TJ fő variabilitását adó claudin géncsaládnak és fehérjéinek alapvető szerepe van a hámsejtek intercelluláris kapcsolatainak

fenntartásában és a folyadékterek szelektív szabályozásában. Mindezen folyamatok kóros megváltozása tetten érhető a claudinok expressziós mintázatának megváltozásában az egyes szövetek, szervek carcinogenesis folyamatában és a kialakult tumorok progressziójában és következményesen a metastasisok kialakulásában. A claudinok és egyéb TJ fehérjék, így az occludin, ZO-1, tricellulin expressziós mintázatának feltérképezése segíthet a tumorok kialakulásának és progressziójának pathobiológiai folyamatainak megértésében, és differenciáldiagnosztikai célokat is szolgálhat.

I.3. A mikro-RNS expresszió szerepe és jelentősége a génexpresszió szabályozásában

I.3.1. A mikroRNS-ek és fiziológiás szerepük

A mikro-RNS-ek (miR) olyan rövid, 16-29 nukleotid hosszúságú, nem-kódoló RNS molekulák, melyek a génexpressziót negatív regulátorként szabályozzák (Croce,2005; Wang,2009). 1993-ban először a Caenorhabditis elegans differenciálódásában szerepet játszó lin-4-t, majd pár évvel ezt követően a let-7 miR-t fedezték fel (Bartel,2004). A különböző fajokban megismert miR-k száma mára 20 ezer fölött van és ezen belül több, mint 2000 humán miR található meg (Lawrie,2013). A miR-eket kódoló genomiális részek általában a gének intronjaiban, vagy az úgynevezett 3’ UTR (untranslated- fehérjévé át nem íródó) régiójában valamint a genom nem-kódoló részén klaszterekben találhatóak (Bartel,2004). Az érett mikroRNS-ek kialakulása több szakaszban történik; elsőként az RNS-polimeráz II segítségével a primer miR (pri-miR) íródik át, majd ebből a Drosha enzim (III típusú endonukleáz RN-áz) közreműködése által jellegzetes hajtű szerkezetű (mintegy 60-110 nukleotid hosszúságú) prae-miR-ek hasadnak le. A prae-miR-ekből a Dicer endonukleáz segítségével a RISC komplexbe (RNS-indukált csendesítő komplex) beépülő miR-ek keletkeznek (Munker,2011). A miR-ek az 5’ végükön található 6-8 nukleotid hosszúságú „seed” régió segítségével kapcsolódnak egy célmolekula mRNS 3’ végéhez, mely az adott mRNS lebontását vagy a transzláció gátlását eredményezi (He,2004; Zhao,2010). Összességében a miR-ek tehát az mRNS szint csökkentésével vagy a transzláció gátlásával a génexpresszió poszt-transzkripciós módosításában vesznek részt és annak negatív regulátorai. A mikroRNS-ek (miRNS, miR) tehát olyan rövid RNS molekulák, melyek alapvetően a génexpressziót negatívan regulálják (Ciesla,2011) a génről átírt mRNS lebontásával vagy pedig a transzláció gátlásával. A gén expresszió módosításával olyan alapvető folyamatok szabályozásában vesznek részt, mint az egyedfejlődés, immunitás, differenciáció, vagy a homeosztázis (Hu,2012).

I.3.2. A mikro-RNS-ek szerepe daganatokban

A mikroRNS-ek a carcinogenezisben és a tumorok progressziójában egyaránt szerepet játszanak. A miR-k tehát poszt-transzkricpciós szinten hatnak, és transzlációs blokkot okoznak a messenger RNS-k 3’ át nem íródó (untranslated) régiójához (UTR) kötődve a fehérjeszintézis csökkentése, vagy megakadályozása által (Carthew,2009). Hatásuk szerint alapvetően megkülönböztetünk onkogén (onko-miR), és tumor szupresszor hatású miR-eket. Az onko-miR-ek tumor szupresszor gének expressziójának gátlásával azok termelődését csökkenthetik, vagy ha onkogének a célpontjaik, akkor az expresszióját szabályozó miR temelődésének csökkenésével az adott onkogén expressziója nőhet (Shenouda,2009). A miR-ek megváltozott expressziója számos szolid daganatban került leírásra az adott daganat típus kialakulásában, vagy progressziójában lényeges szerepet betöltő gén mRNS, illetve fehérje expressziójában bekövetkező, a miR termelődéssel negatívan korreláló változással (Cummins,2006; Iorio,2007; Iorio,2005; Yanaihara,2006). A mikro-RNS-ek mind a normál parenchyma sejtjeiből, mind pedig a tumorsejtekből a perifériás vérbe is kikerülhetnek, és szintjük mérhető. Ez módot adhat egyes szövetekben, így a tumorokban jelen levő megváltozott miR expressziós szint vérből történő monitorozására, és ezáltal a keringő miR-ek tumormarkerként való felhasználására, vagy egyéb pathológiás folyamat kimutatására (Cortez,2012; Cortez,2010; Miyaaki,2014).

A normál homeosztázis állapotához képest számos daganatban került leírásra a megváltozott miR expressziós profil (Shenouda,2009), valamint ezen kívűl több pathologiás állapotban, így májbetegségekben is beszámoltak a megváltozott mikroRNS expresszióról (Kerr,2011; Lakner,2011). A mikroRNS-ek mintázata szövet-, illetve szervspecifikus módon szabályozott. A kóros állapotokban a mintázat egyes része megmarad, míg egyes mikroRNS-ek jellegzetesen megváltozott termelődést mutatnak. A miR-ek ezért alkalmasak lehetnek differenciáldiagnosztikai célokra, egyes elváltozások azonosítására, és egyre több adat szól prognosztikus és prediktív jelentőségükről (Cortez,2012; Cortez,2010; Cortez,2014; Garajova,2014; Musilova,2015; Zhu,2014). Néhány mikroRNS-t már leközöltek, mint a HCC vagy a krónikus hepatitis B fertőzés lehetséges biomarkereit [(Borel,2012; Waidmann,2012).

II. Célkitűzések

A jelen értekezésben tárgyalt vizsgálatok a sejtkapcsoló struktúra tight junction alkotórészek közül a claudinok, az occludin és a tricellulin megváltozott expressziós mintázatának felderítését, ennek a jelentőségének a megértését tűzték ki a humán daganatok hisztogenezisének jobb megértéséhez, valamint vizsgálni kívántuk a carcinogenesisben, a tumorok differenciációjában és progressziójában a megváltozott expressziós mintázat jelentőségét. Hasonlóképpen, a mikroRNS-ek megváltozott expresszióját vizsgáltuk ebben a kontextusban, illetve a megváltozott expressziós mintázatok differenciáldiagnosztikai és prediktív jelentőségét a klinikai kezelésre adott válaszban. A humán daganatok közül kiemelten foglalkoztunk a máj és hasnyálmirigydaganatokkal, valamint a méh és a húgyhólyag daganataival.

A primer és áttéti májdaganatok differenciáldiagnosztikáját sok esetben már rutin szövettani vizsgálattal el lehet dönteni, de szükség lehet speciális eljárásokra, elsősorban immunhisztokémiai vizsgálatra. A dedifferenciált daganatok esetében azonban sok esetben a citológiai, szövettani morfológia nem elégséges a végső diagnózis felállításához, és a génexpressziós mintázat elemzésére van szükség. A jelenleg használt immunhisztokémiai markerek egyike sem bír 100 %-s specificitással és szenzitivitással, ezért egyes sejtkapcsoló strukturák alkotórészeinek expressziós mintázatának felhasználása is felmerül diagnosztikus, prognosztikus, vagy prediktív célra. A következő kérdésekre kerestünk választ:

Primer és áttéti hepato-pancreato-biliáris daganatok TJ mintázata

1. Milyen a jellegzetes TJ expressziós mintázat - beleértve a claudinok és tricellulin expresszióját - a normál májban, krónikus hepatitisben, cirrhosisban és hepatocelluláris carcinomában (HCC)?
2. Milyen különbségek jellemzik a HCC egyes altípusainak TJ mintázatát?
3. Elkülöníthető-e a HCC a cholangiocarcinomától (CC) a TJ mintázat alapján, és vannak-e különbségek a humán epeútrendszer különböző szakaszaiból származó cholangiocarcinomái között?
4. Kimutatható-e összefüggés a claudin mintázat változása és a HCV fertőzés között?
5. Jellemzi-e a TJ mintázat - beleértve a claudinok és tricellulin expresszióját - a hepatoblastomák különböző altípusait és mutatkozik-e összefüggés a hepatoblastoma altípusaiban az epigenetikus szabályozó molekula, az enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) fehérje az expressziója és a klinikopathologiai paraméterek között?
6. Milyen a jellegzetes TJ expressziós mintázat - beleértve a claudinok és tricellulin expresszióját - mutatható ki normál májban, krónikus hepatitisben, cirrhosisban és

hepatocelluláris carcinomában, és van-e ezen kóros mintázatoknak prognosztikus vagy prediktív szerepe?

Urogenitális daganatok TJ expressziós profilja

7. Milyen a claudin, az occludin és a feltételezett HPV receptor proteoglikán, a syndecan-1 expressziója, expressziós mintázata a normál cervix hámban, és milyen változások jönnek létre a mintázatban a praemalignus-malignus progresszió során in situ carcinomában (CIS), CIN I-III léziókban, illetve invazív méhnyakrákban ?

8. Milyen fehérje és mRNS szintű claudin expressziós változások jellemzik a normál és hyperplastikus endometrium hámot, és az endometrium carcinoma endometrioid és seropapilláris típusait az endometrium carcinogenesis során ?

9. Van a különbség a claudin mRNS és fehérje expresszió komplex megjelenésében, valamint a proliferációs aktivitásban a normál húgyúti hám és az alacsony és magas differenciáltságú (low grade és high grade) húgyhólyagrákok között, valamint urothelialis papillomában (UP), invertált urothelialis papillomában (IUP), PUNLMP-ben és low grade urothelialis carcinomában (LG-UCC)? A kimutatott eltéréseknek van-e differenciáldiagnosztikai szerepe, illetve hogy mutatnak-e összefüggést a betegek kiújulás-mentes és a teljes túlélésével?

HCV hepatitis, steatosis és HCC asszociált mikroRNS mintázat

10. Vannak-e jellegzetes különbségek a target predikció szerint potenciálisan a HCV receptorokra ható mikroRNS-ek expressziójában a HCV kiújulás idején, és az antivirális kezelés hatására a HCV cirrhosis miatt szükségessé vált orthotopikus májátültetések utánkövetése során? Találunk-e különbséget a mikroRNS mintázatban az antivirális kezelésre reagáló betegcsoportban a non-responderekhez képest, és a vírus kiújuláskor a mikroRNS expressziós mintázata előre tudja-e jelezni az interferon/ribavirin antivirális kezelés hatásosságát?

11. Van-e különbség a mikroRNS mintázatban a különböző eredetű máj steatosisokban, így a HCV pozitív, vagy negatív krónikus hepatitis asszociált steatosisban, a metabolikus eredetű steatosisban?

12. Az inoperábilis, illetve rezidív hepatocelluláris carcinomában szenvedő betegek Sorafenib (Nexavar) célzott terápiás kezelése során mutatkozik-e különbség a kezelés előtt vett vékony tű aspirációs citológiai májbiopszia mikroRNS expressziós mintázatában a kezelésre jól reagáló, hosszabb túlélés mutató betegeknél a kezelésre rosszul reagáló, rövidebb túlélést mutató betegekhez képest?

13. Van-e különbség az epitheliális típusú hepatoblastoma fetális és embryonális típusának mikroRNS expressziós profilja között, és mutat-e a mintázat összefüggést a β-catenin magi felhalmozódásával és betegek túlélési adataival?

III. Anyagok és módszerek

III.1. Vizsgált betegcsoportok

A vizsgált szövetmintákat a Semmelweis Egyetem klinikáinak, így az I. sz. Sebészeti Klinika, a II. sz. Nőgyógyászati Klinika, az Urológia Klinika, az I. sz. Gyermekgyógyászati Klinika betegeinek diagnosztikus célra eltávolított és a II. sz. Pathologiai Intézetbe beküldött, feldolgozott mintáiból nyertük. A Semmelweis Egyetem Transzplantációs Klinika és a Gyermekonkológiai Klinikával való együttműködés során a Semmelweis Egyetem I. sz. Pathologiai és Kísérleti Rákkutató Intézetében feldolgozott eseteket is vizsgáltunk. Döntően formalin fixált, paraffinba ágyazott (FFPE) mintákat tanulmányoztunk, de egyes szelektív mintacsoportok esetén -80 C-on fagyasztott szövetminták vizsgálatára is sor került. A sorafenib kezelt HCC betegek miR expressziós vizsgálatait FNAB citológiai mintákból végeztük. A vizsgálatokat a Semmelweis Egyetem Regionális Etikai Bizottságának engedélyével végeztük (REGEB: 172/2003, 2/2004, 1/2005, 82/2005, 160/2006, 15/2008, 68/2008, 137/2008. 158/2008, 630/PI/2008.84-245/2008-1018 EKU, 83/2010, 35/2011).

A minták fixálása az ajánlott protokollnak megfelelően 10%-os pufferolt formalinban történt éjszakán át, majd paraffinba történt a beágyazás. A diagnózis megállapítása alapvetően Haematoxilin-Eosin (H&E) festett metszeteken történt, szükség esetén kiegészítő speciális szövettani festések és immunhisztokémiai vizsgálatok is történtek. Az esetek kiválasztásakor megtörtént a pathologiai diagnózis ellenőrzése, adott esetben az időközben megváltozott klasszifikáció szerint az esetek újra osztályozásra kerültek.

III.1.1. A sejtkapcsoló struktúra alkotórészek expressziójának vizsgálata hepato-pancreato-biliáris daganatokban

III.1.1.1. Claudin expresszió hepatocelluláris carcinomában, fibrolamelláris carcinomában, cholangiocarcinomában és májmetasztázisokban

A *claudin-4 expresszió* első vizsgálatát, mely az *epeúti carcinomákat* jellemző mintázatot és ennek differenciáldiagnosztikai értékét kívánta feltárni, 53 biliáris traktusból származó cholangiocarcinomán, 50 hepatocellularis carcinomán, 10 normál májmintán és 10 normál extrahepatikus epeúti mintán végeztük +IHK-i vizsgálatokkal, Western blot analízissel és az mRNS

expresszió feltárására real time RT-PCR-el. Az immunhisztokémiai vizsgálatokat szöveti mikroarray-ken végeztük.

A claudin-1, -2, -3, -4, and −7 fehérje expresszióját a HCV fertőzöttség függvényében 30 HCC-n és a környező daganatmentes májszövetben, valamint 6 normál májban vizsgáltuk immunhisztokémiával és a reakció morfometriai kiértékelésével, valamint Western blot-tal.

A claudin-1, -2, -3, -4, és -7 mRNS és fehérje szintű expresszióját 20 HCC-n, 20 colorectalis adenocarcinoma, 15 pancreas ductalis carcinoma májmetasztázisán és a környező tumormentes májszöveteken, valamint 5 normál májban vizsgáltuk.

Az occludin és a ZO-1 fehérje és mRNS szintű kifejeződését 20 HCC-ben és 20 colorectalis adenocarcinomában tanulmányoztuk, valamint 7 normál májmintát vontunk be a vizsgálatba konrollként.

Az epeút rendszer claudin expressziós mintázatát 62 beteg sebészi rezekátumainak formalin fixált, paraffinba beágyazott anyagain vizsgáltuk. 11 intrahepatikus epeúti carcinomát (IBDC), 17 extrahepatikus epeúti carcinomát (EBDC), valamint 34 epehólyag carcinomán (GBC) vizsgáltuk a claudin-1, -2, -3, -4, -7, -8, and -10 és a cytokeratin-7 expressziós mintázatát IHK módszerekkel. Ezen kívűl portális terek 12 normál intrahepatikus epeúti mintáját, 12 extrahepatikus epeúti mintát, valamint 33 normál epehólyag hám mintát vontunk be a vizsgálatba normál kontrollként. A sebészeti beavatkozás előtt egyik beteg sem részesült radio- vagy kemoterápiában. A vizsgálatokhoz a helyi etikai bizottság (TUKEB) engedélyével rendelkeztünk (172/2003). A betegek medián életkora 65 év volt, a férfi/nő arány pedig 24/38. A biliáris carcinomák szövettanilag jól differenciált (G1), közepesen differenciált (G2) és rosszul differenciált (G3) kategóriába lettek beosztva (Guzman G, Chejfec G (2007): Tumors of the digestive system. In Damjanov I, Fan F: Cancer Grading Manual. Springer). Az egyes mintákból többszörös (dupla vagy tripla) szövethengerek lettek eltávolítva és ezekkel szöveti mikroarray-ket (Tissue Micro-Array: TMA) hoztunk létre, melyeken történtek az automatizált immunhisztokémiai vizsgálatok.

III.1.1.2. Claudin expresszió és tricellulin expresszió hepatoblastomában

A Semmelweis Egyetem II. sz. Pathologiai Intézet és az I. Sz. Pathologiai és Kísérleti Rákkutató Intézet archívumából választottuk ki eseteink formalin fixált, paraffinba ágyazott blokkjait. Az összes vizsgált eset sebészi rezekátumból származott.

A **claudinok expresszió tanulmányozásákor** 14 db hepatoblastoma esetet vizsgáltunk, melyek összetételük szerint tisztán fetális, fetális/embryonális vagy kevert típusúak voltak.

A **tricellulin expresszió vizsgálatakor** a 1995-2010 között operált hepatoblastomák (HB) közül 21 eset formalin fixált, paraffinba ágyazott blokkjainak retrospektív vizsgálatát végeztük. A betegek életkora 3.6-189.8 hónap (átlag 45.9 hónap), a fiú/lány arány 11/10 volt. Mind a 21 beteg a SIOPEL

nemzetközi protokoll szerinti pre-operatív kemoterápiában részesült, majd az ezt követő műtétek rezekátumai kerültek pathologiai vizsgálatra. 7 esetben - 1 eset kivételével a rezekciót követően - lokális recidívát, 6 betegnél pedig tüdőbe adott metasztázist diagnosztizáltak. A vizsgálat lezártakor 20 betegből 5 elhalálozott.

III.1.1.3. Tricellulin expresszió hepatocelluláris carcinomában és fibrolamellaris carcinomában, valamint pancreas ductalis carcinomában

Ezen vizsgálatok során 128 tumormintát, benne 76 hasnyálmirigydaganatot és 42 primer májdaganatot, illetve 12 cirrhosisból származó mintát vizsgáltunk (1. táblázat). A pancreas daganatok között 58 sebészileg rezekált ductalis adenocarcinoma (14 esetben grade 1, 19 esetben grade 2 és 25 esetben grade 3 daganat), 15 endokrin hasnyálmirigytumor (5 benignus, 7 borderline és 3 malignus) és 3 acinussejtes carcinoma tricellulin expressziója került górcső alá (2. táblázat). A a májdaganatok esetében 32 hepatocellularis carcinomát (10 esetben grade 1, 13 esetben grade 2, 8 esetben grade 3 és 1 esetben kevert grádusú daganat) és 20 intrahepatikus cholangiocarcinomát (5 esetben grade 1, 9 esetben grade 2 és 6 esetben grade 3 differenciáltságú tumor) vizsgáltunk (3. táblázat). A hepatocellularis carcinomák egy altípusának a fibrolamellaris HCC-nek (FLC) vizsgálata során 11 FLC mintát, 7 HCC-t és 7 cholangiocarcinomát (CCC) is vizsgáltunk (4. táblázat). Az immunfluoreszcens vizsgálatokat 5-5 ép hasnyálmirigy és ductalis adenocarcinoma mintán, valamint normál máj és HCC frissen fagyasztott, -80°C-on tárolt mintáján kiviteleztük. A normál kontrollcsoportokat 20, hasnyálmirigytumor melletti, daganatmentes pancreasszövet, illetve 20 HCC daganatot környező, tumormentes májállomány alkotta.

1. táblázat A tricellulin vizsgálatok során felhasznált minták klinikai jellemzői.

	Esetszám	Férfi/nő arány	Átlagéletkor (év)
PDAC	58	25/33 (1:1.32)	62.36
PET	15	3/12 (1:4)	54.78
ACC	3	2/1 (1:0.5)	34.66
HCC	32	26/6 (1:0.23)	67.45
iCCC	20	7/13 (1:1.85)	57.4
Cirrhosis	12	10/2 (1:0.2)	60.14

2. táblázat A tricellulin vizsgálatok során felhasznált hasnyálmirigy minták klinikai jellemzői .

Daganattípus	Esetszám	Férfi/nő arány	Átlagéletkor (év)
PDAC			
Grade 1	14	4/10 (1:2.5)	63.33
Grade 2	19	11/8 (1: 0.72)	61.46
Grade 3	25	10/15 (1: 1.5)	62.29
PET			
Benignus	5	1/4 (1:4)	44.2
Grade 2	7	2/5 (1:2.5)	54.14
Grade 3	3	0/3	66
ACC	3	2/1 (1:0.5)	34.66

3. táblázat A tricellulin vizsgálatok során felhasznált májminták klinikai jellemzői.

Daganattípus	Esetszám	Férfi/nő arány	Átlagéletkor (év)
HCC			
Grade 1	10	8/2 (1:0.25)	65.2
Grade 2	13	10/3 (1: 0.3)	68.69
Grade 3	6	5/1 (1: 0.2)	70
Grade 4	2	-	63.5
Nem gradált	1	-	-
iCCC	20	7/13 (1:1.85)	57.4
CIRRH	12	10/2 (1:0.2)	60.14

4. táblázat Az FLC-ben a tricellulin vizsgálatok során felhasznált minták klinikai jellemzői.

	Esetszám	Férfi/nő arány	Átlagéletkor (év)
FLC	11	5/6 (1:1.2)	20.81
HCC	7	6/1 (1:0.16)	66
CCC	7	2/5 (1:2.5)	60

III.1.2. Genito-urinaris tumorok

III.1.2.1. Claudin expresszió nem invazív húgyhólyag tumorokban, valamint high grade és low grade húgyhólyag carcinomákban

A claudin expressziós mintázat vizsgálata során összesen a low grade és high grade húgyhólyagrákok vizsgálatakor 103 szövetmintát (86 LG és HG húgyhólyagrák, 17 nem tumoros urothel mintát), míg a nem invazív húgyhólyag tumorok tanulmányozásakor 80 TUR során eltávolított szövetmintát tanulmányoztunk (5 független /nem tumoros/ normál minta, 15 IUP, 20 UP, 20 PUNLMP és 20 LG-UCC). A független normál minták esetén egyik beteg esetében sem diagnosztizáltak korábban hólyagrákot. 1994-2010 között 30 invertált papillomát diagnosztizáltak a II. Pathologiai Intézetben, három esetben carcinoma is jelen volt az invertált papilloma mellettt (Riesz,2010). A 30 invertált papilloma eset áttekintése után a 2004-es WHO osztályozás alapján, 15 eset formalin-fixált paraffinba ágyazott blokkja volt alkalmas a fehérje expressziós mintázat vizsgálatára. Az átlagos utánkövetési idő 59,79 (3-126) hónap, a betegek átlagéletkora pedig 60,8 év (9-91) volt, a férfi:nő arány 1,5:1 (IUP: 2,75:1) volt. A kiújulás mentes túlélést a kezdeti diagnózistól az első, szövettanilag igazolt kiújulásig eltelt időben definiáltuk.

III.1.2.2. Claudin, occludin és syndecan expresszió cervix daganatokban és claudin expresszió endometrium tumorokban

A *claudin expressziót a cervixben* összesen 105 biopszia és sebészi exstirpáció során eltávolított rezekátum mintáin vizsgáltunk, melyek megoszlása a következő: normál cervix (N=20), cervicalis intraepithelialis neoplasia (CIN) Grade I (N=10), CIN II (N=17), CIN III (N=10), carcinoma in situ (CIS) (N=15), valamint invazív laphámrák (T1 és T2, N=33). A 33 invazív daganat stádiuma a következő: 10 T1a1, 5 T1a2, 8 T1b1, 5 T1b2 és 5 T2 invazív laphámrák. A tumorok közül 18 elszarusodó és 15 nem elszarusodó laphám carcinoma volt. Az occludin és a syndecan-1 expresszió vizsgálatára a fenti mintákból a következő 50 eset került kiválasztásra és a következő megoszlást mutatták: 10 normál cervicalis epithelium, 10 CIN I, 10 CIN II és 10 CIN III elváltozás, valamint 10 *in situ* carcinoma.

Az *endometrium daganatok* claudin expressziójának vizsgálata során a mintákat a Semmelweis Egyetem II. sz. Pathologia Intézet és az Országos Onkológia Intézet anyagából válogattuk. Abdominális salpingo-oophorectomiával kiegészített hysterectomia preparátumok kerültek feldolgozásra, a betegek nem részesültek a sebészi beavatkozás előtt radio vagy chemoterápiában. Olyan esetek kerültek vizsgálatra, ahol a tumorszövet 90%-a egy típusú volt és legalább 80 % élő tumorszövetet tartalmazott: 17 endometrioid (I típus, átlagéletkor 55.3 ± 8.6 év), 15 non-endometrioid, serosus (II. típus, átlagéletkor 63.8 ± 5.6 év) carcinoma. Az endometrioid carcinoma

(I típus) csoportban 10 G1 és 7 G2 stádiumú adenocarcinoma volt, míg a 2. típusú serosus adenocarcinoma csoportban 10 kötőszövetes tengellyel rendelkező, jellegzetes papillaris szerkezetet mutató tumor és 5 esetben olyan malignitás, ahol a papilláris szerkezet kevésbé volt kifejezett (solid szerkezet, gyakori fokális necrosisokkal). Mind a 15 eset magszerkezete alacsony differenciációt mutatott, a mitosisok gyakoriak voltak. 24 normál endometrium került vizsgálatra (12 proliferatív és 12 secretoros fázisban, átlagéletkor 46,2 ± 3,6, illetve 46 ± 4,3 év). 14 komplex endometrium hyperplasia eset is vizsgálatra került (átlagéletkor 45 ± 6,3 év).

III.1.3. MikroRNS expresszió vizsgálata humán daganatokban

III.1.3.1. MikroRNS expresszió vizsgálata HCV asszociált májtranszplantációban és steatosisban

28 beteget és biopsziás mintáikat vontuk be vizsgálatunkba. A betegek klinikai adatait a 5. táblázat részletezi. A vizsgált 28 transzplantáltból 6 beteg (21%) reagált tartósan az IFN/RBV kezelésre és lett HCV PCR negatív (SVR), 22 beteg volt a non-responder (NR) csoportban. A Knodell score (HAI) mindkét betegcsoportban szignifikánsan csökkent a kezelés végére: a NR csoportban 3,74±1 vs 1,6±1 ($p<0,0001$), az SVR csoportban 4±1 versus 1±1,3 ($p=0,002$).

5. táblázat Vizsgált betegek összesített, általános perioperatív és kiújulással kapcsolatos adatai.

Életkor		50± 5.4
Nem (férfi/nő)		18/10
MELD score		13.5±5
HCV RNA (10^6 /ml) a rekurrencia idején		8.2±10.7
HCV RNA (10^6 /ml) kezelés után		1.9±4.5
Tacrolimus IS		20 (71.4%)
Cyclosporin A IS		8 (28.6%)
HAI (Knodell érték/score) 1-8*		
	rekurrencia idején 1-4/5-8	21/7
	kezelés után 1-4/5-8	27/1
Fibrózis érték (score) 0-6		
	rekurencia idején 0-1/2-3/4-6	21/6/1
	kezelés után 0-1/2-3/4-6	20/5/3
Kezelésre adott válasz		
	NR	22 (78.6%)
	SVR	6 (21.4%)

*anyagunkban maximum 8 érték szerepelt

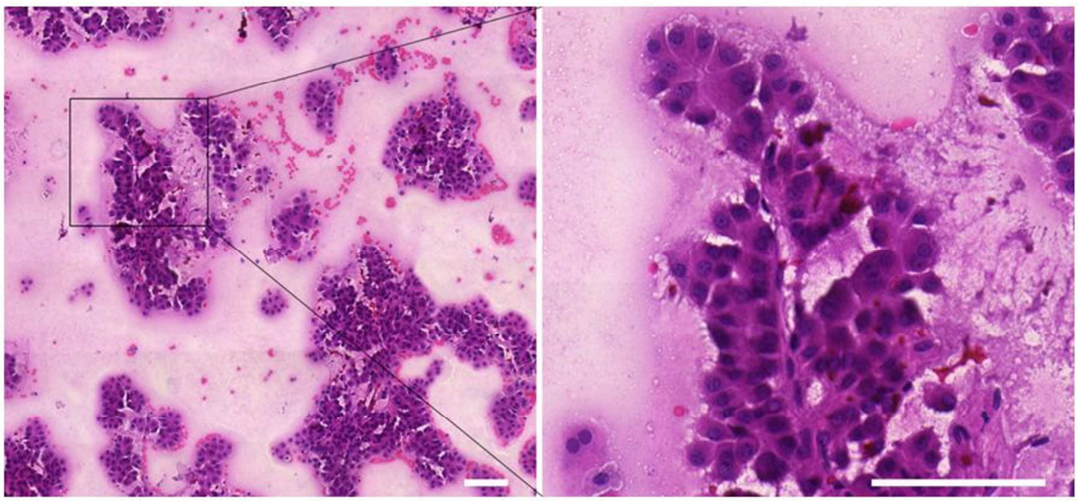
A HCV asszociált májtranszplantációban a mikroRNS expresszió vizsgálatakor 28 beteget és biopsziás mintáikat vontuk be vizsgálatunkba. A steatosisban a mikroRNS expressziós profil tanulmányozása során összesen 64 beteget vontunk be a vizsgálatba, akik közül 46-an HCV fertőzött, 1/b genotípusú krónikus hepatitis betegek (CHC) voltak és a Szegedi Egyetem I. sz. Belgyógyászati Klinikáján végezték májbiopsziájukat. Ezen betegeket a májbiopsziák pathologiai

vizsgálata alapján steatosis nélküli (CHC, 18 beteg), illetve steatosissal társult hepatitis (CHC-Steatosis, 28 beteg) csoportokba osztottuk. További 18 beteg májbiopsziás mintáit a II. sz. Pathologiai Intézet archivumából választottunk ki. Ezen betegek különféle metabolikus eredetű steatosisban szenvedtek, de esetükben HCV fertőzés nem volt kimutatható, valamint 12 normál májmintát vizsgáltunk kontrollként.

III.1.3.2. MikroRNS expresszió vizsgálata Sorafenib kezelt hepatocelluláris carcinomában

A sorafenib kezelt betegek vizsgálatánál a végső kiértékelésbe a szigorú beteg bevonási kritériumok miatt 20 beteg kerülhetett be, ezen betegeket 4 éven át követtük (2008-2012). Az aspirációs mintavétel idején a betegek medián életkora 68 év (52–82 év) és a férfi/nő arány 16:4 volt. A betegek többsége (16/20) a Child-Pugh csoportba tartozott, míg az ECOG teljesítmény státusz jellemzően 0 volt (13/20). A HCC hátterében álló alapbetegség jellemzően krónikus vírushepatitisnek bizonyult (11/20) és a tumorméret 1.5-től 20 cm-ig terjedt (medián: 5 cm). A legtöbb HCC multinoduláris volt (14/20), emelkedett serum alpha-fetoprotein (AFP) szintek (≥10 ng/ml) 13/20 betegben voltak kimutathatóak. A vizsgálat követési ideje alatt a 20 betegből 15 hunyt el, míg 5 beteg életben volt a vizsgálat végén. Az átlagos követési idő 33.6 hónap volt. A betegek medián teljes túlélése (OS) 6,2 hónap (95% CI 2,7–9,3 hónap), míg a progresszió mentes túlélés (PFS) 5 hónap (95% CI 3,5–6,5 hónap) volt.

Mindegyik FNAB mintából (9. ábra) kellő minőségű és mennyiségű teljes RNS-t tudtunk izolálni. Az RNS izoláció medián ±SD-ja 10,8 ± 9,3 μg (0,2–32,2 μg) volt, míg az optikai denzitása (OD: 260/280 arány) 2,0 ± 0,1. A végső kiértékelésbe a szigorú beteg bevonási kritériumok miatt 20 beteg kerülhetett be.



9. ábra Hepatocellularis carcinomából vékonytű aspirációs biopsziával (FNAB) nyert sejtek kenete. A szabálytalan alakú tumorsejt aggregátumokat átszövő, kapillárisokat reprezentáló endothel sejtek láthatók. A jobb oldali panel a bal oldali panel kijelölt részletének nagyítása. A méret jelölés mindkét panelben: 100 mm.

Az irodalmi adatok alapján A mikroRNS-k kiválasztásánál a saját vizsgálataink és az irodalmi adatok alapján a HCC pathogenezisében, progressziójában szerepet játszó jelentősebb miR-eket vettük figyelembe: miR-17-5p , miR-18a , miR-21 , miR-34a ,miR-122 , miR-140 , miR-195, , miR-210 , miR-214 , miR-221 , miR-222, miR-223, miR-224 , miR-328 és az U6 kerültek vizsgálatra.

III.1.3.3. MikroRNS expresszió vizsgálata hepatoblastomában

A HB minták a Semmelweis Egyetem I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, valamint a II. sz. Patológiai Intézet archívumából lettek kiválasztva, a 1995-2010 között operált, illetve biopszián átesett betegek eseteiből. Formalin-fixált, paraffinba ágyazott szöveti blokkokból végeztük mikroRNS és immunhisztokémiai vizsgálatainkat a Semmelweis Egyetem Regionális Etikai Bizottságának engedélyével (#192). A HB betegek az Európában elfogadott SIOPEL protokoll szerint kaptak onkológiai kezelést. A tumor rezekciót megelőzően ciszplatin vagy ciszdiamminedikloroplatinum (CDDP) vagy karboplatin és etopozid (CARBOP/VP) vagy karboplatin-etopozid-adriamicin (CARBOP-VP/ADR) kezelésben részesültek. A vizsgálat követési idejének lezártakor 20 vizsgált beteg közül 5 beteg elhalálozott, 12 tumormentes volt, míg egy esetben távoli (tüdő) metasztázis és recidíva is detektálható volt, egy esetben pedig recidívát észleltek, valamint egy betegnek volt távoli áttéte, a primer tumor recidivája nélkül. A betegek nem és kor szerinti megoszlása, valamint a recidívák és metasztázisok megoszlása és a betegek elhalálozási adatai a 6 táblázatban olvashatóak. A vizsgált hepatoblastomák mind epitheliális típusúak voltak, és 12 fetális altípus mellett 8, döntően embryonális altípust vizsgáltunk. Az embryonális csoportban 3 esetben fetális komponens is azonosítható volt, míg 5 eset tisztán embryonálisnak bizonyult. Így tehát összesen 15 fetális típusú, 8 embryonális tumorminta mellett 15 tumor körüli, tumormentes májból származó minta került be a vizsgálatba.

6. táblázat HB betegek adatai, a mikroRNS mintázat vizsgálatában. n: nő, f: férfi, F: fetális altípus, E: embryonális altípus, NT: tumor körüli, tumormentes máj

Eset	Nem	Élet-kor (év)	Tumor komponens n=23		Tumor-környéki máj	Minta/ Beteg	Meta-sztázis	Recidíva	Halál
1	f	0,36	F			1		Igen	Igen
2	n	1,44		E	NT	2			
3	f	10,14	F		NT	2		Igen	
4	f	5,14	F		NT	2	Tüdő	Igen	Igen
5	n	5,44	F		NT	2			
6	n	0,30	F		NT	2			
7	f	6,45	F		NT	2			
8	n	2,16	F	E		2			
9	f	3,12	F		NT	2			
10	f	2,40		E		1			
11	f	0,76	F		NT	2			
12	f	0,98	F		NT	2	Tüdő	Igen	
13	n	1,13	F	E		2			
14	f	7,66	F		NT	2			
15	n	4,76		E		1	Tüdő	Igen	Igen
16	n	15,82	F		NT	2	Tüdő	Igen	Igen
17	n	1,19		E	NT	2			
18	n	1,54	F		NT	2	Tüdő		
19	n	0,98		E	NT	2			
20	f	2,16	F	E	NT	3	Tüdő	Igen	Igen
Össz:	**10f, 10n**	**átlag: 3,69**	**15**	**8**	**15**	**38**	**6**	**7**	**5**

III.2. A vizsgálatokban felhasznált módszerek rövid ismertetése

III.2.1. Szöveti multiblokk (tissue microarray/TMA) készítése

A tumort reprezentáló területek kijelölését HE metszeteken végeztük. A donor szövethengereket (core-ok) 2 mm átmérőjű mintavételi „tű”-vel (Tissue Micro-Array Builder; Histopathology, Pécs, Magyarország) szúrtuk ki és 24 mintahelyes recipiens blokkokba kerültek, egy léziót két szövethenger reprezentált. A multiblokk paraffinját a szövethengerekkel 56 C fokon 5 perces inkubálással olvasztottuk össze. (Lodi,2006; Nemeth,2009; Nemeth,2009)

III.2.2. Immunhisztokémiai vizsgálatok

Kromogén, látható fényű immunhisztokémiai vizsgálatok: A 3-5 µm vastag metszetek deparaffinálását követően a claudin-1, -2, -3, -4, -7, -8, -10, tricellulin, ZO-1, occludin, E-cadherin és citokeratin-7 (CK-7), HSA, CK-5/6, CK-18, CK-19, CK-20, AFP, Glypican-3, CD-31 (PECAM-1), CD-34 (Class II) immunhisztokémiai vizsgálatok immunautomatán (Ventana ES; Ventana

Medical Systems Inc., Tucson, AZ, USA, Roche, Indianapolis, IN, USA) készültek. Röviden: a deparaffinálást követően antigén feltárást végeztünk: citrát alapú feltáró oldattal (Target Retrieval Solution cat# S1699, DAKO, Glostrup, Denmark) mikrohullámú sütőben kezeltük a metszeteket. A leggyakrabban használt primer antitestek hígításai és adatai, valamint a megfelelő pozitív kontrollok a 7. táblázatban láthatók. A ZO-1 és occludin esetében az antigén feltárást követően a metszeteket 0.1 mg/mL koncentrációjú proteáz kezeléssel (pronase E, Sigma P5147) emésztettük. A primer antitest detektálását a gyártó ajánlása szerint a Ventana iView DAB Detection Kit-el végeztük. A tricellulin esetében szignál amplifikációs kitet használtunk a reakció erősebbé tételére (Roche, Indianapolis, IN, USA) a gyártó ajánlott protokollja szerint (Borka, 2007; Halasz, 2006; Korompay, 2012; Lodi, 2006 ;Nemeth, 2009 ;Nemeth, 2009 ;Patonai, 2011 ;Schlachter, 2014 ;Sobel, 2006;Sobel, 2005).

7. táblázat A primer antitestek és a használt pozitív kontrollok. (Zymed Inc, San Francisco, CA, USA; DAKO, Glostrup, Denmark)

Antitest neve	Hígítás	Pozitív kontroll	Faj és klonalitás	Cég	Catalog No.
claudin-1	1:100	normal hámszövet	rabbit polyclonal	Zymed	18-7362
claudin-2	1:80	normál vastagbél	mouse monoclonal	Zymed	18-7363
claudin-3	1:80	normal vastagbél	rabbit polyclonal	Zymed	34-1700
claudin-4	1:100	normal vastagbél	mouse monoclonal	Zymed	18-7341
claudin-7	1:80	normál emlő	rabbit polyclonal	Zymed	34-9100
claudin-8	1:80	normál vese	rabbit monoclonal	Zymed	40-2600
claudin-10	1:60	normal vese	rabbit polyclonal	Zymed	38-8400
ZO-1	1:100	normál vékonybél	rabbit polyclonal	Zymed	40-2300
Occludin	1:100	normál vékonybél	rabbit polyclonal	Zymed	71-1500
E-cadherin	1:120	emlő duktális karc.	mouse monoclonal	DAKO	M3612
CK 7	1:300	normál epeút	mouse monoclonal	DAKO	M7018
Tricellulin	1:50	egér duodenum	rabbit polyclonal	Invitrogen	488400

Fluoreszcens immunhisztokémiai vizsgálatok: Immunfluoreszcens vizsgálataink során fagyasztott szöveti blokkokból készítettünk 5 µm vastag metszeteket, majd ezeket methanol és aceton 1:1 arányú keverékében a vizsgálandó szövetektől függően 5-10 percig -20°C-on fixáltuk, majd a metszeteket szobahőn szárítottuk. A diagnosztikus antitestek nem-specifikus fehérjekötődésének gátlásához a metszeteket szérum mentes blokkoló oldatban (Protein Block Serum-Free; DAKO, Glostrup, Dánia) inkubáltuk 30 percig, 37°C-on. A primer antitesteket 4°C-on, éjszakán át inkubáltuk a metszeteken, majd ezeket az elsődleges antitestek detektálására PBS mosást követően 30 percig szobahőmérsékleten, 1:200, PBS (Phosophate Buffered Saline) hígításban, sötétben inkubáltuk a megfelelő másodlagos antitestekkel /Alexa Fluor 568 konjugált, kecskében termelt, nyúl-ellenes IgG-vel (Invitrogen) vagy Alexa Fluor 488 jelölt, szamárban, egér ellen termelt IgG-vel (Invitrogen)/. Ez követően magfestésként 4’,6-diamino-2 phenylindole

(DAPI)–tartalmú Vectashieldet (Vector Labs., Burlingame, CA, USA) használtunk. A kettős immunfluoreszcens vizsgálatainkat több primer és szekunder antitest együttes inkubálásával a fentiek szerint végeztük. A kapott immunreakciókat fluoreszcens mikroszkóp (Leica, RXA, Wetzlar, Germany) és konfokális lézer scanning mikroszkóp (Bio-Rad MRC-1024 system, Bio-Rad Lab., Hercules, CA, USA) segítségével értékeltük.

Az alkalmazott immunreakciók kiértékelése: Az immunhisztokémiai reakciók kvantitatív elemzéséhez a metszeteket digitalizáltuk. Esetenként tíz-tizenöt véletlenszerűen kiválasztott, nem átfedő látóteret fotóztunk. le, majd az immunhisztokémiai reakció pozitivitásának, intenzitásának meghatározására digitalis morfometriát végeztünk (Leica Qwin Software; Leica, Wetzlar, Németország). A szoftver meghatározza a vizsgált látóterek teljes pixelszámához viszonyítva a pozitív területek pixelszámát, majd megadja az immunpozitív terület százalékos arányát. A reakciók kiértékelésekor az esetenként vizsgált látóterek értékeit átlagolva minden mintához átlag-terület százalék értéket rendeltünk (Gyongyosi,2014; Holczbauer,2013; Holczbauer,2014; Korompay,2012; Torzsok,2011).

III.2.3. Fehérje expresszió vizsgálata Western blot analízissel

Western-blot vizsgálatainkhoz fagyasztott mintákból izoláltuk a fehérjéket. A szövetekből 50-50 mg mennyiségű minta lett folyékony nitrogénben porítva, majd lízis-pufferben (20 mM TRIS pH7.5, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% TritonX-100 és proteáz-gátló koktél /Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA/) homogenizálva majd centrifugálva (13200 rpm fordulatszámon, 4°C, 5 perc). A minták fehérje koncentrációját Bredford-assay segítségével mértük, majd gélelektroforézist végeztünk. Ennek során mintánként 30 µg mennyiségű lizátumot futtattunk 10% SDS-poliakrilamid gélen, 200V feszültséggel 35 percen át. Ezután a gélt 100V feszültség mellett 75 percen keresztül, 4°C-on nitrocellulóz membránra blottoltuk. A mintánkénti fehérje mennyiség egyenletes eloszlásának ellenőrzésére Ponceau-S vörös festést alkalmaztunk. A Western blot során az antitest aspecifikus kötődésének kivédésére a blot membránt 30 percig 5% zsírmentes száraz tejben (Sigma), szobahőmérséketen inkubáltuk. Ezután a nitrocellulóz membránokat TRIS-pufferben (TBS) higított diagnosztikus antitestekkel (10. táblázat) inkubáltuk 4°C-on egy éjszakán át. TBS-Tween (0.1% Tween 20) mosást követően a membránt 2 órán át TBS-ben hígitott tormaperoxidáz (HRP)-konjugált másodlagos ellenanyagokkal (nyúl- és egérellenes antitestek; Dako, Glostrup, Dánia) szobahőmérsékleten inkubáltuk. A membránon kötődött antitesteket ezután kemilumineszcens detekciós rendszerrel (BioRad, Hercules, CA, USA) tettük kimutathatóvá és a reakciókat Kodak géldokumentációs rendszerrel detektáltuk és elemeztük (Kodak, Rochester, NY, USA).

III.2.4. Real-time RT PCR vizsgálatok az mRNS expresszió mérésére

Az FFPE mintákból végzett RNS izolálás során makrodisszekciót végeztünk. A makrodisszekált mintákból vagy Trizollal, High Pure RNA Paraffin (Roche;Indianapolis, IN) kittel vagy FFPE Mini kittel (QIAGEN, Hilden, Germany) végeztük az RNS izolálást a gyártó utasításai szerint. Az mRNS expresszió méréséhez koncentrációmérést követően 1:1 arányú cDNS átírás történt, majd a kapott cDNS-ekből valós idejű PCR-el detektáltuk a specifikus termékek stabil expressziójú referencia génhez (β-actin, GI:15928802 (Borka,2007; Halasz,2006; Holczbauer,2013; Korompay,2012; Lodi,2006; Torzsok,2011) vagy a konstitutívan expresszálódó ABL-ab mRNS, Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1(Korompay) viszonyított mennyiségét.

Trizollal történt RNS izolálás fagyasztott mintából: 5-20 mg szövetdarabhoz 1 ml trizol reagenst (Invitrogen Cat. No. 15596-026) adtunk. A mintákat sterilizált, DEPC kezelt vízzel átmosott homogenizátorral homogenizáltuk. A fázisok szeparálásához a trizolban homogenizált mintákat 15 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. Ezt követően mintánként, ml-enként 200 ul -20 ºC-os $CHCl_3$ –ot (Reanal Cat.:16900-1-08-65) adtunk, majd a mintákat 1 percig vortexeltük. Szobahőmérsékleten történt 3 perces inkubálás után a mintákat 2-8^{o}C-on 12000g sebességgel 15 percig centrifugáltuk. A felső fázist új, sterilizált centrifugacsőbe levéve (az alatta levő fázissal nem összekeverve) 1:1 arányban ismételten -20 ºC-os $CHCl_3$-t adtunk a mintákhoz, majd 1 percig vortexeltük az oldatokat, majd ismételten 12000g sebességgel 2 percig cenrifugáltuk a mintát 2-8^{o}C-on. Az RNS kicsapásához a felső vizes fázist új centrifúga csőbe levéve 500 ul -20 ºC-os izopropil alkohol (Merck Cat. No. 100995.1000) hozzáadása után vortexeltük a mintát 1 percig. Ezt 10 perces inkubáció követte szobahőmérsékleten. Ezután 2-8^{o}C-on 12000g sebességgel centrifugáltuk a mintát 10 percig. A kicsapódott, lecentifúgált RNS-ről a felülúszót óvatosan leöntöttük. A pellet RNS mosását 1ml 75% -20 ºC-os etanol (Merck Cat. 1.00983.2500) hozzáadásával végeztük, majd 1 percig vortexeltük a mintát. Ezután a mintát lecentrifugáltuk 5 percig 2-8^{o}C-on 7500g sebességgel. Az RNS újrafeloldásához a felülúszót eltávolítottuk, majd 5-10 percig párologtattuk az ethanolt a csövekből, majd 100 ul RNáz-mentes vízben (Eppendorf Cat. No. 0032006159) feloldottuk a pelletet. Az OD mérést Nanodrop 1000 (Wilmington, DE) spektrofotométerrel 260/280 nm hullámhosszon végeztük.

RNS izolálás FFPE mintákból: A teljes RNS izolálást High Pure RNA Paraffin (Roche;Indianapolis, IN) kittel vagy FFPE Mini kittel (QIAGEN, Hilden, Germany) végeztük a gyártó utasításai szerint, majd az izolált RNS-t -80˚C-on tároltuk. A genomiális DNS szennyeződés Turbo DNase emésztéssel lett eltávolítva (Ambion, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), a gyártó utasításai szerint.

cDNS készítés: A kapott mRNS mintákból 2.5 µg-ot tartalmazó térfogatot, a következő reagensekkel (ABI), és ultradesztillált vizzel összemérve 50 µl végtérfogatban a reakcióelegyet 0.2 ml-es eppendorf csőbe pipettázttuk, majd a 8. táblázatban leírt protokoll szerint Eppendorf PCR készülékkel cDNS készítettünk.

8. táblázat cDNS protokoll (reagensek, mennyiségeik, a reakció paraméterei).

Reagensek	Gyártó	Térfogat µl –ben (50µl-végtérfogathoz)	Reakció paraméterek	
RT puffer (10x)	ABI	5	25 ºC	10’
RT Random primer (10x)	ABI	5	37 ºC	120’
dNTP mix (25x) 100 µM	ABI	2	85 ºC	5”
20 U/µl Rnase Inhibitor	ABI	2.5	4 ºC	∞
Multi Sribe RevTranscr.	ABI	2.5		
dH_2O	Eppendorf	33-x		
mRNS (2.5 µg)		x		

mRNS expresszió mérése real-time PCR-el: A legyártott cDNS-ek 2-2 µl-éhez PCR puffert és primereket (9. táblázat), polimeráz enzimet, nukleotidokat, és ultradesztillált vizet tartalmazó mixet (23-23 µl-t) 96 lyukú lemezekre tettük, így minden minta duplikátumban volt lemérve. A reakció paraméterei szerinti amplifikációs protokollt ABI Prism 7000 vagy Roche Cobas Z480 real-time PCR készüléken futtattuk. Az amplifikációhoz a következő fázisokat és ciklusokat alkalmaztuk: 95 °C 2-10 percig, majd 40-45 ciklus: 95 °C 15-20 másodpercig, 60-63 °C 30-60 másodpercig, 72°C 15-60 másodpercig. A termék méretét, specificitását 1-2% agaróz gélelektroforézissel és olvadáspont-analízissel ellenőriztük, mely során 20 másodpercen át 95°C-os melegítést, majd 10 másodpercen keresztül 45°C-on végzett hűtést, majd 95°C-ra való újramelegítést végeztünk.

9. táblázat A real-time PCR reakcióhoz használt specifikus primerek.

év	**Forward szekvencia 5'- 3'irányban**	**Reverz szekvencia 5'- 3'irányban**	**Termék hossz**	**Gén index (GI)**
claudin-1	GCGCGATATTTCTTCTT GCAGG (588-609)	TTCGTACCTGGCATTGA CTGG (700-680)	113	21536297
claudin-2	CTCCCTGGCCTGCATT ATCTC (599-619)	ACCTGCTACCGCCACTC TGT (689-670)	91	38455423
claudin-3	CTGCTCTGCTGCTCGT GTCC (732-751)	TTAGACGTAGTCCTTGC GGTCGTAG (860-836)	129	21536298
claudin-4	GGCTGCTTTGCTGCAA CTGTC (875-895)	GAGCCGTGGCACCTTAC ACG (982-963)	108	34335232
claudin-7	CATCGTGGCAGGTCTT GCC (811-829)	GATGGCAGGGCCAAACT CATAC (928-907)	118	153792185
claudin-8	CCAATGCCATCATCA GAGATTTCT (497-520)	GTGGTCCATCCTAAGTA GAGAGCTTCT (587-561)	91	40788010
claudin-10	TGGATGTTCCCTATAT GCAAACAA (623-646)	AAACAGAGCGGCTCCTA ATTCA (713-692)	91	38570071
Tricellulin	TGGAACAACAGGAGAT AAATGAGC	GTCTCTTTGTCTGTCACCACTG	86	
β-actin	CCTGGCACCCAGCACA AT (1030-1047)	GGGCCGGACTCGTCATA C (1173-1156)	144	5016088
ABL-ab	ACGAGTCTGGTTGATG CTGTG	GGCGGACTGTGGCTTTGG	105	

Az amplikonok specificitásának ellenőrzésére a reakciókat követően olvadáspont analízist végeztünk.

III.2.5. A miR expresszió RTqPCR vizsgálata

A miR expressziót az alábbi TaqMan MicroRNA Assays-kkel vizsgáltuk (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA): miR-21 (ID:000397), miR-23a (ID:000399), miR-34a (ID:000426), miR-96 (ID:000186), miR-99a* (ID:002141), miR-122 (ID:002245), miR-125b (ID:000449), miR-181a-2* (ID:002317), miR-194 (ID:000493), miR-195 (ID:000494), miR-217 (ID:002337), miR-221 (ID000524), miR-224 (ID:002099). A reverz transzkripcióhoz TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit-t használtunk (Applied Biosystems) a gyártó utasításai szerint 7,5 μL végtérfogatban, mely 10 ng összemennyiségű RNS-t tartalmazott. A valós idejű PCR során TaqMan Universal PCR Master Mix No AmpErase UNG (Applied Biosystems) kit-et használtunk a gyártó előírásai szerint 10 μL össztérfogatban. A mintákból 0.65 μl cDNS-t adtunk a reakcióhoz. A mintákat duplikátumokban vizsgáltuk ABI PRISM 7000 real-time PCR system (Applied Biosystems) berendezésen. A relatív expressziót $2^{\Delta Cq}$ ($\Delta Cq=Cq_{ref}-Cq_{minta}$) módszerrel határoztuk meg. Referenciaként a legstabilabb értékként a miR-23a és a miR-34a Cq átlagát használtuk. A legstabilabb referenciát kiválasztó NormFinder szoftver számítása szerint *(ref miR-20)* ezen miR-ek expressziója volt a legstabilabb a vizsgált mintákban. Az irodalomban kiterjedten használt U6 snRNS (ID:001973) mennyisége nagy ingadozást mutatott a vizsgált mintákban, így referenciaként való használatát elvetettük.

A vizsgálandó mikroRNS-k kiválasztása, mikroRNS célkeresés.

A vizsgálni kívánt HCV receptorok (claudin-1, occludin, scavenger receptor 1B, CD81) mRNS-ét célzó kapcsolódó lehetséges mikroRNS-ek (miR) kiválasztását *in silico* végeztük a microRNA.org (http://www.microrna.org) internetes target predikciós adatbázis és Tömböl és mtsai által fejlesztett célkereső szoftver segítségével (Tombol,2009). Ezen alkalmazás három target predikciós adatbázis adatait veszi figyelembe: TargetScan 6.0 (http://www.targetscan.org), PicTar (http://pictar.mdc-berlin.de) és MicroCosm Targets Version 5 (http://www.ebi.ac.uk/enright-srv/microcosm/htdocs/targets/v5/). Az adatbázisok több, mint 500 HCV receptorra specifikus lehetséges miR-t jelöltek. A claudin-1-re (CLDN1) 39, ocludinra (OCLN) 13, CD81-re 1 (miR194) és a Scavenger receptor 1B-re (SCARB1) 8 miR szerepelt találatként. Ezekből szelektáltuk ki a következőket: *CLDN-1*: *miR21*, *miR34a*, *miR96*, *miR194*, miR195; *OCLN*: *miR122*, miR194, miR224; *CD81***:** miR23a, miR125b, *miR194***;** *SCARB1*: *miR96*, miR99a*, *miR125b*, *miR195* (a mindegyik adatbázisban szereplő miR-k dőlt betűvel szedve). A miR194 targetjei között mind a CD81, mind pedig a CLDN-1 is szerepel.

Az RNS izolálást és miR expresszió RTqPCR vizsgálatát a III./2/2-ben leírtaknak megfelelően végeztük. A relatív expresszió számolásához szükséges referencia miR-ek (U6, miR3258 és miR140) közül a miR140 mutatta mintáinkban a legstabilabb expressziót a NormFinder applikációs szoftver szerint (Andersen, 2004).

III.2.6. Statisztikai feldolgozás

A statisztikai vizsgálatokat az SPSS szoftver 15. verziójával (SPSS, Inc., Chicago, III) végeztük. A statisztikai elemzésnél a folytonos adatokat átlagérték ± standard deviációban, a 22. ábrán az átlagot és az átlag standard hibáját (standard error of mean) (SEM) ábrázoltuk. A kategorikus változók abszolút érték ± százalék formában kerültek megadásra. Egyvariációs analízis során a folytonos adatokat a populáció homogenitásának vizsgálata után (Levene-teszt) kétmintás t-próbával, ANOVA teszttel (Scheffe és Bonferroni posthoc tesztekkel), illetve Mann-Whitney féle U-teszttel, míg a kategorikus adatokat χ^2- próbával elemeztük. A túlélést Kaplan-Meier metodikával vizsgáltuk. A folytonos változók közötti kapcsolatot korreláció elemzéssel vizsgáltuk, Pearson korrelációs koefficiens használatával. Az eredményeket valamennyi statisztikai próbánál akkor tekintettük szignifikánsnak, ha $p<0,05$ volt.

A miR expressziós adatokat a relatív expressziós értékek mediántól való felfelé vagy lefelé való eltérése szerint osztottuk két csoportba: magas expressziójú csoport versus alacsony expressziójú csoport. A klinikopathologiai jellemzők és a miR expresszió közti kapcsolat vizsgálatára a Fischer féle exact tesztet használtuk. A statisztikai vizsgálatot a STATISTICA szoftverrel (StatSoft, Tulsa, Okalohoma, USA) végeztük. A betegek túlélését a Kaplan-Meier módszerrel elemeztük és a statisztikai különbségeket a log rank teszttel vizsgáltuk. A multivariáns túlélési analíziseket a Cox arányos kockázat modellel (proportional hazards model) végeztük. Az eredményeket valamennyi statisztikai próbánál akkor tekintettük szignifikánsnak, ha $p\leq0,05$ volt (Gelley,2014; Gyongyosi,2014; Gyugos,2014; Lendvai,2014).

Az analizált biliáris tumorok csoportjainak páronkénti összehasonlításánál Mann-Whitney tesztet alkalmaztunk, további korrekciós módszerként a Bonferroni-Holmes tesztet használtunk. Az immunhisztokémiai reakció intenzitása és pozitivitása közötti korrelációt Spearman-féle rang korrelációval számoltuk, a vizsgált minták egymástól történő elkülöníthetőségét diszkriminancia analízissel vizsgáltuk. A túlélési adatokat a GraphPad Prism programmal értékeltük (Nemeth,2009).

mRNS relatív expresszió statisztikai elemzése: Az mRNS szintek statisztikai elemzését Pfaffl publikációja szerint, a REST-384-beta-v2 szoftver segítségével végeztük (Pfaffl,2002). Két összehasonlítandó csoport referencia génekre/mikroRNS-kre normalizált Ct értékeket veszi figyelembe a számítás (ΔCt). Megfelelő hatékonyság esetén a ciklusonként termékduplázódás alapján a különbségeket ($\Delta\Delta$Ct) a 2 hatványkitevőjébe írva, további számolással megkapjuk a vizsgált csoportok közti kiindulási mRNS koncentráció különbséget.

IV. Eredmények

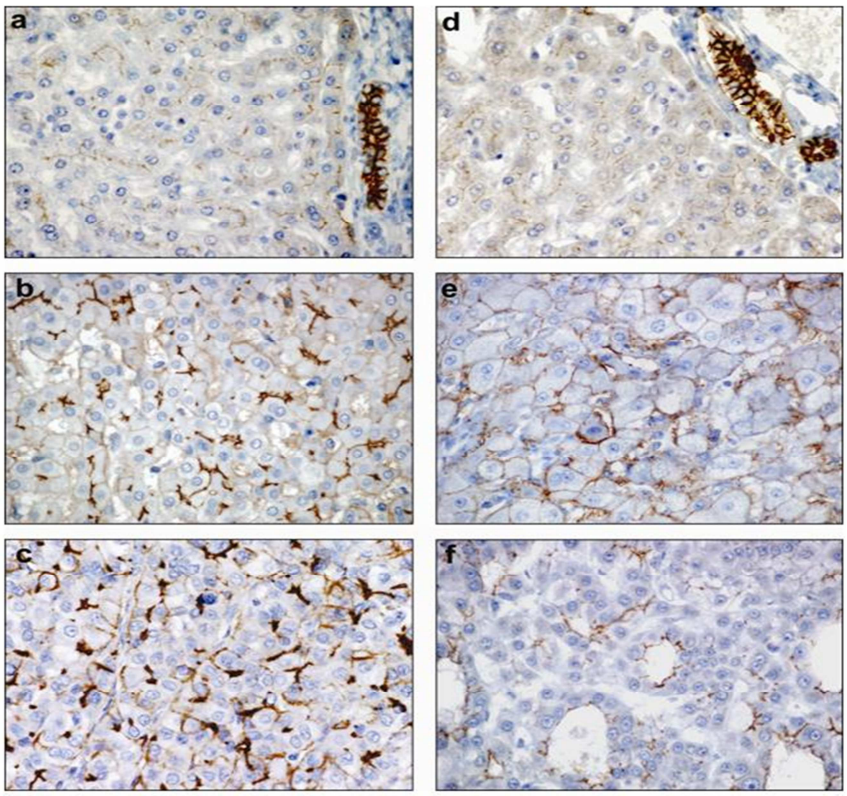
IV.1. A sejtkapcsoló struktúra alkotórészek expressziójának vizsgálata hepato-pancreato-biliáris daganatokban

IV.1.1. Sejtkapcsoló struktúra alkotórészek expressziója normál májban, cirrhosisban, hepatocelluláris carcinomában és áttéti májdaganatokban

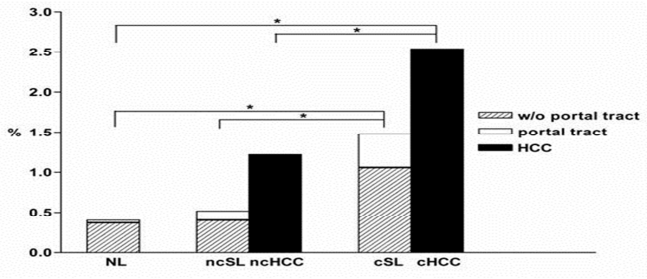
IV.1.1.1. Claudinok expressziós mintázatának vizsgálata normál májban, cirrhosisban és HCC-ben

A normál és tumor körüli májszövetben gyenge, valamint közepesen erős, lineáris, membranosus claudin-1 reakciót tapasztaltunk a hepatocyták érintkezési területein (10. ábra, a), míg az epeúti hámsejtekben erős, apikális festődést láttunk. A cirrhosisban és HCC-ben tapasztalt megemelkedett claudin-1 fehérje expresszió szintén membrán festődés formájában jelentkezett. A cirrhotikus nodulusok hepatocytáin, dominálóan a cirrhotikus göbök széli területein a normál májban tapasztaltaktól eltérően az IHC reakció gyakran a sejt teljes kerületén jelentkezett, bár eltérő intenzitással. (10. ábra, b). A HCC-k claudin-1 expressziójában nagy heterogenitás volt tapasztalható, de jellemzően a tumorsejtek többsége közepes, illetve erős membránreakciót mutatott (10. ábra, c).

Az immunhisztokémiai reakciók morfometriai kiértékelésekor a normál májban és a cirrhosisban az epeutak külön is ki lettek értékelve, hogy lehessen látni, hogy a csoportok között tapasztalt különbségeket a cirrhosist jellemző epeút proliferáció mennyire befolyásolja. A morfometriai vizsgálat is igazolta, hogy a HCC körüli cirrhotikus májszövet claudin-1 fehérje expressziója a nem cirrhotikus tumor körüli májszövethez képest szignifikánsan magasabb. Minden vizsgált cirrhosis talaján létrejött HCC szignifikánsan magasabb claudin-1 termelést mutatott a normál májhoz, valamint mind a cirrhotikus, mind a nem cirrhotikus tumor körüli májszövethez viszonyítva. Bár a cirrhosisban az epeútak ductularis reakciója jelentős mértékben kiveszi részét a pozitivitásból, de az epeutak kizárásával végzett morfometriai elemzés még markánsabban emelte ki a különbségeket. A claudin-1 immunreakció a cirrhosis talaján létrejött HCC-kben a nem cirrhotikus HCC-khez képest is szignifikánsan kifejezetteb volt. A cirrhosissal és HCC-vel kapcsolatos claudin-1 expressziós különbségeket a 11. ábra szemlélteti.



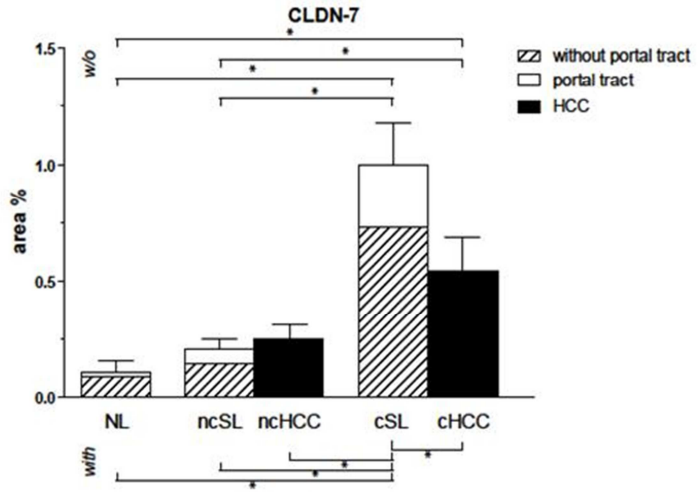
10. ábra Claudin-1 és claudin-7 fehérje expresszió detektálása immunhisztokémiai vizsgálattal normál májban, cirrhosisban és HCC-ben. a, claudin-1 reakció normál májban, d, claudin-7 normál májban: az epeutakban erős expresszió látható (BD), míg a hepatocyták gyenge festődést mutatnak (nyíl). Nagyítás: 600x. b: claudin-1 expresszió cirrhosisban; e, claudin-7 reakció cirrhosisban: a cirrhotikus nodulusokban a hepatocyták helyenként erős reakciót mutatnak, mely egyes májsejtekben a basolateralis felszín felé is kiterjed (nyilak). c, claudin-1 festődés cirrhotikus májban kialakult HCC-ben. A tumorsejtek claudin-1 expressziója a cirrhotikus nodulusok májsejtjeinél is erősebb (nyíl). f, claudin-7 reakció cirrhotikus májban kialakult HCC-ben. A tumorsejtek claudin-7 expressziója a cirrhotikus nodulusok hepatocytáinál gyengébb, és főleg az alveolaris struktúrák apikális felszínére lokalizált (nyíl). Nagyítás: 600x.



11. ábra A claudin-1 immunhisztokémiai pozitivitás morfometriai analízise a mért terület százalékaiban az epeutakkal együtt, illetve az epeutak nélkül mérve. NL normál máj, ncSL nem cirrhotikus környező, tumormentes máj, ncHCC nem cirrhotikus májban kialakult hepatocelluláris carcinoma, cSL cirrhotikus környező, tumormentes máj, cHCC cirrhotikus májban kialakult hepatocelluláris carcinoma; w/o: nélkül. A csoportok között az epeutakkal együtt és nélkülük mérve is szignifikáns különbségek mutatkoznak. A kapcsok a csillagokkal két csoport között a Kruskal-Wallis teszttel kapott szignifikáns különbséget jelzi (p< 0,05).

Claudin-7: A normál és tumor körüli májszövetben a claudin-7 IHC reakció gyenge membránfestődést adott a hepatocytákon, míg az epeúti hámsejtek erős festődést mutattak (10. ábra, d). A cirrhosis csoportban a hepatocytákat közepes és erős claudin-7 expresszió jellemezte (10. ábra, e), míg 7 mintában a dysplasticus májsejt fészkek igen intenzív membrán estődést mutattak. A HCC-k tumorsejtjei közepesen erős immuhisztokémiai reakciót mutattak. A pseudoacinária struktúrák egyértelműen apikális festődést adtak (10. ábra, f). Az immunreakciók epeutak

kizárásával végzett morfometriai elemzése is kimutatta, hogy a cirrhosis talaján kialakult HCC-kben mind maga a tumor, mind pedig a cirrhosis a normál májhoz és a nem cirrhotikus tumor körüli májszövethez képest erősebben expresszálja a claudin-7-t. A cirrhosis talaján kifejlődött HCC-k ugyanakkor a tumor körüli cirrhosishoz viszonyítva alacsonyabb claudin-7 festődést mutattak. A cirrhosisban észlelt ductuláris reakció a claudin-7 esetében is jelentős részt képvisel az IHC pozitivitásból. A cirrhosissal és HCC-vel kapcsolatos claudin-7 expressziós különbségeket a 12. ábra szemlélteti.



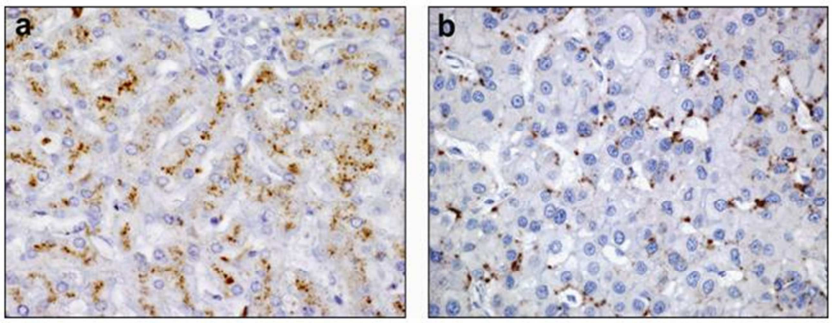
12. ábra A claudin-7 immunhisztokémiai pozitivitás morfometriai analízise a mért terület százalékokban az epeutakkal együtt, illetve az epeutak nélkül. NL normál máj , ncSL nem cirrhotikus környező, tumormentes máj , ncHCC nem cirrhotikus májban kialakult hepatocelluláris carcinoma, cSL cirrhotikus környező, tumormentes máj , cHCC cirrhotikus májban kialakult hepatocelluláris carcinoma; w/o: nélkül. A csoportok között az epeutakkal együtt (oszlopok alatt) és nélkülük mérve (oszlopok felett) is szignifikáns különbségek mutatkoznak. A kapcsok a csillagokkal két csoport között a Kruskal-Wallis teszttel kapott szignifikáns különbséget jelzi (p< 0,05).

A HCV fertőzés összefüggése a claudin-1 és -7 pozitivitással:

A claudin-1 és -7 immunhisztokémiai reakciók összehasonlító morfometriai elemzése a HCV pozitív és HCV negatív alcsoportok között csak tendenciákat mutatott, melyek közül a claudin-7 IHK reakció a nem cirrhotikus, tumor körüli májszövetben a HCV fertőzés esetében magasabb expressziót adott, de ezen csoport minden vizsgált tagjában jelentős fibrosis is tapasztalható volt, míg a HCV negatív csoportban nem volt detektálható fibrosis. Összességében nem találtunk a HCV fertőzéshez köthető szignifikáns fehérje expressziós eltéréseket.

A claudin-2 IHC reakció granuláris jellegű cytoplasmatikus és membranosus/perimembranosus pozitivitást eredményezett mind a normál, mind pedig a tumoros sejtekben. A tumor körüli cirrhotikus májszövet és a nem cirrhotikus tumor körüli májszövet és a normál máj nem mutatott eltérés a claudin-2 termelődésben, míg a HCC-k csökkent expressziót mutattak. A tumor körüli májban a cirrhosis jelenléte nem befolyásolta a HCC-k claudin-2

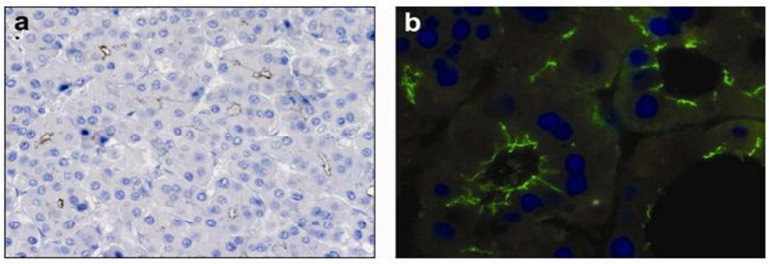
expresszióját. A claudin-2 immunohisztokémiai reakciót normál májban és HCC-ben a 13. ábra mutatja.



13. ábra Claudin-2 expresszió normál májban (a) és HCC-ben (b). A HCC-k a környező tumormentes májszövethez és a normál májhoz képest csökkent claudin-2 fehérje expressziót mutatnak.

Claudin-3: Gyenge claudin-3 festődést tapasztaltunk a normál hepatocytákon, míg az epeúti hámsejtek erősebb reakciót adtak. A cirrhosisban és a HCC-ben is gyenge membrán festődést láttunk, míg a morfometriai elemzés nem talált különbséget a normál, cirrhotikus és HCC minták csoportjai között.

Claudin-4: A normál hepatocyták nem mutattak claudin-4 IHK reakciót, míg az epeúti hámsejtek többsége gyenge vagy közepesen erős festődést adott. A claudin-4 expresszió a HCC-kben a normál májhoz és a cirrhosishoz képest egyértelműen csökkent volt, mely a HCC-ben főleg a HCC-n belül az epeutak hiányának köszönhető. Egyes HCC-kben (4/30) csak az alveoláris/pseudoglanduláris struktúrák sejtjei mutattak gyenge apikális jelölődést, míg a vizsgált HCC-k túlnyomó többsége claudin-4 negatív volt. (14. ábra).

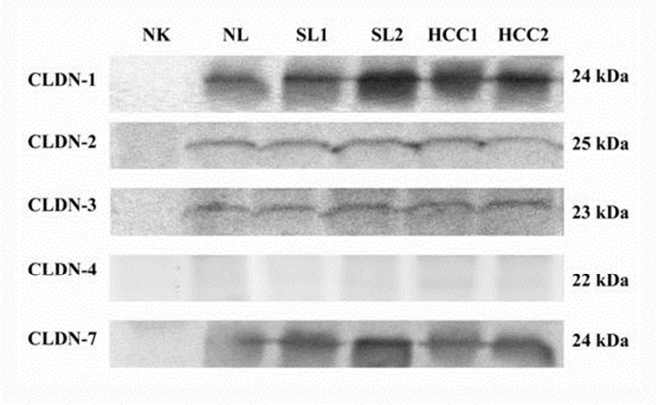


14. ábra Claudin-4 expresszió HCC-ben. a, Claudin-4 immunohisztokémiai vizsgálat. b, Claudin-4 kimutatása immunfluoreszcenciával. Nagyítás: 600x

A claudin fehérje expresszió vizsgálata Western blot analízissel.

A Western blot analízis megerősítette az IHC-val kapott csoportok közti eredményeket (15. ábra). A detektált claudinok mérete az irodalmi adatoknak megfelelő volt: a claudin-1, -2, -3, és -7-nak megfelelően 21, 23, 24, és 23 kDa. A claudin-4 termelődése nem volt kimutatható. A claudin-1 és claudin-7 expresszója a normál májhoz képest emelkedett volt cirrhosisban és erős claudin-1 expresszót találtunk HCC-ben is. A pozitivitások közül a claudin-2 szignál volt a leggyengébb a HCC-k körüli cirrhosisban. A claudin-3 pozitív csíkok erőssége nem mutatott eltérést a minták között.

dc_1040_15



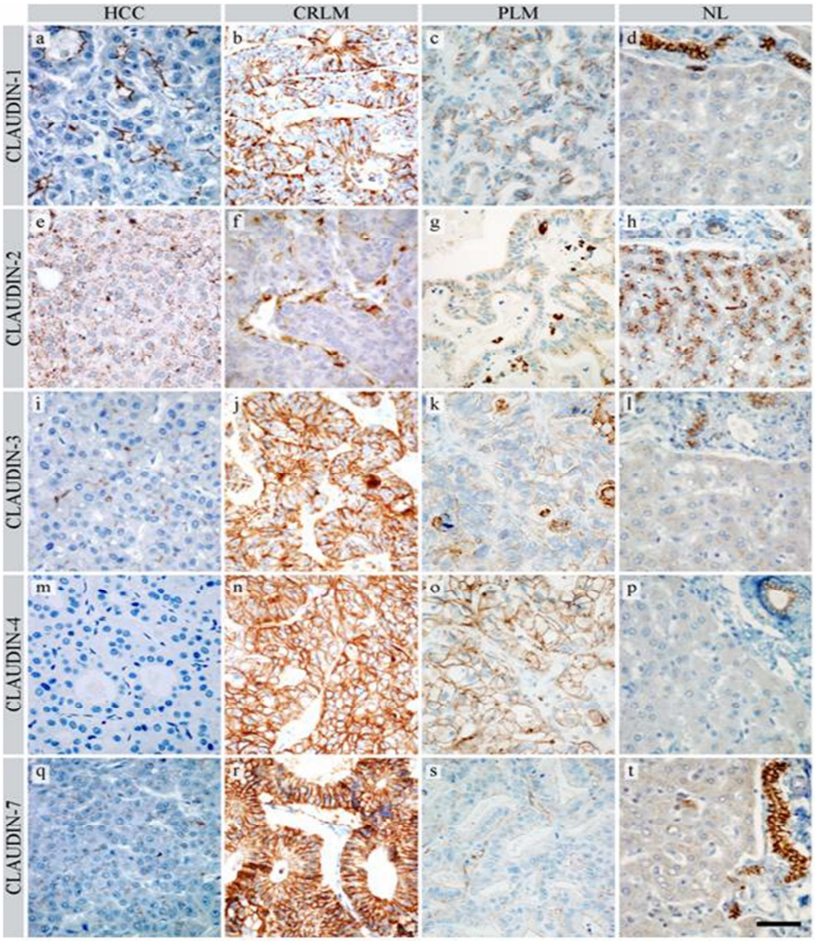
15. ábra Claudin-1, -2, -3, -4 and -7 fehérje expresszió vizsgálata Western blot analízissel HCC-ben és a körenyező tumormentes májban: CLDN: claudin; NK: negatív kontroll; NL: normál máj; SL1: nem cirrhotikus környező máj, SL2: cirrhotikus környező máj, HCC1: nem cirrhotikus májban kialakult hepatocelluláris carcinoma; HCC2: cirrhotikus májban kialakult hepatocelluláris carcinoma.

Összefoglalva: Az epeutakban a claudin-1, -2, -3, -4 és -7 expresszálódtak, azonban a normál hepatocytákban jellemzően a claudin-4 nem termelődött, azonban a többi vizsgált claudin az epeutakhoz képest gyengébben, de expresszálódott. A claudin-1 és -7 fehérje erősen expresszálódott az epeutakban, míg a májsejtek gyenge festődést mutatnak. A normál májhoz képest a nem cirrhotikus máj és a nem cirrhotikus májban keletkező HCC sem mutat szignifikáns expressziós eltérést. A normál májjal ellentétben a cirrhotikus nodulusokban a hepatocyták egyes területen a basolateralis felszín felé is kiterjedő erős claudin-1 IHC reakciót mutatnak, míg a cirrhotikus májban kialakult HCC-ben a claudin-1 és claudin-7 festődés még a cirrhosisban tapasztalthoz képest is szignifikánsan emelkedett. A normál májhoz képest a cirrhosis és a HCC is szignifikánsan megemelkedett claudin-1 és -7 fehérje expressziót mutat. A cirrhosist a nem cirrhotikus tumor körüli májszövethez képest, valamint a cirrhosis talaján kialakult HCC-t a nem cirrhosis talaján kialakult HCC-hez képest is megnövekedett claudin-1 és claudin-7 fehérje termelődés jellemzi. A HCC tumorsejtek claudin-1 expressziója a cirrhotikus nodulusok májsejtjeinél is erősebb, azonban a tumorsejtek claudin-7 expressziója a cirrhotikus nodulusok hepatocytáinál kisebb mértékű. A vizsgált csoportok közti különbségek morfometriailag mind az epeutakkal együtt, mind nélkülük mérve is szignifikánsnak bizonyultak. A HCV fertőzöttség nem okozott szignifikáns eltérést HCCk vagy a normál májszövet expressziós mintázatában a HCV negatív csoportokhoz képest.

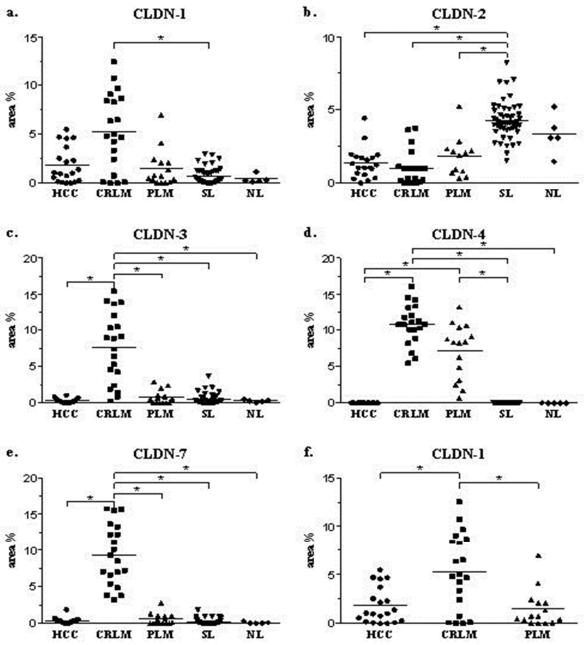
IV.1.1.2. Claudinok fehérje expressziója colorectalis carcinomák és ductalis pancreas carcinomák májáttétjeiben, összevetve a hepatocelluláris carcinomában talált mintázattal.

A claudin-1 immunhisztokémiai reakció membrán pozitivitást eredményezett, mely a hepatocelluláris carcinoma (HCC) sejtekben a trabecularis/glanduláris struktúrákban jellemzően apikálisan helyezkedett el (16. a. ábra), míg a colorectalis carcinomák májáttétjeiben (CRLM) és

ductalis pancreas carcinomák májáttétjeinek (PLM) tumorsejtjeiben a sejtek teljes kerületén kimutatható volt a festődés (16. b,c. ábra). A normál és tumor körüli májszövetben az epeutak erős pozitivitást adtak, míg a hepatocyták gyengén pozitívnak bizonyultak, döntően az apikális felszínen (16. d. ábra). A morfometriai kiértékelés alapján a claudin-1 immunfestődés a CRLM csoportban volt a legmagasabb a HCC-hez és a PLM-hez képest (16. a. ábra). A különbségek statisztikailag akkor bizonyultak szignifikánsnak, ha Kruskal-Wallis elemzésből kizártuk a tumor körüli májszövet csoportjait (16. f. ábra; CRLM versus HCC, p=0,032; CRLM versus PLM, p=0,008).



16. ábra Claudin expresszió hepatocelluláris carcinomában (HCC), colorectalis carcinoma májmetasztázisában (CRLM), pancreas ductalis carcinoma májmetasztázisában (PLM), és normál májban (NL). (a, b, c, d) Claudin-1 expresszió HCC-ben, CRLM-ben, PLM-ben és normál májban, a felsorolás sorrendjében. (e, f, g, h) Claudin-2 reakció HCC-ben, CRLM-ben, PLM-ben és normál májban, a felsorolás sorrendjében. (i, j, k, l) Claudin-3 festődés HCC-ben, CRLM-ben, PLM-ben és normál májban, a felsorolás sorrendjében. (m, n, o, p) Claudin-4 immunhisztokémiai reakció HCC-ben, CRLM-ben, PLM-ben és normál májban, a felsorolás sorrendjében. (q, r, s, t) Claudin-7 festődés HCC-ben, CRLM-ben, PLM-ben és normál májban, a felsorolás sorrendjében. A képek egyforma nagyítással készültek, a méretjelölés: 50 mm.



17. ábra A claudin immunhisztokémiai reakciók morfometriai mérésének eredménye az egyes mintákban. Claudin: (CLDN). A vonalak a csoportok középértékét mutatják. A csillagokkal jelölt kapcsok két csoport közötti szignifikáns különbséget jeleznek ($p<0.05$). HCC: hepatocelluláris carcinoma, CRLM: colorectalis carcinoma májmetasztázisa, PLM: pancreas ductalis carcinoma májmeasztázisa, SL: környező tumormentes máj, NL: normál máj. A claudin-1 tekintetében a 17./a. ábra a nem tumoros csoportokkal együtt mutatja a Kruskal-Wallis analízis eredményét, míg a 17./f. a nem tumoros csoportok nélkül végzett Kruskal-Wallis analízis eredményét demonstrálja.

A claudin-2 immunfestődés granuláris cytoplasma pozitivitást adott mind a tumorcsoportokban (16. e–g ábra), mind pedig a normál sejtekben (16. h ábra). Mind a három vizsgált tumorcsoportban szignifikáns csökkentést tapasztaltunk a reakció mértékében - illetve az ezt jelző terület százalékos pozitivitásban - a környező májszövethez képest, ahol mind az eputak, mind pedig a hepatocyák intenzív festődést mutattak (16. b ábra).

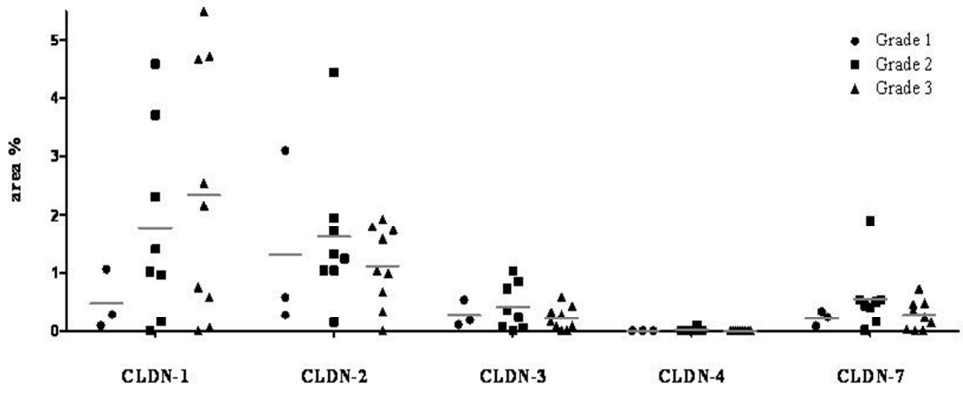
A claudin-3 IHC reakció a CRLM-ben (16. j ábra) szignifikánsan erősebb membranosus reakciót adott a másik két csoporthoz képest (16. c ábra). A HCC és a tumor körüli májszövetben a hepatocyták gyenge és elszórt pozitivitást adtak (16. i ábra), míg az epeutak erős festődést mutattak (16. l ábra). A PLM csoportban szintén gyenge és fokális claudin-3 szignál volt detektálható az esetek többségében (10/15 minta, 16. k ábra).

A claudin-4 IHC reakció mind a CRLM, mind pedig a PLM csoport mintáiban erős membrán pozitivitást adott (16 n,o ábra) és statisztikailag nem mutatkozott különbség e két csoport között (16 d ábra). Ezzel éles ellentétben a claudin-4 fehérje sem a HCC tumorsejtekben, sem pedig a normál hepatocytákon nem volt kimutatható (16. m ábra), míg normál májban és a tumor körüli májszövetben az epeutak erős pozitivitást adtak (16. p ábra).

A claudin-7 immunisztokémiai reakció a CRLM csoportban (16.r ábra), a másik két vizsgált csoporthoz képest szintén szignifikánsan emelkedettnek bizonyult (17. e ábra). A 15 PLM minta közül mindössze 9 esetben találtunk gyenge és fokális pozitivitást (16. s ábra) és a normál hepatocytákon és a HCC sejteken is csak gyenge membránfestődést tapasztaltunk (16. q, t ábra).

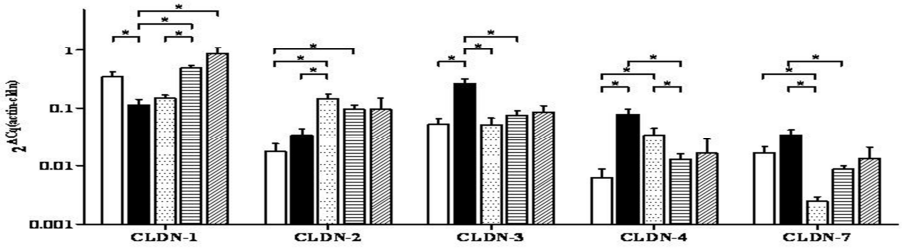
Mindhárom tumorcsoportot figyelembe véve a HCC közepesen erős claudin-1 és gyenge claudin-2, -3 és -7 pozitivitást adott, míg negatívnak bizonyult claudin-4-re. A CRLM-t ezzel ellentétben erős claudin-1, -3, -4, és -7 festődés jellemezte, míg gyenge claudin-2 pozitivitás volt kimutatható. A PLM mintákban erős claudin-4 IHC reakciót detektáltunk, a claudin-1, -2, -3, és -7 festődés azonban közepesen vagy gyengén volt pozitív.

Az alacsonyabban differenciált, magasabb grade-el rendelkező HCC-k a claudin-1 fehérje expresszió növekvő tendenciáját mutatták, de ez nem bizonyult szignifikánsnak. A többi vizsgált claudin és a HCC grade-k között nem találtunk összefüggést (18. ábra)

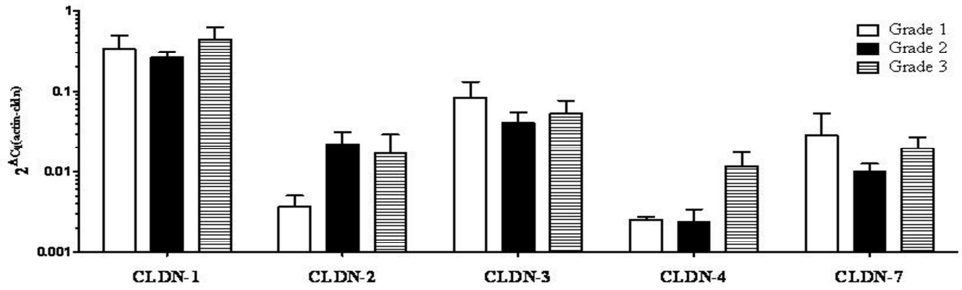


18. ábra A claudinok (CLDN) immunhisztokémiai reakcióinak morfometriai kiértékelése a hepatocelluláris carcinoma (HCC) grade-k szerint. A vonalak a csoportok középértékeit jelzik.

A relatív mRNS expresszió real-time RT-PCR vizsgálata a claudin mRNS termelődésben döntően az immunhisztokémiai vizsgálattal a fehérje expresszióban talált különbségekhez hasonló eltéréseket detektált a vizsgálat csoportok között. Referencia génként a β-actint használtuk. (19. ábra). A claudin-3 és -4 mRNS expresszió az IHC morfometriához a CRLM csoportban szignifikánsan magasabb különbséget talált a tumor körüli májszövethez és a HCC-hez képest is. Hasonlóan magasabb claudin-3 expresszió volt látható CRLM-ben a PLM csoporthoz képest. Ezen felül a CRLM csoportban a claudin-7 mRNS expresszió szignifikánsan magasabb volt a tumormentes májszövethez és a PLM-hez képest is, míg ennek a claudinnak a termelésében a HCC és a CRL nem mutatott eltérést. A morfometriai eredményekhez hasonlóan a HCC-ben és CRLM-ben észlelt claudin- 2 szintek alacsonyabbak voltak a tumormentes májban mért szintekhez képest, és ez a HCC-vel való összevetésben szignifikánsnak is bizonyult, míg a PLM csoportban a claudin-2 mRNS expresszió nem mutatott csökkenést a környező májszövethez képest. Az mRNS expresszió az immunhisztokémiával észlelt fehérje termeléshez képest a claudin-1 esetében mutatta a leglényegesebb eltérést, mely a CRLM csoportban a várt, emelkedett expresszió helyett szignifikánsan csökkent volt a HCC-hez és a környező májszövethez képest. Hasonlóan, a PLM csoport alacsonyabb claudin-1 mRNS expressziót mutatott a HCC-hez és a környező májszövethez viszonyítva. Az mRNS expresszió nem adott összefüggést a HCC-k differenciáltságával (20. ábra).



19. ábra A claudinok (CLDN) β-actinhoz viszonyított relatív mRNS expressziójának különbségei. A csillagokkal jelölt kapcsok két csoport közötti szignifikáns különbséget jeleznek (p<0.05). Fehér oszlopok: hepatocelluláris carcinoma (HCC), fekete oszlopok: colorectalis carcinoma májmetasztázisa (CRLM), Pontozott oszlopok pancreas ductalis carcinoma májmeasztázisa (PLM), Vízszintesen csíkolt oszlopok: környező tumormentes máj (SL), ferdén csíkolt oszlopok: normál máj (NL).



20. ábra A claudinok (CLDN) b-actinhoz viszonyított relatív mRNS expresszióinak különbségei a hepatocelluláris carcinoma (HCC) gradek szerint.

Összefoglalva: A CRLM mintákban erős claudin-3 és -7 immunohisztokémiai pozitivitást észleltünk, mely a HCC és PLM csoportokhoz képest szignifikánsan magasabbnak bizonyult.
A claudin-1fehérje szintén erős IHC pozitivitást adott a colorectalis carcinoma májáttétjeiben, míg a PLM és a HCC alacsonyabb expressziót mutatott. A CRLM és PLM csoportok egyaránt erős claudin-4 pozitivitást mutattak, míg a claudin-4 immunreakció gyakorlatilag negatív volt HCC-ben. A claudin-2 IHC reakció erősen pozitív volt a tumormentes májszövetben, míg a tumorok ehhez képest szignifikánsan gyengébb termelődést mutattak. Az mRNS expresszióban talált különbségek nagyrészt megegyeztek az immunhisztokémiai kiértékelés során kapott eredményekkel.

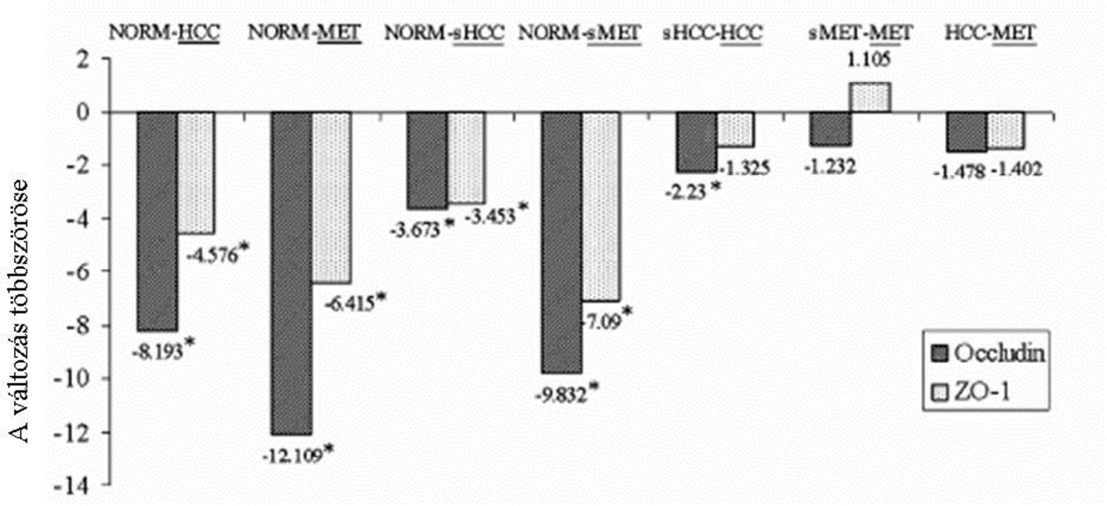
IV.1.1.3 Az occludin és ZO-1 mRNS és fehérje expresszió vizsgálata normál májmintákban, hepatocelluláris carcinoma mintákban és colorectalis carcinomák májmetasztázisaiban

mRNS expresszió vizsgálata: Az occludin és ZO-1 mRNS expresszió kimutatható volt a vizsgált csoportokban.

Az occludin a HCC csoportban a normál májhoz képest 8,2-szeres csökkenést mutatott és a tumor körüli májszövethez képes is 2,2-szeresen csökkent volt az mRNS termelődése. A colorectalis carcinoma májáttétjei és a tumor körüli májszövet között nem volt szignifikáns különbség, azonban a májáttétek a normál májhoz képest jelentősen csökkent (12,1-szeres) occludin

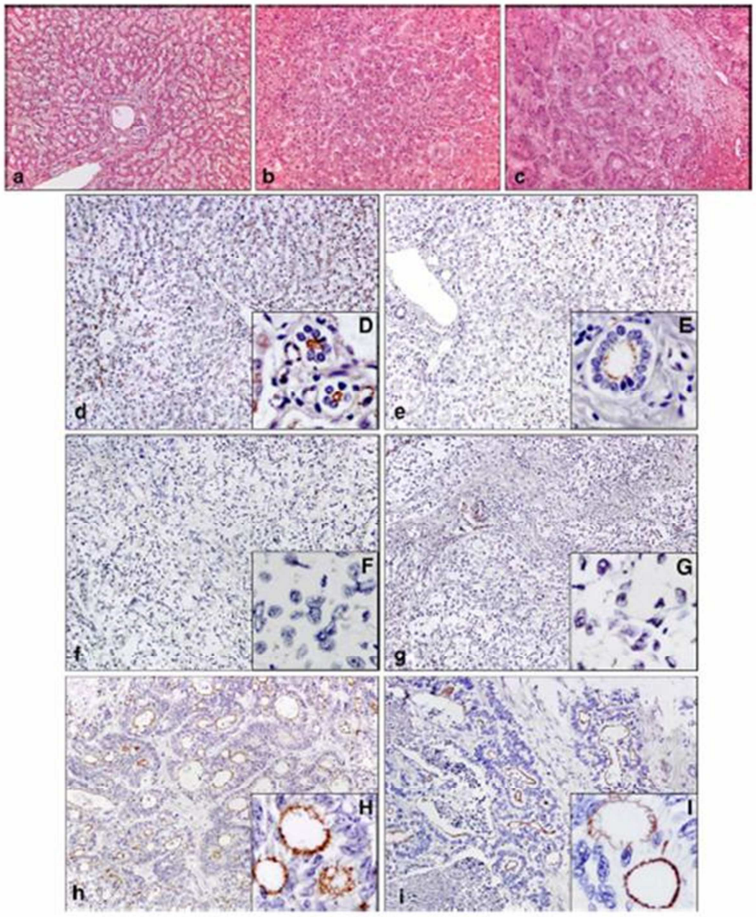
mRNS termelődést mutattak, és a HCC csoporthoz képest is 1,5-szeresen csökkent expresszióval rendelkeztek. A normál májmintákhoz viszonyítva a primer és áttéti tumorok körüli tumormentes májszövet is 3,7-szeresen, illetve 9,8-szeresen alacsonyabb occludin expresszióval rendelkezett.

A ZO-1 mRNS expresszió a HCC csoportban a normál májhoz viszonyítva 4,6-szeresen, míg a tumor körüli májszövethez képest 1,3-szeresen csökkent termelődést mutatott. A májáttétekben a ZO-1 mRNS expresszió 6,4-szeresen kisebb volt a normál májhoz képest, míg a környező tumormentes májszövethez képest nem volt szignifikáns különbség. A HCC csoportban a májáttétekhez viszonyítva 1,4-szeresen, de nem szignifikánsan emelkedett ZO-1 termelődést detektáltunk. Az occludinhoz hasonlóan a ZO-1 mRNS szint is szignifikánsan alacsonyabb volt a HCC és a májmetasztázis csoportban a normál májhoz képest (3,5-szeres,valamint 7,1-szeres különbség) (21.ábra).



21. ábra Normál májminták, hepatocelluláris carcinoma minták és colorectalis carcinomák májmetasztázisainak mRNS expressziója. Az oszlopok az expresszió többszörösének mértékét mutatják az összehasonlított csoportokban, az aláhúzott csoporthoz mérve a páros összehasonlítás első tagját. A csillaggal jelölt értékek statisztikailag szignifikáns különbséget jeleznek (p□0.05). NORM: normál máj; HCC: hepatocelluláris carcinoma; MET: colorectalis carcinoma májmetasztázisa; sHCC: hepatocelluláris carcinoma körüli tumormentes májszövet; sMET colorectalis carcinoma májmetasztázisa körüli tumormentes májszövet.

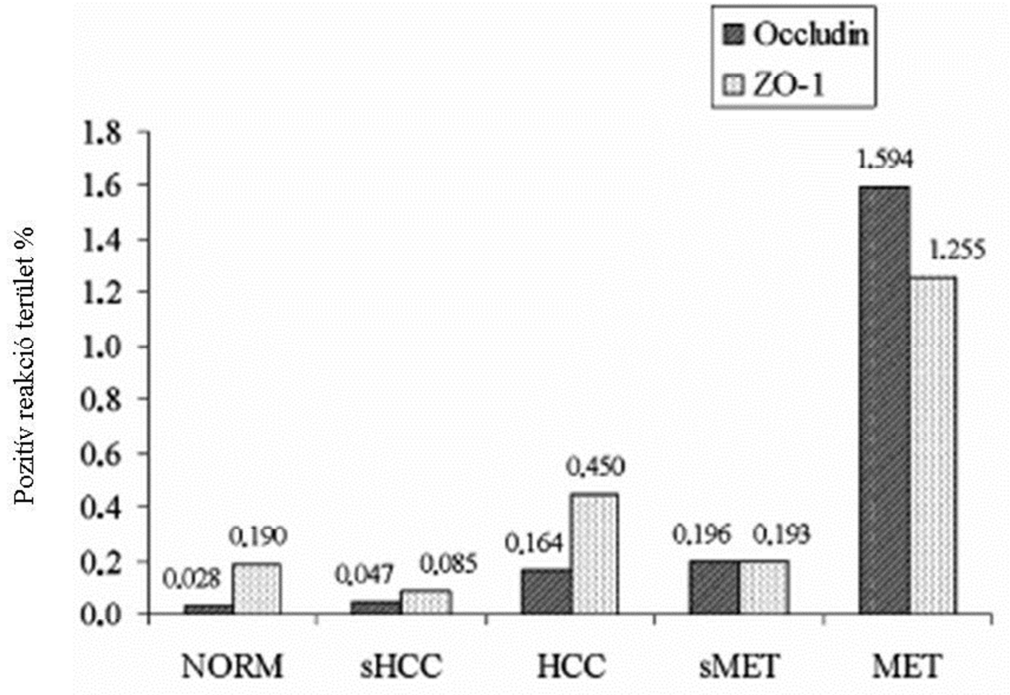
Immunhisztokémia: Az occludin és ZO-1 IHC reakció a normál májban membrán festődést adott, a hepatocytákon gyenge pozitivitást, míg az epeutakon (az eputak luminális pólusán) erős pozitivitást észleltünk (22. ábra d,e). A HCC esetek többsége negatív volt occludinra és ZO-1-re (22. ábra f,g), egyes esetekben azonban körülírt, kis területeken gyenge membrán pozitvitás volt detektálható. Ezzel ellentében az occludin és a ZO-1 erős membrán pozitivitást adott a colorectalis carcinoma májmetasztázisain, különösen a mirigyek luminális póusán tapasztaltunk erős festődést. (22. ábra h,i). A morfometriával mért immun-pozitív területek a metasztázisokban voltak a legmagasabbak: az occludin terület pozitivitás 1.6%, míg a ZO-1 festődés 1,3% volt. Az áttéti májtumorokban az occludin and ZO-1 expresszió szignifikánsan magasabb volt a többi vizsgált csoporttal összehasonlítva (10. táblázat, 23. ábra).



22. ábra Fehérje expresszió detektálása IHK vizsgálattal. Pozitiv occludin and ZO-1 IHK reakció a normál májszövet epeútjainak hámjában (occludin: d, D; ZO-1: e, E). Az occludin és a ZO-1 nem expresszálódik a HCC-ben (occludin: f, F; ZO-1: g, G). A colorectalis carcinoma májmetasztázisaiban az occludin és a ZO-1 festődés a tumorsejtek lumináris pólusán mutatkozik (occludin: h, H; ZO-1: i, I). a.: normál máj hematoxylin–eosin festés, b.: HCC hematoxylin–eosin festés, c.: colorectalis carcinoma májmetasztázisainak hematoxylin–eosin festése (nagyítás: a, b, c, d, e, f, g, h, i: 200x; D, E, F, G, H, I: 600x

10. táblázat Az occludin és ZO-1 IHC morfometriai kiértékelése HCC-ben, colorectalis carcinoma májmetasztázisaiban és normál májban. Az occludin és ZO-1 IHC reakció középértékei és a csoportok páronkénti összehasonlításakor a Mann–Whitney U-test valószínűségi értékei. U: megnövekedett expresszió D: csökkent expresszió NS: nem szignifikáns, NORM: normál máj, HCC: hepatocellularis carcinoma, MET: colorectal carcionoma májmetasztázisa, sHCC: HCC-t környező tumormentes májszövet, sMET: MET-t környező tumormentes májszövet.

	Occludin	ZO-1
NORM-HCC	D 8.193*	D 4.576*
	p=0.001	p=0.001
NORM-sHCC	D 3.673*	D 3.453*
	p=0.0095	p=0.022
NORM-sMET	D 9.832*	D 7.09*
	p=0.002	p=0.0075
NORM-MET	D 12.109*	D 6.415*
	p=0.001	p=0.001
sHCC-HCC	D 2.23*	D 1.325
	p=0.0435	NS
sMET-MET	D 1.232	U 1.105
	NS	NS
HCC-MET	D 1.478	D 1.402
	NS	NS



23. ábra Az occludin és ZO-1 IHK reakció Leica Qwin Prof szoftverrel végezett morfometriai kiértékelésének grafikus ábrázolása. NS: nem szignifikáns, NORM: normál máj, HCC: hepatocellularis carcinoma, MET: colorectal carcionoma májmetasztázisa, sHCC: HCC-t környező tumormentes májszövet, sMET: MET-t környező tumormentes májszövet.

Összefoglalva: A hepatocytákon immunhisztokémiai vizsgálattal gyenge ZO-1 és occludin fehérje expressziót találtunk, míg az epeutak e két fehérje erős expresszióját mutatták. A normál májhoz

képest mind a hepatocelluláris carcinomát, mind pedig a colorectális carcinoma májmetasztázisait csökkent occludin és ZO-1 mRNS expresszió jellemzi. Amíg azonban a HCC tumorsejtjei nem mutattak immunpozitivitást a ZO-1-re és az occludinra, addig a colorectalis carcinoma májmetasztázisaiban e két fehérje erős festődési reakciója volt detektálható.

IV.1.2. Sejtkapcsoló struktúra alkotórészek expressziós profiljának meghatározása a normál biliáris epithel különböző szakaszain és ezen szakaszok epeúti tumoraiban

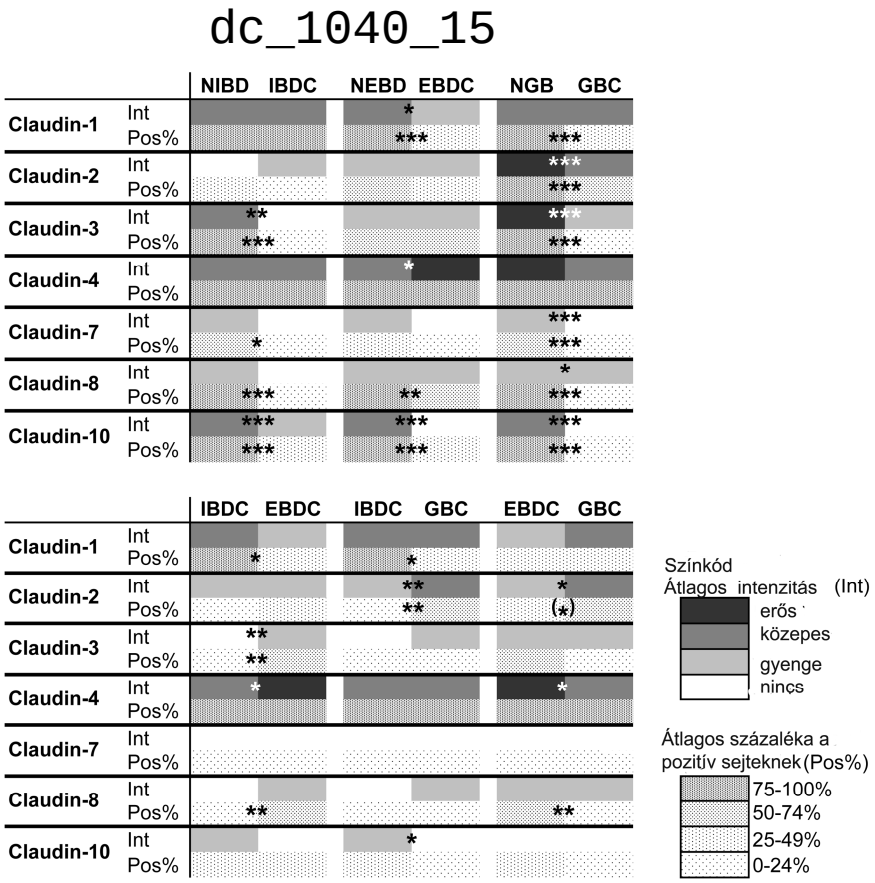
IV.1.2.1. A claudinok expressziós profiljának meghatározása a normál biliáris epithel különböző szakaszain és ezen szakaszok epeúti tumoraiban

A májminták vizsgálata során megfigyeltük, hogy az epeutak is többféle claudint expresszálnak, ezért kíváncsiak voltunk, hogy vannak-e különbségek a TJ mintázatban a humán epeútrendszer különböző szakaszaiból (intrahepatikus, ductus hepaticus, ductus choledochus, epehólyag) származó cholangiocarcinomák között ? Utalhatnak-e ezen sejtkapcsoló struktúrákkal (claudin-1, -2, -3, -4, -7, -8 és -10, e-cadherin, occludin, ZO-1) és egyéb markerekkel (CK7, CK19, CK20 és HSA) kapcsolatos mRNS és fehérje expresszióbeli különbségek arra, hogy ezen daganatok kialakulása és progressziója nem egységes, feltárhatók-e különbségek a hisztogenezis és a topográfiai tekintetében?

A claudin-1, -3, -4, -8, és -10 immunhisztokémiai reakció a normál biliáris epithelben membranosus reakciót adott. A claudin-2 a többi általunk vizsgált szövetekhez hasonlóan és az irodalomban is szereplő adatok szerint a normál epeúti citoplazmatikus, perimembranosus festődést adott. A claudin-7 fehérje esetében az immunhisztokémia a normál epehólyagban a membrán pozitivitás mellett citoplazmatikus reakciót is adott. A claudin-3, -8 és -10 IHK gyakran eredményezett apikális reakcióit a biliáris epithelben. A többi vizsgált claudin membranosus festődése jellemzően apikális és basolaterális volt.. A daganatokból származó minták hasonló festődési típust mutattak, de a claudin-8 és -10 immunreakció a tumorsejteken néhol a teljes membránon megjelent, valamint a claudin-10 esetében citoplazmatikus festődést is adott.

Az immunreakciók kiértékelése:

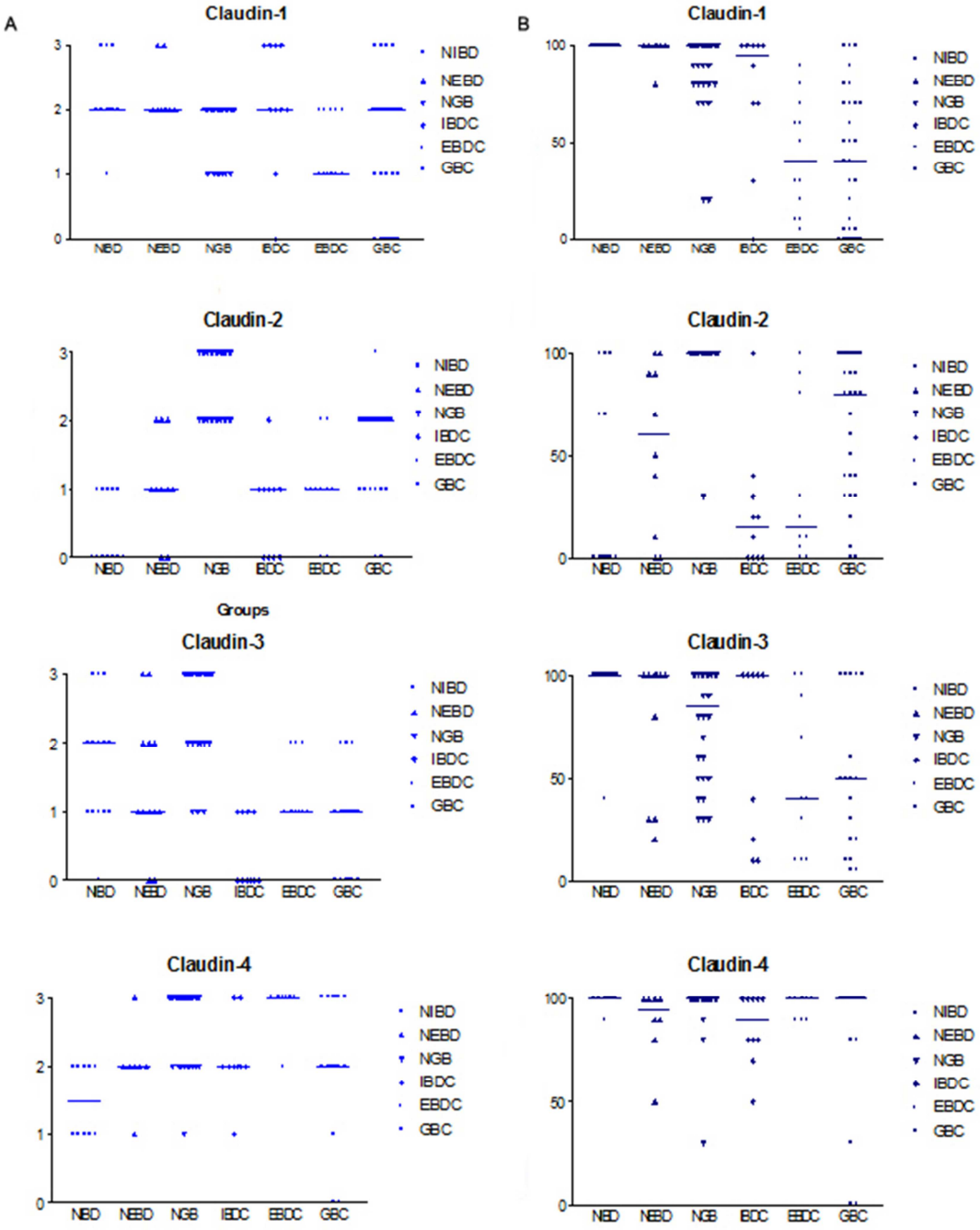
Az immunreakciókat két szempont szerint értékeltük: a reakció intenzitását négy fokozattal (negatív, gyenge, közepesen erős és erős reakció) jellemeztük, míg a reakció pozitivitását a vizsgált területen belül a pozitív sejtek százalékos értékében adtuk meg.



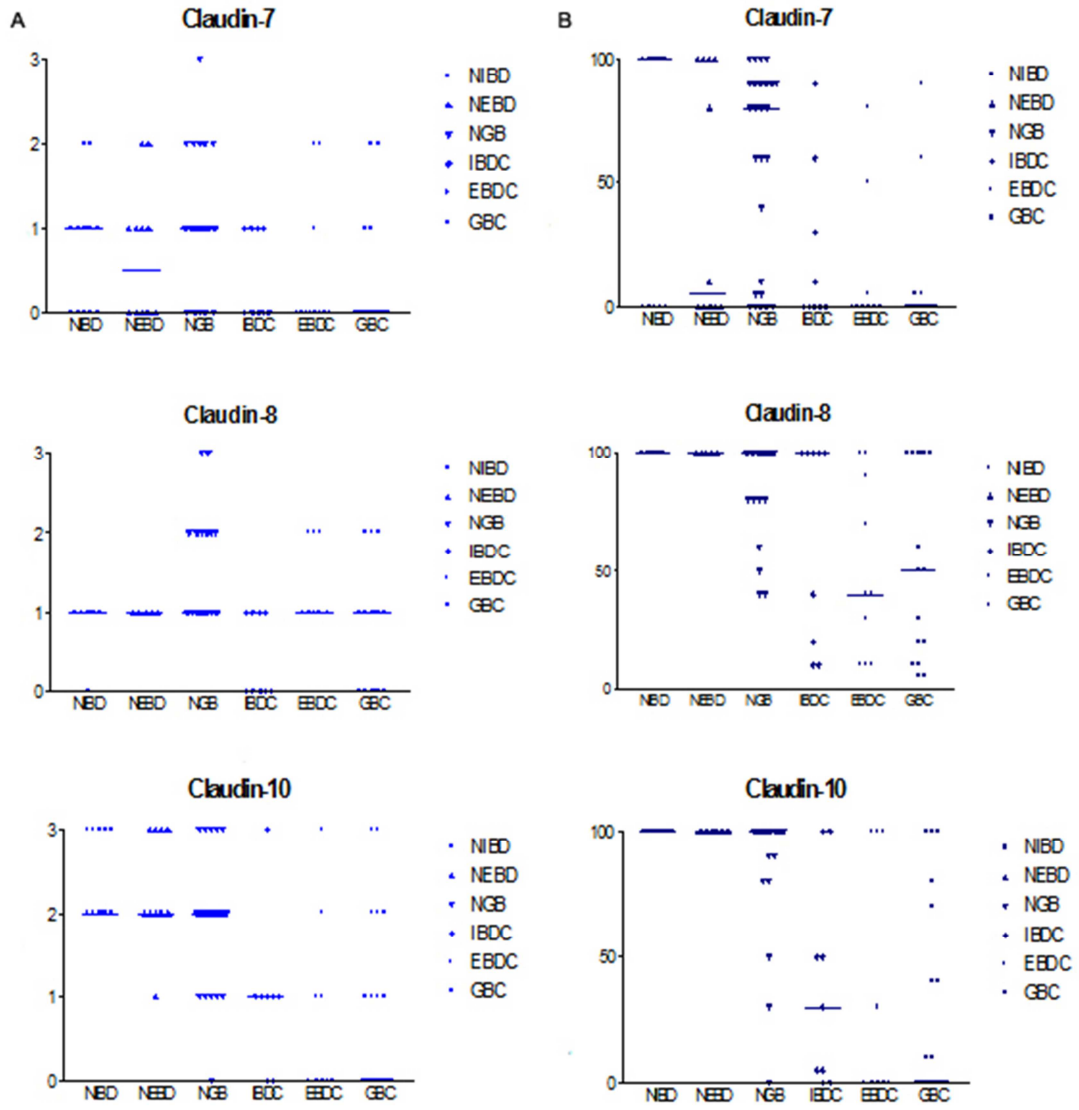
24. ábra Az immunhisztokémiai reakciók intenzitás és százalékos pozitivitás alapú kiértékelése. Normál-Tumor összehasonlítás (fent). Tumor csoportok összehasonlítása (lent). Int: intenzitás, Pos%: pozitivitás, *: 0,01<p<0,05, **: 0,001<p<0,01, ***: p<0,001, NIB : normál intrahepatikus epeút, NEBD: normál extrahepatikus epeúti tumor, NGB: normál epehólyag, IBDC: intrahepatikus epeúti tumor, EBDC: extrahepatikus epeúti tumor, GBC: epehólyag tumor.

A 24. ábra a szürke árnyalatok révén bemutatja a háromféle összehasonlítási szempontot: a normál epeút különböző részei egymással összehasonlítva; a normál biliáris epithelium versus a megfelelő lokalizációban levő epeúti daganatok valamint a a különböző lokalizációjú epeúti daganatok egymással összevetve. Látható, hogy a claudin-2, -3 és -4 expresszió a normál epeúti szövetek különböző lokalizációjában, a claudin-1, -2, -3, -4, -7, -8, -10 kifejeződés a normál versus daganatos szövetekben eltér, míg a különböző lokalizációjú tumoros csoportok a claudin-1, -2, -3, -4, -8, -10 expresszióban térnek el egymástól.

Az egyedi minták kiértékelését a 25. ábra és 26. ábra mutatja be. A claudin-1 normál biliáris hámban egységes intenzitást és pozitivitást mutat. Ez a tumoros mintákban jelentős szórást mutat. A claudin-4 fehérje immunhisztokémiai pozitivitása mutatja a legkisebb ingadozást.



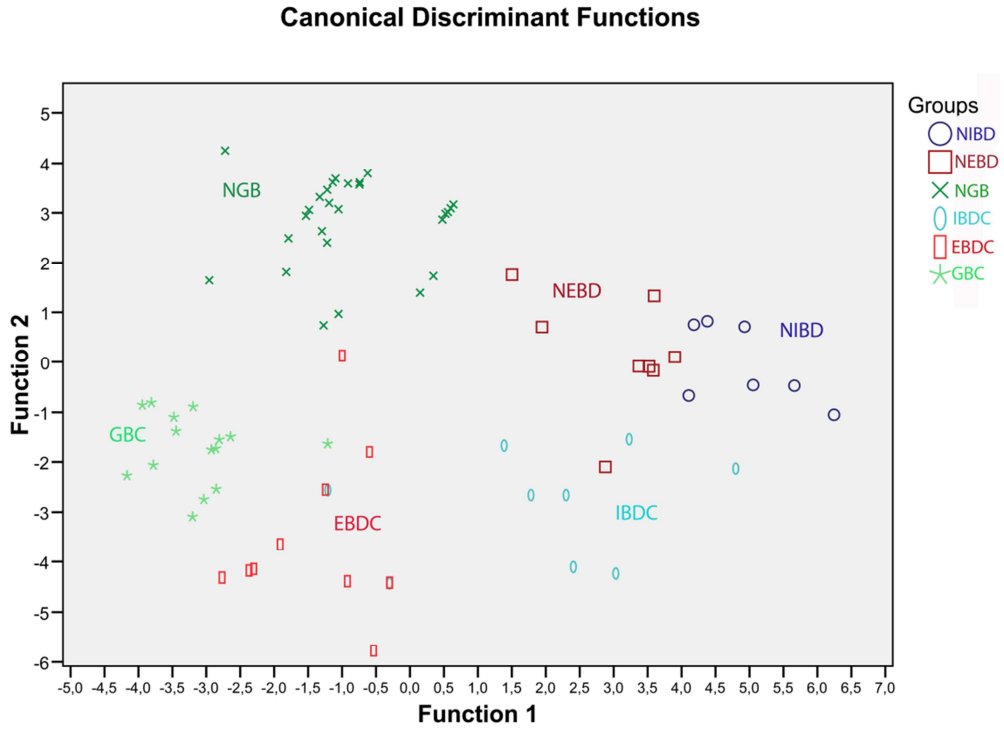
25. **ábra A claudin fehérjék immunhisztokémiai vizsgálatainak szemikvantitatív kiértékelése. Az A. panelen a függőleges tengely az intenzitási értékeket mutatja (0, 1, 2, 3). A B. panelen a függőleges tengely értékei a pozitív sejtek százalékos arányát mutatják (1-100%). NIBD/NEBD: normál intra/extrahepatikus epeúti hám; NGB: normál epehólyag hám; IBDC/EBDC: intra/extrahepatikus epeúti tumor; GBC: epehólyag tumor. NIBD/NEBD: normál intra/extrahepatikus epeúti hám; NGB: normál epehólyag hám; IBDC/EBDC: intra/extrahepatikus epeúti tumor; GBC: epehólyag tumor; median: vízsztintes vonal a pontok között.**



26. ábra A claudin fehérjék immunhisztokémiai vizsgálatainak szemikvantitatív kiértékelése. Az A. panelen a függőleges tengely az intenzitási értékeket mutatja (0, 1, 2, 3). A B. panelen a függőleges tengely értékei a pozitív sejtek százalékos arányát mutatják (1-100%). NIBD/NEBD: normál intra/extrahepatikus epeúti hám; NGB: normál epehólyag hám; IBDC/EBDC: intra/extrahepatikus epeúti tumor; GBC: epehólyag tumor. NIBD/NEBD: normál intra/extrahepatikus epeúti hám; NGB: normál epehólyag hám; IBDC/EBDC: intra/extrahepatikus epeúti tumor; GBC: epehólyag tumor; median: vízsztintes vonal a pontok között.

Összességében elmondható, hogy a vizsgált fehérjék expressziója az epeúti tumorokban jelentősen csökkent a normál biliáris hámhoz képest, kivéve a claudin-4 fehérje termelődést, mely az extrahepatikus epeúti tumorokban kifejezetten emelkedett expressziót mutat a normál hámhoz képest.

A diszkriminancia analízis során a claudin-1, -2, -3, -4, -7, -8 és -10 immunreakciók összes intenzitási és pozitivitási adatait elemzi, melyet grafikusan a 27. ábra mutat be. A normál és tumoros epeúti hám különböző lokalizációjú csoportjait különböző színek jelölik. Egy-egy pont azonos intenzitású/százalékos pozitivitású mintát vagy mintákat jelöl. A több dimenziós matematikai modellból az intentitási és pozitivitási tulajdonságok tengelyei által határolt sík került ábrázolásra (27. ábra). A claudinok expressziója a csoportokra specifikus, a térmodellben elkülöníti őket.

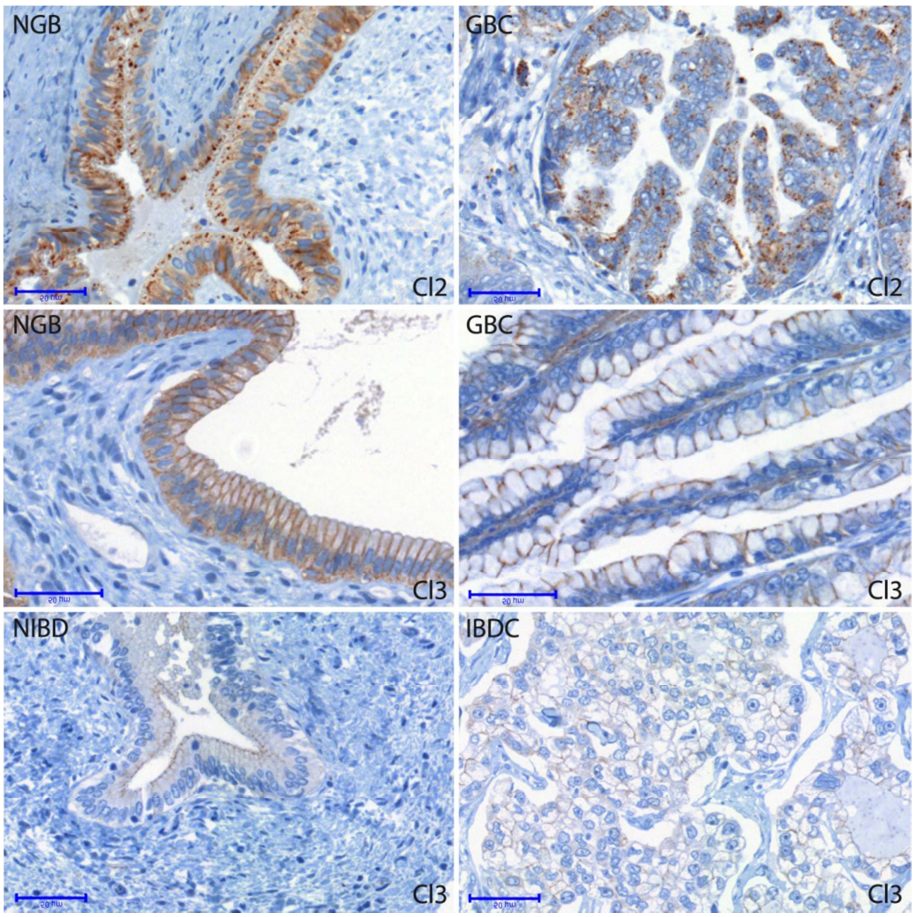


27. ábra A diszkriminancia analízis grafikus ábrázolása. A vizsgált csoportok: NIBD, NEBD, NGB, IBDC, BDC, GBC jól elkülöníthetőek egymástól a claudin-1, -2, -3, -4, -7, -8 és -10 immunreakciók intenzitási és pozitivitási adatai alapján. NIBD: normál intrahepatikus epeúti hám; NEBD: normál extrahepatikus epeúti hám; NGB: normál epehólyag hám; IBDC: intrahepatikus epeúti tumor; EBDC: extrahepatikus epeúti tumor; GBC: epehólyag tumor.

A carcinoma minták és a lokalizációnak megfelelő normál szövet összehasonlítása

A legtöbb normál minta a tumorokhoz képest erősebb (intenzívebb és/vagy a sejtek nagyobb százalékában) claudin expressziót mutatott. A 28. ábra és 29. ábra a claudin-2, -3 és -10 fehérjék esetében szemlélteti ezt a jelenséget. A claudin-3, -7, -8 és -10 az IBDC-ben, a claudin-1, -8 és -10 az EBDC-ben, valamint claudin-1, -2, -3, -7, -8, és -10 a GBC-ben csökkent jelentősen a normál biliáris hámhoz képest.

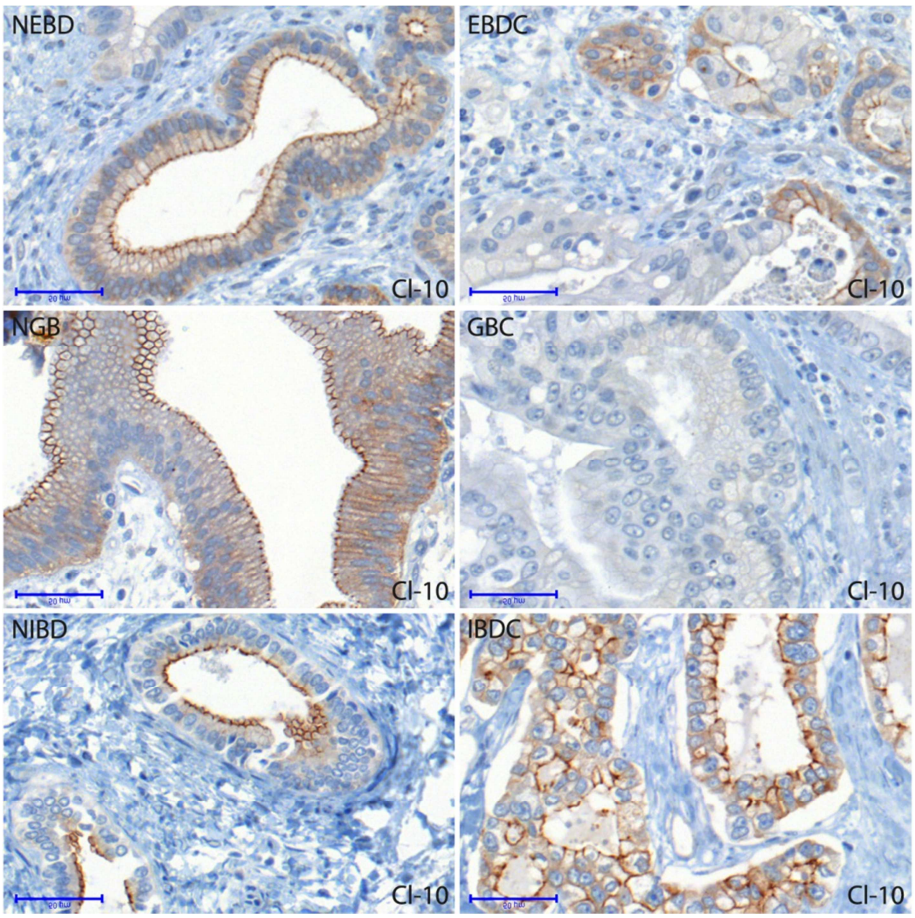
dc_1040_15



28. ábra A claudin-2 és -3 immunreakció a NGB, GBC, NIBD és IBDC csoportokban. A claudin-2 a normál epehólyag hámban expresszálódott a legintenzívebben, és szignifikánsan lecsökkent expressziója a GBC-ben a NGB-hez képest. A claudin-3 erős festődést mutatott a normál epehólyag hámban, míg gyenge reakció volt észlelhető a normál intrahepatikus epeutakban. A claudin-3 reakció szignifikáns csökkenést mutatott az epehólyag carcinomában és az intrahepatikus epeúti carcinomákban a hasonló lokalizációban levő normál biliáris epithelhez viszonítva. NIBD: normál intrahepatikus epeúti hám; NGB: normál epehólyag hám; IBDC: intrahepatikus epeúti tumor; GBC: epehólyag tumor. Mértékjelzés: 50 µm.

Az epehólyag carcinomában a claudin-4 kivételével az összes többi vizsgált claudin csökkent festődést mutatott a normál epehólyaghámhoz képest. A claudin-4 expressziója ezzel ellentétben nem csökkent az általunk kiválasztott epeúti tumor csoportokban, sőt, erőteljesebb kifejeződést találtunk az EBDC-ben a NEBD-hez képest. A tumorokban a claudin-8 és -10 expresszió lokalizációja is megváltozott, a normál hámsejtek apikális expressziójához képest e fehérjék számos esetben a tumorsejtek teljes felszínén expresszálódtak. A citokeratin-7 immunreakció, mint nemzetközileg elfogadott epeúti hám marker, a legtöbb claudinhoz hasonlóan szintén csökkenést mutatott a daganatos szöveti mintákban, mely csökkenés a magasabb grade-ű, rosszabbul differenciált területeken nagyobb volt.

dc_1040_15



29. ábra Claudin-10 immunreakció a NEBD, NGB, NIBD, EBDC, GBC és IBDC csoportokban. Claudin-10 szignifikáns csökkenést mutatott a carcinomákban a normál hámhoz képest. Az IBDC csoportban az EBDC és a GBC csoportokhoz képest erősebb expressziót detektáltunk. NIBD: normál intrahepatikus epeúti hám; NEBD: normál extrahepatikus epeúti hám; NGB: normál epehólyag hám; IBDC: intrahepatikus epeúti tumor; EBDC: extrahepatikus epeúti tumor; GBC: epehólyag tumor. Méretjelölés: 50 µm.

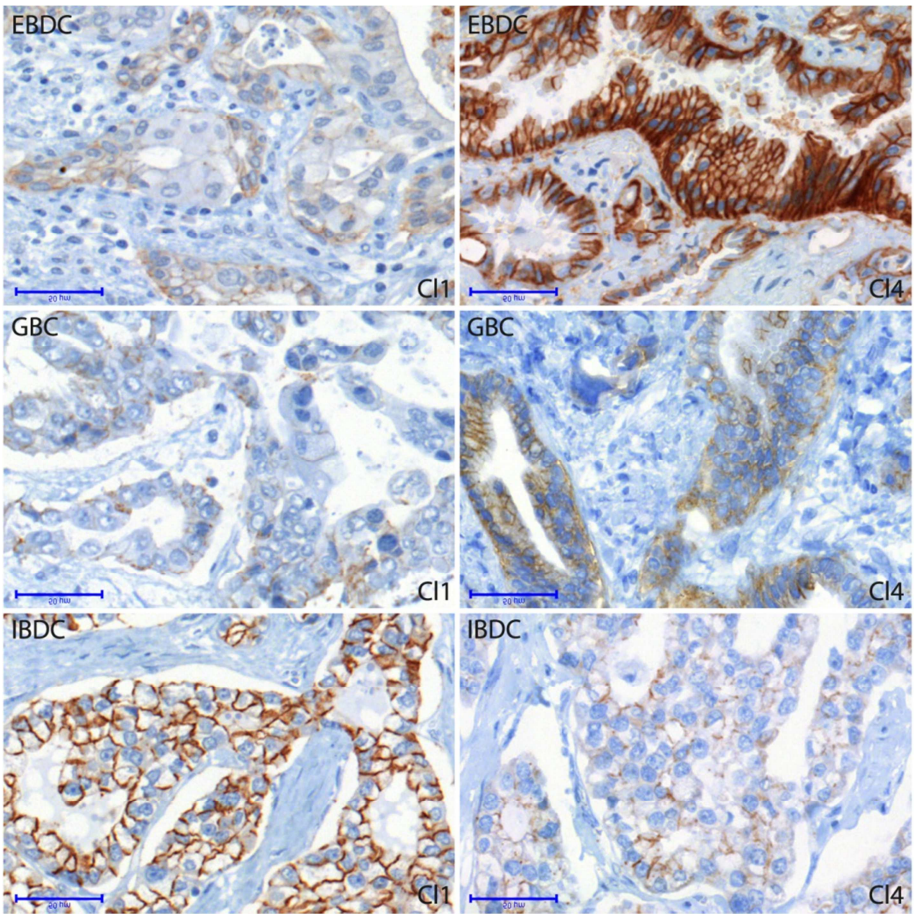
Az epeúti tumorok csoportjai általában alacsony claudin-3, -7, -8 és -10 festődést mutattak, míg a claudin-1, -2 és -4 immunreakciók erősek voltak. A claudin-7 fehérje esetében a mért fehérje expressziók nem különböztek jelentősen a tumor csoportokban.

Ezen eltéréseket a 30. ábra mutatja be: erős claudin-1 festődés látható IBDC-ben az EBDC-hez és GBC-hez képest. A tumorsejtek szignifikánsan nagyobb százaléka expresszálja a claudin-1 fehérjét IBDC-ben. Emellett szignifikánsan erősebb claudin-4 expressziót láttunk EBDC-ben, szemben az IBDC-vel és GBC-vel. A claudin-2 fehérje a tumorok közül a GBC-ben expresszálódik a legerősebben.

A claudinok mRNS expressziójának meghatározása a normál biliáris epithel különböző szakaszain és ezen szakaszok epeúti tumoraiban

Mivel normál epeúti fagyasztott minták nem álltak kellő számban rendelkezésre, így a carcinomák mRNS expresszióját a tumormentes daganatot környező májszövettel végeztünk összehasonlításokat. Az mRNS expressziós vizsgálatok egyik összehasonlításban sem mutattak szignifikáns különbséget a vizsgált csoportok között.

dc_1040_15



30. ábra A claudin-1 és -4 immunreakció az EBDC, GBC és IBDC csoportokban. A claudin-1 immunreakció nem szignifikánsan, de intenzívebb volt IBDC-ben az EBDC-hez és GBC-hez képest. A claudin-4 expresszió az EBDC-ben volt a legerőteljesebb, és ehhez képest az IBDC és GBC csoportokban szignifikánsan csökkent festődést detektáltunk. IBDC: intrahepatikus epeúti tumor; EBDC: extrahepatikus epeúti tumor; GBC: epehólyag tumor. Méretjelölés: 50 µm.

A claudinok lehetséges differenciál diagnosztikai szerepe az epeúti rendszer különböző lokalizációjú tumorai esetében esetében

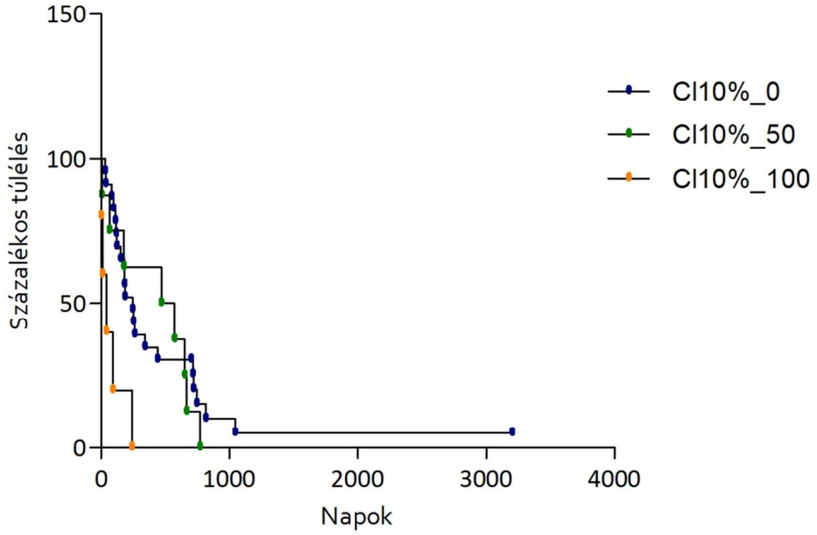
A különböző loklizációjú biliáris neopláziákat a következő jellegzetességek különítik el: az epehólyag carcinomát a cholangiocarcinomáktól a claudin-2 IHK reakció intenzitása és pozitivitása alapján lehet elkülöníteni. Közepes, vagy erős claudin-2 festődés a sejtek több, mint 25%-ában versus gyenge, vagy negatív claudin-2 IHK reakció a sejtek kevesebb, mint 25%-ában, 85%-os specificitással és 72%-os érzékenységgel különíti el a GBC-t az IBDC+EBDC tumoroktól (Fisher-egzakt próba, p=0,0003).

Az erős claudin-4 expressziót mutató EBDC esetek 91%-os szenzitivitás és 80%-os specificitás mellett elkülöníthetők a közepes, gyenge, ill. negatív IHK festődést adó IBDC tumoroktól (Fisher exact test, p=0,02).

A claudin-3 negatív ductalis pancreas carcinomákkal szemben az EBDC tumorok mindegyike, az IBDC minták mintegy fele, míg a GBC esetek több, mint 60%-a claudin-3 pozitív immunreakciót ad.

Az alacsony claudin-10 immunreakciót mutató tumorok esetén szignifikánsan ($p< 0,01$) hosszabb túlélési idő mutatkozott a claudin-10-t magasan expresszáló tumorok betegeihez képest. (31. ábra).

A claudin-1 és claudin-4 esetén a fehérjék tumorbeli termelődése nem asszociálódott a túléléssel. Az mRNS expresszió a kis esetszám miatt nem volt alkalmas statisztikai analízisre.

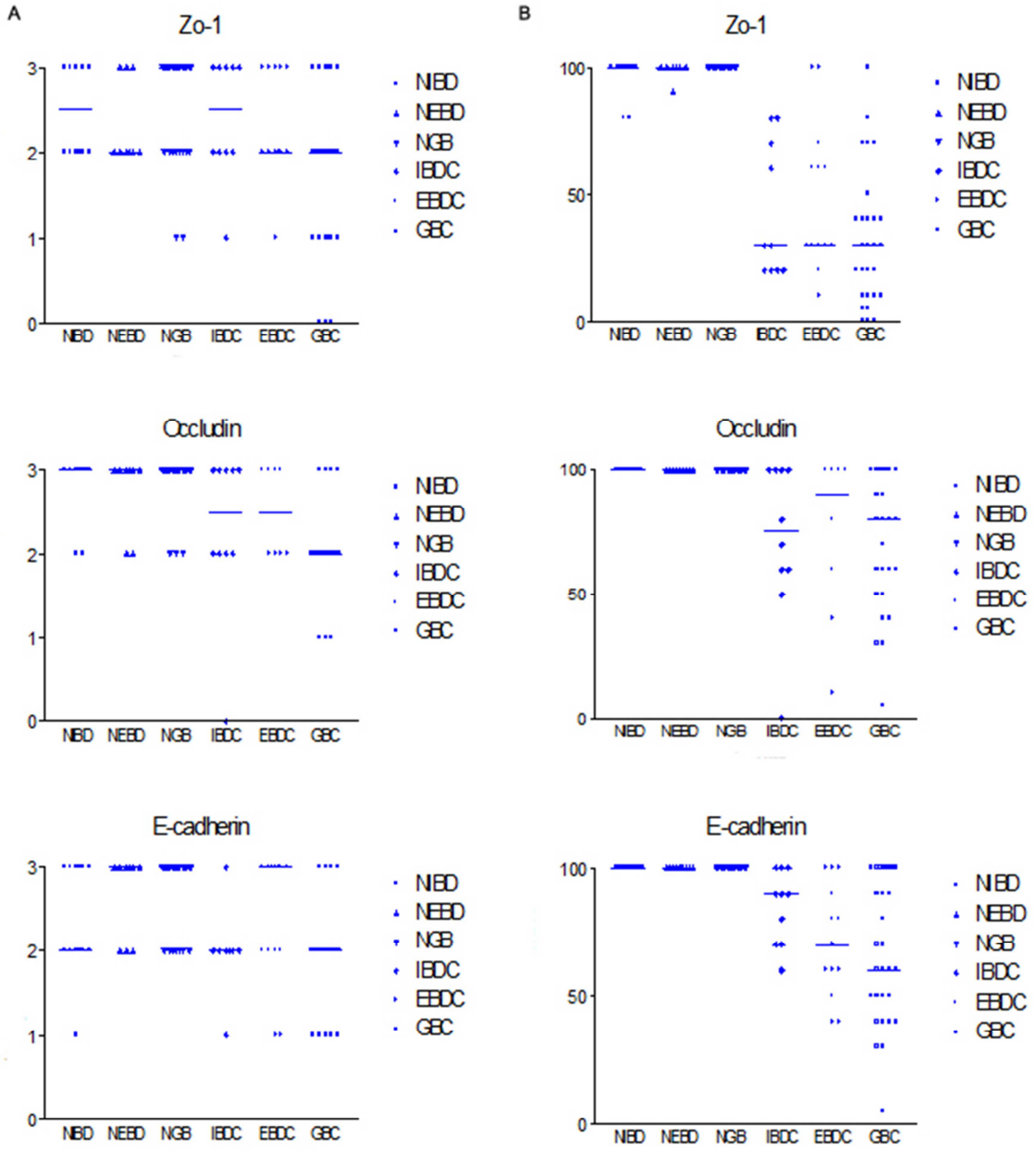


31. ábra A claudin-10 fehérjeexpresszió mértékének öszefüggése a betegek túlélésével. A 40. ábra az alacsonyabb százalékos pozitivitást mutató daganatok betegeinél mutat hosszabb túlélési időt. Cl l0%_0: negatív immunreakciót adó mintacsoport; Cl 10%_50: 1-50% pozitivitást mutató mintacsoport; Cl10%_100: 51-100% pozitivitást mutató tumorok

IV.1.2.2. A ZO-1, occludin és E-cadherin fehérjék és citokeratin-7 expressziójának immunhisztokémiai vizsgálata az epeút rendszer különböző szakaszainak normál biliáris epitheljében és ezen szakaszok epeúti daganataiban

A normál biliáris epithel minták szinte mindegyike kifejezte mindhárom sejtkapcsoló fehérjét a sejtmembránon, míg a CK-7 citoplazmatikus festődést adott. A ZO-1 és az occludin IHK reakció a sejtek apikális részén membránpozitivitást adott. Az E-cadherin festés általában membrán pozitivitást mutatott, de egyes esetekben citoplazmatikus jelet is kaptunk. A jól differenciált biliáris tumorokban az acináris struktúrákban apikális membrán jelölést láttunk, azonban a rosszul differenciált grade 3-as daganatokban a ZO-1 és occludin fehérjék diffúz, perimembranosus lokalizációját tapasztaltuk. A közepesen és rosszul differenciált tumorok egy részében (IBDC, EBDC, GBC) a citokeratin-7 expresszió csökkenését észleltük.

A ZO-1, occludin, E-cadherin fehérjék immunhisztokémiai reakcióiban az epeúti rendszer különböző szakaszainak normál és tumoros hámja között szignifikáns különbség mutatkozott (32. ábra, 33. ábra). A normál és tumoros mintacsoportok között nem találtunk jelentős expresszióbeli különbséget. Az immunreakciók intenzitása és pozitivitása szignifikáns korrelációt mutatott. A szemikvantitatív analízis adatainak páronkénti (normál versus daganat; tumorcsoportok összevetése egymással) összehasonlításakor kapott statisztikai analízis eredménye a 11. táblázatban látható.



32. ábra A ZO-1, occludin és E-cadherin fehérjék immunhisztokémiai vizsgálatain alapuló szemikvantitatív kiértékelés eredménye. Az A. panelen a függőleges tengely értékei az intenzitási értékeket mutatják (0, 1, 2, 3). A B. Panelen a függőleges tengely értékei a pozitív sejtek százalékos arányát mutatják (1-100%). NIBD/NEBD: normál intra/extrahepatikus epeúti hám; NGB: normál epehólyaghám; IBDC/EBDC: intra/extrahepatikus epeúti tumor; GBC: epehólyag tumor. NIBD/NEBD: normál intra/extrahepatikus epeúti hám; NGB: normál epehólyag hám; IBDC/EBDC: intra/extrahepatikus epeúti tumor; GBC: epehólyag tumor. A median jelölése:: vízszintes vonal a pontok között/pontokon.

11. táblázat A statisztikai analízis eredményei. A táblázat a vizsgált csoportok páronkénti összehasonlításainak eredményeit szemlélteti, és mutatja a két vizsgálati szempont közötti korrelációt. ns: nem szignifikáns; %: pozitivitási százalék; int: intenzitás; Occl.: occludin, E-cadh.: E-cadherin.

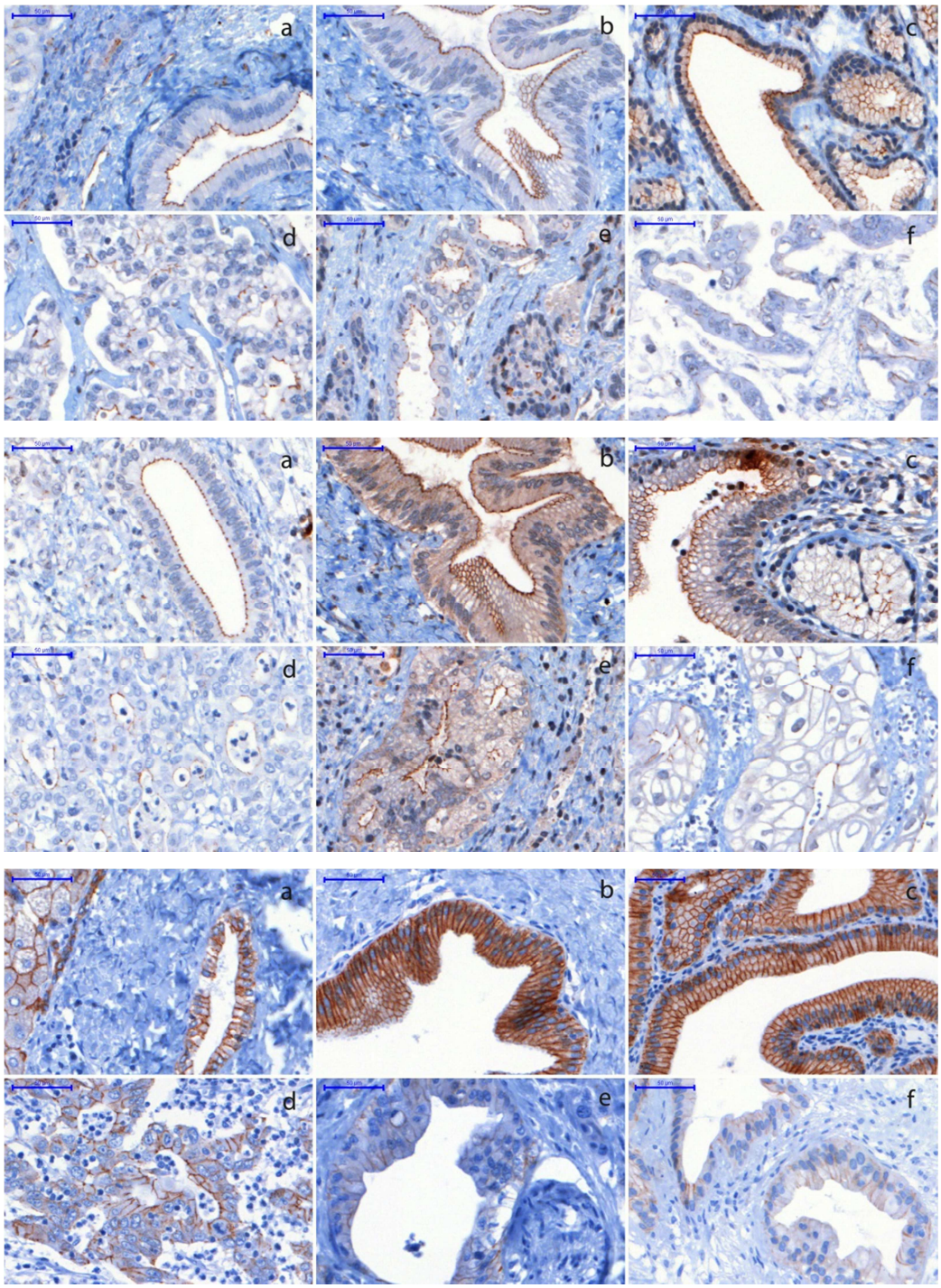
	Változó	NIBD-IBDC	NEBD-EBDC	NGB-GBC	IBDC-EBDC	IBDC-GBC	EBDC-GBC	korrelációs koefficiens (p érték)
ZO-1	int	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.379 (<0.001)
	%	<0.001	0.001	<0.001	ns	ns	ns	
Occl.	int	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.566 (<0.001)
	%	0.008	0.02	<0.001	ns	ns	ns	
E-cadh.	int	ns	ns	<0.001	ns	ns	ns	0.496 (<0.001)
	%	<0.001	0.001	<0.001	ns	ns	ns	

A tumorok sejtjei mindhárom vizsgált fehérjét szignifikánsan alacsonyabb százalékban expresszálták a megfelelő lokalizációjú normál biliáris hámhoz képest. A legnagyobb festődési különbséget a ZO-1 fehérje mutatta.

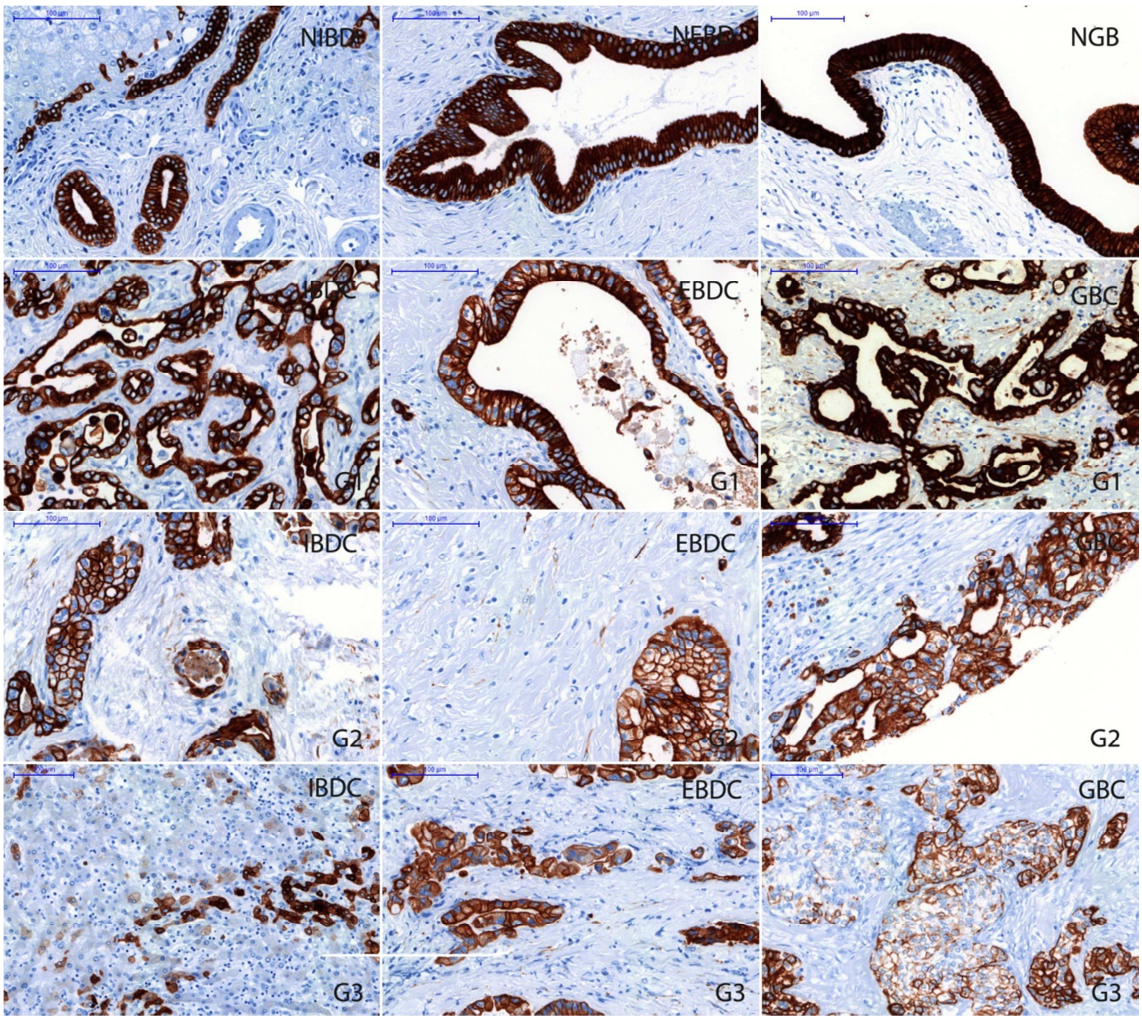
A citokeratin-7 epeúti marker erős citoplazmatikus kifejeződését figyeltük meg a normál mintákban, míg a közepesen és rosszul differenciált tumorok (IBDC, EBDC, GBC) egyes eseteiben a citokeratin-7 expresszió csökkenését észleltük (34. ábra).

Összességében a normál mintákban a vizsgált fehérjék közepes és erős reakciót adtak, míg a carcinomákban csökkent intenzitást kaptunk, azonban fehérjénként eltérő mértékben. A tumorokban a pozitív sejtek száma mind a három sejtkapcsoló fehérje esetében jelentős csökkenést mutatott, legkifejezettebben a ZO-1 fehérje esetében.

dc_1040_15



33. ábra ZO-1 (felső panel), occludin (középső panel) és E-cadherin (alsó panel) immunreakciók az NIBD, NEBD, NGB, IBDC, EBDC, GBC csoportokban. A képek a-c: a normál epeúti hámot, d-f: carcinomákat, a és d: intrahepatikus epeutat, b és e: extrahepatikus epeutat, c és f: epehólyag mintát jelölik. NIBD: normál intrahepatikus epeúti hám; NEBD: normál extrahepatikus epeúti hám; NGB: normál epehólyag hám; IBDC: intrahepatikus epeúti tumor; EBDC: extrahepatikus epeúti tumor; GBC: epehólyag tumor. Méretjelölés: 50 µm.

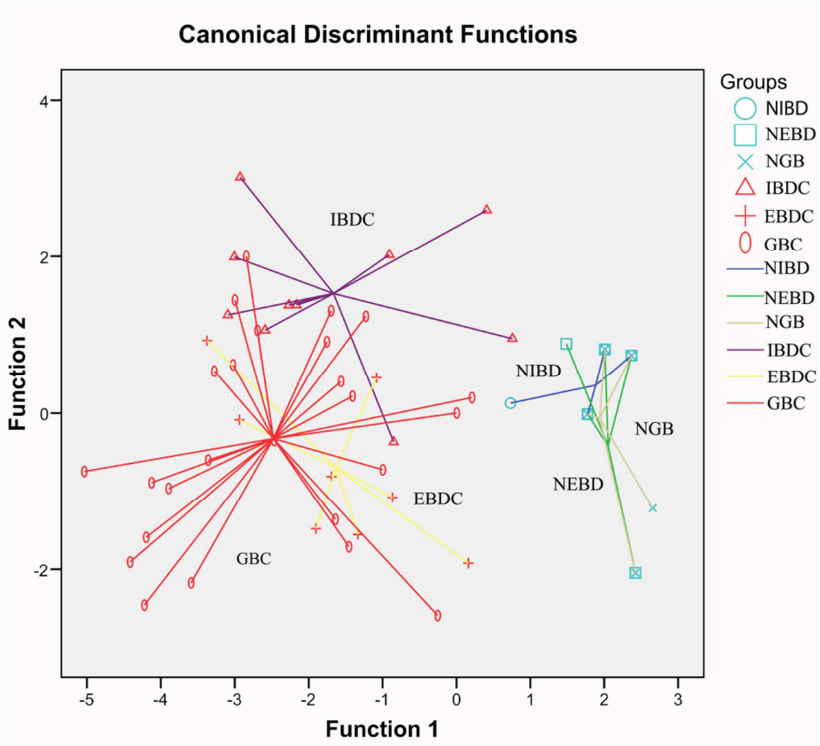


34. ábra A citokeratin-7 immunhisztokémiai reakció normál és daganatos biliáris hámban. Az első sor a normál biliáris hámot, a 2-4 sorok a G1-G2-G3 grádusú tumorokat mutatják a lokalizációnak megfelelő oszlopban. A CK-7 markernek a növekvő grade-del párhuzamos csökkenése az epehólyagból nyert mintáknál egyértelmű. NIBD: normál intrahepatikus epeút, NEBD: normál extrahepatikus epeút, NGB: normál epehólyag, IBDC: intrahepatikus epeúti tumor, EBDC: extrahepatikus epeúti tumor, GBC: epehólyag tumor, G1: grade 1, G2: grade 2, G3: grade 3.

A ZO-1, occludin és E-cadherin fehérje expressziós mintázat differenciál diagnosztikai szerepe

A daganatos mintacsoportok és a normál mintacsoportokat egymástól történő elkülönítését sem diszkriminancia analízissel (35. ábra), sem statisztikai értékeléssel nem lehetett megoldani. A diszkriminancia analízis normál és daganatos mintahalmazt szemléltet és arra utal, hogy e három fehérje kifejeződése a tumor csoportokra nem specifikus módon változik a daganatos átalakulás folyamán. Ezen fehérjék daganatokban észlelt csökkent expressziója a dedifferenciációs átalakulás eredménye lehet, illetve utalhat ezen fehérjék részvételére a folyamatban.

dc_1040_15

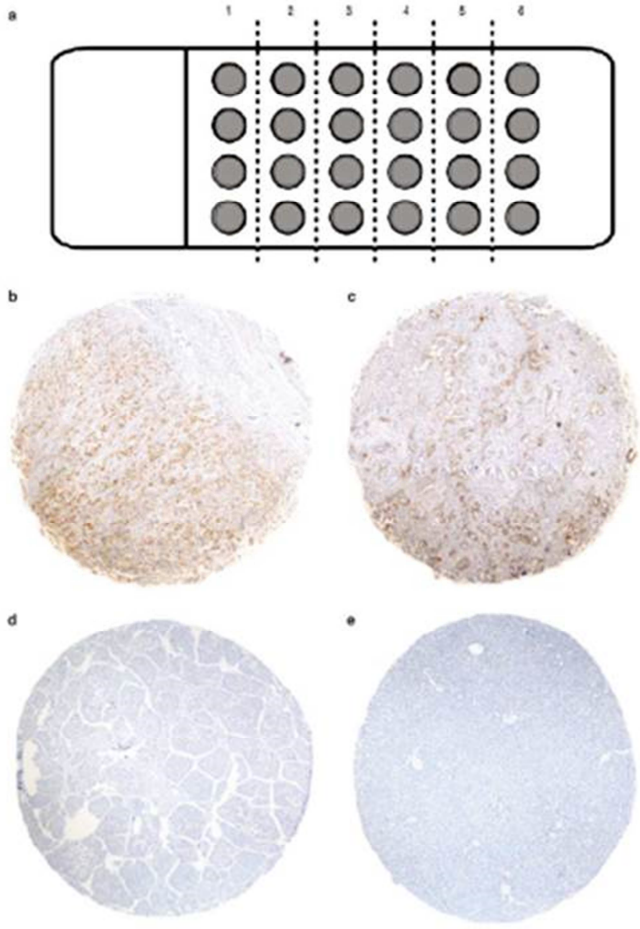


35. ábra ZO-1, occludin, E-cadherin diszkriminancia analízisének bemutatása. NIBD: normál intrahepatikus epeút, NEBD: normál extrahepatikus epeút, NGB: normál epehólyag, IBDC: intrahepatikus epeúti carcinoma, EBDC: extrahepatikus epeúti carcinoma, GBC: epehólyag carcinoma. A színes vonalak a csoportok „térbeni" átlagát, a csoport centrumát mutatják.

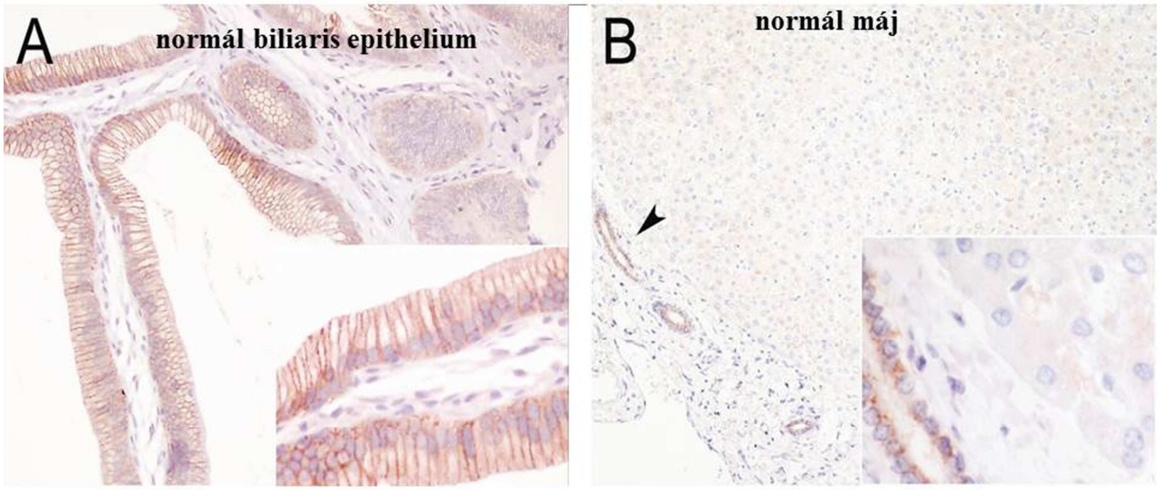
IV.1.3. A claudin-4 expresszió összehasonlító vizsgálata és differenciáldiagnosztikai értéke a máj primer malignus daganataiban

A fehérje expresszió immunhisztokémiai detektálását szöveti microarray-n végeztük. A következő mintacsoportokat vizsgáltuk: normál máj; hepatocelluláris carcinoma; epehólyag tumor; közös epevezeték daganata; ductus hepaticus carcinoma; intrahepatikus, perifériás epeúti daganat; epehólyag tumor (36. ábra).

Immunhisztokémiai vizsgálattal a normál epeúti hámban a claudin-4 fehérje alacsony/mérsékelt fokú expressziója volt kimutatható. Mind az intrahepatikus epeutakban, mind pedig a nagy extrahepatikus epeutakban membránfestődést tapasztaltunk (37. ábra A). Az intraacináris portális kis epeutakban a nagyobb epeutakhoz képest gyengébb membranózus reakciót detektáltunk (36. ábra b). A normál máj hepatocytái a claudin-4 immunreakcióra negatívak voltak. (37. ábra B).



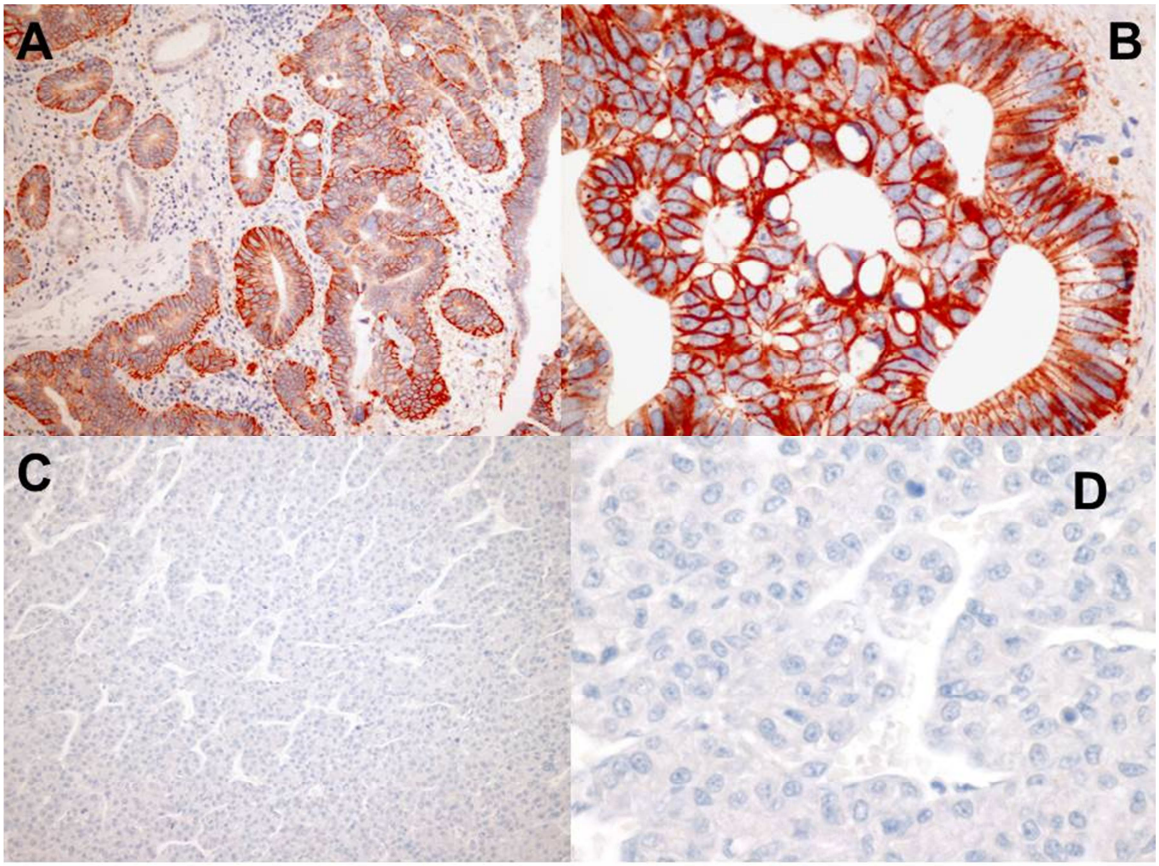
36. ábra A claudin-4 immnhisztokémiai vizsgálata szöveti microarray-n (a) A minták szöveti microarray-n belüli lokalizációjának sémás ábrázolása: (1) normál máj (2) hepatocelluláris carcinoma, (3) epehólyag tumor, (4) közös epevezeték daganata (5) ductus hepaticus carcinoma, (6) intrahepatikus, perifériás epeúti daganat (b) epehólyag tumor (c) közös epevezeték tumora (d) hepatocelluláris carcinoma. (e) normál máj Nagyítás: 28X .



37. ábra (A) A nagy extrahepatikus epeút normál biliáris hámjában a claudin-4 IHC membrán festődést ad. (B) Claudin-4 IHC reakció normál májszövetben. A kis epeutak (nyíl) gyenge pozitivitást mutatnak. Az inzert a kis epeút claudin-4 pozitivitását és a hepatocyták negativitását mutatja.

A vizsgált 53 biliáris carcinoma közül 37 jól, vagy közepesen differenciált adenocarcinoma volt (Grade I–II), míg 16 rosszul differenciált volt (Grade III). A hepatocelluláris carcinomákat jól

differenciált, közepesen differenciált, vagy rosszul differenciált csoportokba osztottuk. Az immunohisztokémiai vizsgálat eredményét az 1. táblázatban foglaltuk össze. Mind az 53 biliáris carcinoma pozitív immunhisztokémiai reakciót adott a claudin-4 elleni antitesttel, a tumorok sejtjei 100 %-ban membránpozitívitást mutattak. A claudin-4 expresszió mértékében nem volt jelentős különbség a biliáris carcinomák kialakulási helyének különböző anatómiai lokalizációja szerint, jelesül, hogy intrahepatikus, extrahepatikus, vagy epehólyag eredetűek voltak. A differenciáció mértéke sem befolyásolta szignifikánsan a claudin-4 IHC reakciót, mind a rosszul, mind pedig a jól differenciált carcinomák kifejezett festődést adtak a claudin-4 elleni antitesttel (38. ábra A., B.). A reakció membránpozitivitást adott, kifejezett „lépesméz" mintázattal (38. ábra A., B.). Ezzel ellentétben a hepatocellularis carcinoma minták egyike sem mutatott claudin-4 festődést (38. ábra C. és D.).



38. ábra : Intenzív claudin-4 membránfestődés a közös epevezeték carcinomájában: (A.) nagyítás: 150 X; (B.): nagyítás: 400 X. A hepatocelluláris carcinoma nem mutat claudin-4 fehérje expressziót IHC vizsgálattal: (C.) nagyítás: 150 X; (D.): nagyítás: 400 X

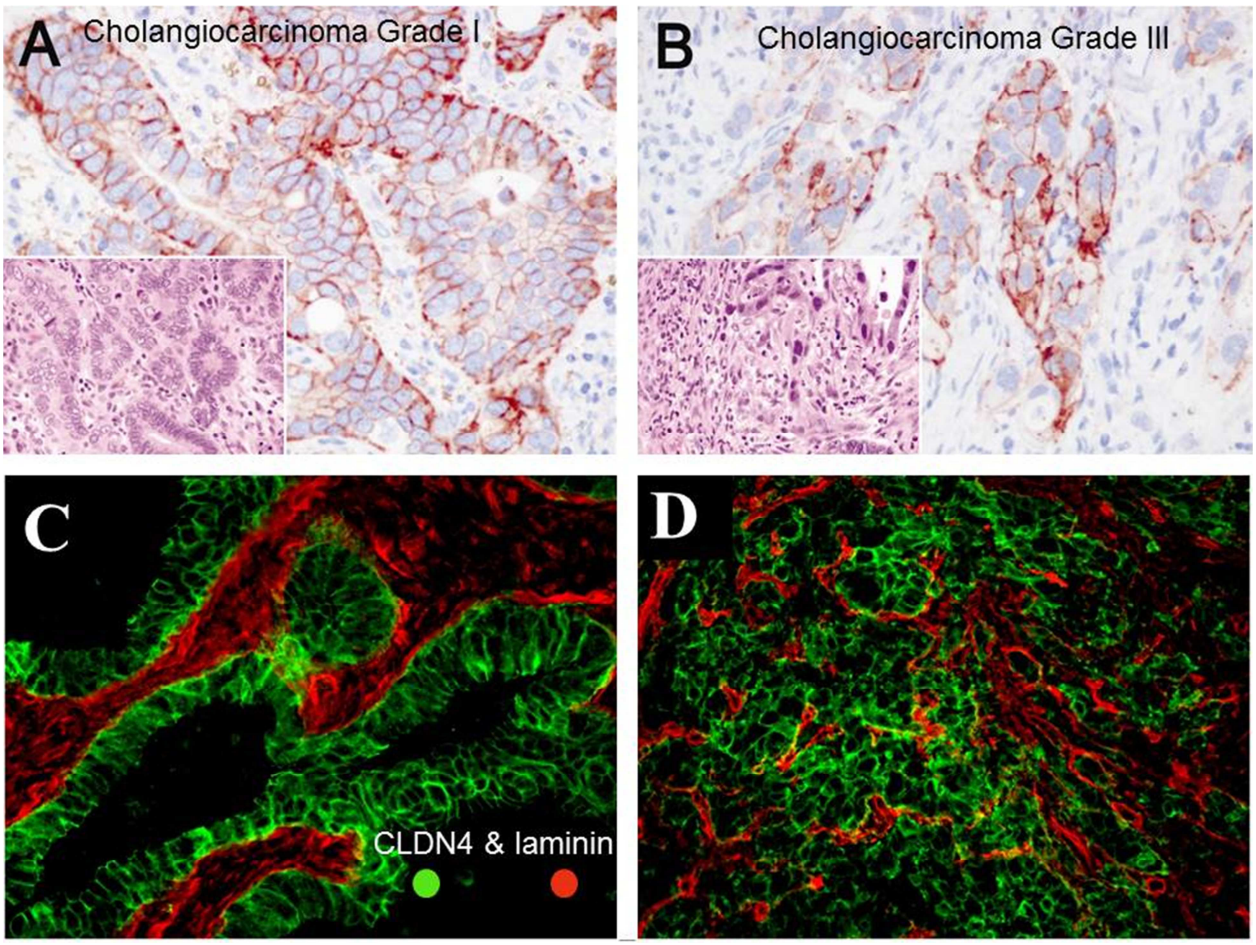
A normál epeutak mindegyike CK-7 és CK-19 pozitív volt, az anatómiai elhelyezkedéstől függetlenül. A citokeratin-7 expresszió csaknem mindegyik epeúti carcinomában, a vizsgált tumorok 92%-ában jelen volt (49/53): 22 (96%) epehólyag tumor, 13 (100%) közös epevezeték tumor, 9 (90%) ductus hepaticus carcinoma és öt (71%) intrahepatikus (perifériás) epevezeték tumor bizonyult pozitívnak. A vizsgált 50 hepatocelluláris carcinoma eset közül 17 (34%) mutatott fokális CK-7 pozitivitást (12. táblázat).

Az epeúti tumorok többsége (83%) CK-19 pozitivitást mutatott: 20 (87%) epehólyag carcinoma, 11 (85%) közös epevezeték tumor, 8 (80%) ductus hepaticus carcinoma és 5 (71%) intrahepatikus epeúti carcinoma. A HCC nem mutattak CK19 festődést (12. táblázat).

A CK20 expresszió 14/53 epeúti tumorban (26%) volt kimutatható: 7 (30%) epehólyag tumor, 4 (31%) közös epevezeték tumor, három (30%) ductus hepaticus carcinoma bizonyult pozitívnak, míg egyik intrahepatikus (perifériás) epevezeték tumor sem mutatott festődést. Ezzel ellentétben a CK-20 expresszió csak két (4%) HCC esetben volt kimutatható (12. táblázat). A CK20 festődés sem a normál extrahepatikus, sem pedig a normál intrahepatikus epeutakban nem volt kimutatható. A HSA pozitivitás a hepatocelluláirs carcinoma esetek többségét (43/ 50, 86%) jellemezte, bár az epeúti carcinomák egy kis része (4/53, 8%) szintén mutatott pozitivitást, ezen esetek között két epehólyag carcinoma (9%) és két (15%) közös epevezeték carcinoma is szerepelt, fokális HSA pozitivitással (12. táblázat). Az epeúti carcinomák esetében a vizsgált immunhisztokémiai reakciók szenzitivitása és specificitása a következőképpen alakult: 100 % specificitás és 100 % szenzitivitás a claudin-4 esetében, 92% és 66% a CK-7-re, 83% és 100% a CK-19-re, 26 és 96% a CK-20 esetében, míg 8% és 14% a HSA-ra.

A claudin-4 és laminin kettős immunfluorescens detektálása

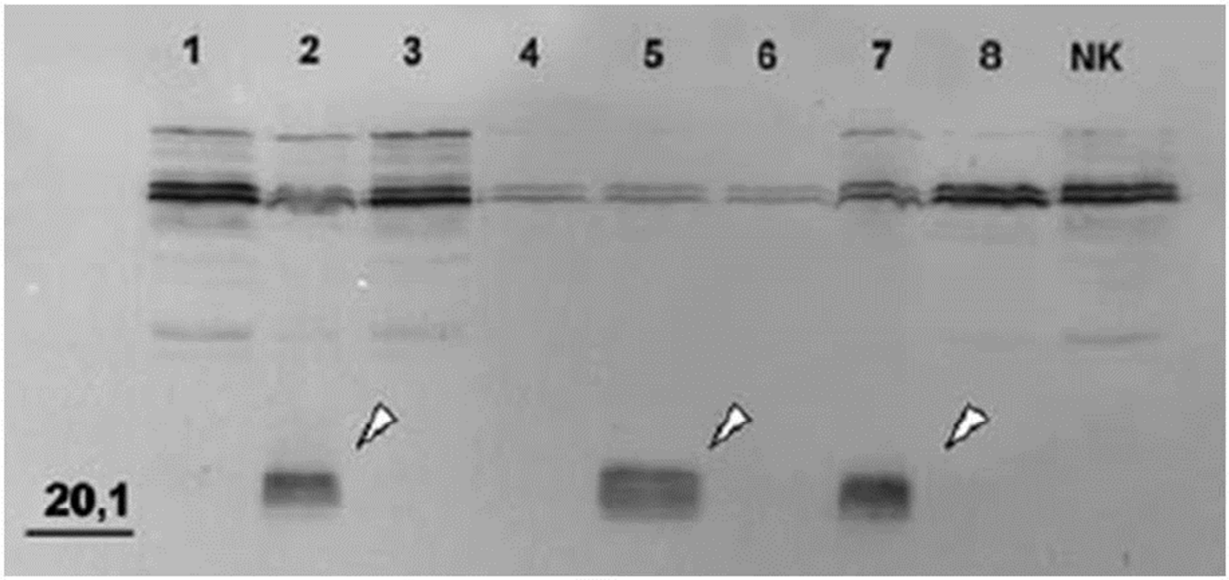
A claudin-4 strukturális elhelyezkedésének alaposabb feltérképezése céljából kettős immunfluorescens viszgálatokat végeztünk lamininnel. A claudin-4-t zöld színnel, míg a basális membrán komponens laminint vörös színnnel jelöltük és konfokális mikroszkóppal analizáltuk a festődést. A claudin-4 elleni antitest az összes vizsgált esetben erős membránreakciót adott az epeúti tumorsejteken (39. ábra C és D). A jól differenciált epeúti tumorok körkörös membránfestődést adtak, míg a kevésbé differenciált, magasabb grade-del rendelkező tumorokban töredezett, vagy hiányzó membrán-pozitivitás jellemezte a daganatokat (39. ábra C és D). Egyik vizsgált hepatocelluláris carcinoma esetében sem találtunk claudin-4 pozitivitást.



39. ábra A jól differenciált (A) és a rosszul differenciált (B) biliáris carcinomában egyaránt erős, membranózus claudin-4 festődést detektáltunk. A képbetétek a hematoxilin-eosin festett tumorok reprezentatív területeit mutatják (C), (D): Konfokális lézer mikroszkópiával detektált claudin-4 (zöld) és laminin (vörös) kettős fluoreszcens immunhisztokémiai reakció fagyasztott metszeten. (C): Erős claudin-4 reakció egy magasan differenciált (low grade) epeúti carcinoma mirigyes struktúráiban. A laminin festődés jól mutatja a glanduláris szerkezet határait. D) Egy szolid növekedési mintázatú, alacsonyan differenciált (high grade) biliáris tumor hámsejtjei a low-grade carcinomához hasonlóan erős claudin-4 festődést mutattak. Képbetétek nagyítása: 280X; (A), (B), (C) és (D): 400X.

A claudin-4 fehérje expresszió (~22 kDa) detektálása Western blot analízissel

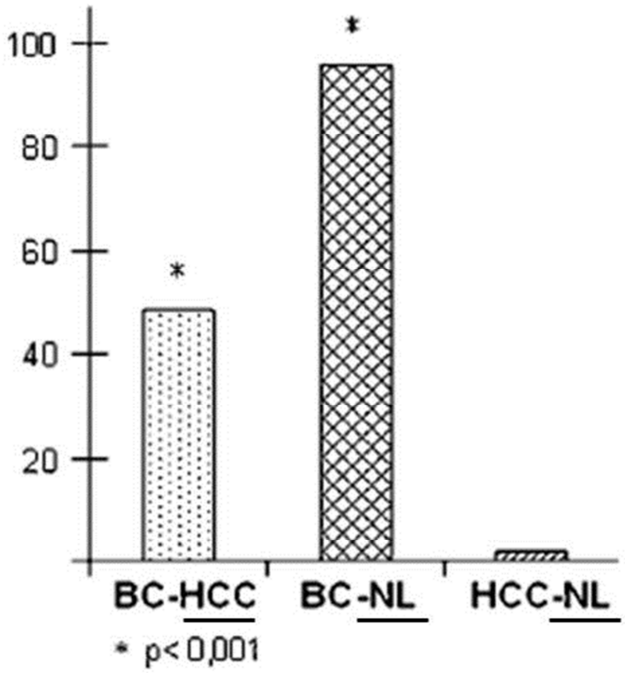
A claudin-4 fehérje expresszió immunhisztokémiával kapott eredményének megerősítésére Western Blot analízist végeztünk (40. ábra). Kizárólag az epeúti tumorokban 22 000 Dalton mólsúlyú, erős immunreaktív sávot kaptunk a claudin-4 elleni antitesttel. Claudin-4 fehérje nem volt kimutatható a hepatocelluláris carcinomákban és a normál májban (40. ábra).



40. ábra A Western immunoblot analízis eredményének ábrázolása reprezentatív mintákon: A claudin-4 pozitivitás kizárólag az epeúti tumorokban jelenik meg (nyílhegyek: 2,5 és 7 sávok). A molekulasúly markerek (kDa) fel vannak tüntetve. Az 1 és 4 sávok hepatocelluláris carcinoma minták, míg a 3 és 6 sáv mintái tumor körüli tumormentes májszövetek; a 8 sáv normál májszövet. NK—negatív kontroll normál májszövetből

Claudin-4 mRNS expresszió vizsgálata

A claudin-4 mRNS szint relatív expressziójának mérésére a béta-actint használtuk referencia génként. A real-time RT-PCR reakcióval a claudin-4 mRNS expresszió szignifikánsan magasabbnak bizponyult az epeúti tumorokban a hepatocelluláris carcinoma csoporthoz (48-szoros emelkedés, $p \leq 0{,}001$ és a normál májhoz (95-szörös emelkedés, $p \leq 0{,}001$) képest (41. ábra). A HCC csoport és a normál máj között a claudin-4 mRNS expresszióban nem mutatkozott szignifikáns különbség.



41. ábra A claudin-4 mRNS expresszió detektálása real-time RT-PCR-el és a vizsgált csoportok egymáshoz viszonyított expressziójának arányának (fold change) ábrázolása. A vizsgált csoportok: epeúti tumorok (CC), hepatocelluláris carcinoma (HCC) és normal máj (NL). A claudin- 4 mRNS expresszió szignifikánsan magasabb az epeúti tumorokban a HCC-hez és a normál májhoz viszonyítva. Az összehasonlított csoportok párjaiban a második, aláhúzott csoporthoz viszonyítjuk az első csoportban talált expressziót. A csillagok a szignifikáns (p:≤ 0,05) különbségeket jelölik.

12. táblázat Immunhisztokémiai markerek összehasonlítása.

Immunhisztokémiai markerek összehasonlítása

	n	CLDN4	CK 7	CK 19	CK 20	HSA
Cholangiocarcinoma						
Epehólyag	23	100% (23/23)	96% (22/23)	87% (20/23)	30% (7/23)	9% (2/23)[a]
Ductus choledochus	13	100% (13/13)	100% (13/13)	85% (11/13)	31% (4/13)	15% (2/13)[a]
Ductus hepaticus	10	100% (10/10)	90% (9/10)	80% (8/10)	30% (3/10)	0% (0/10)
Intrahepatikus ductus	7	100% (7/7)	71% (5/7)	71% (5/7)	0% (0/7)	0% (0/7)
Minta összesen	53	100% (53/53)	92% (49/53)	83% (44/53)	26% (14/53)	8% (4/53)[a]
Hepatocellularis carcinoma	50	0% (0/50)	34% (17/50)[a]	0% (0/50)	4% (2/50)	86% (43/50)

[a] – fokális
CK – citokeratin
HSA – hepatocyta specifikus antigén

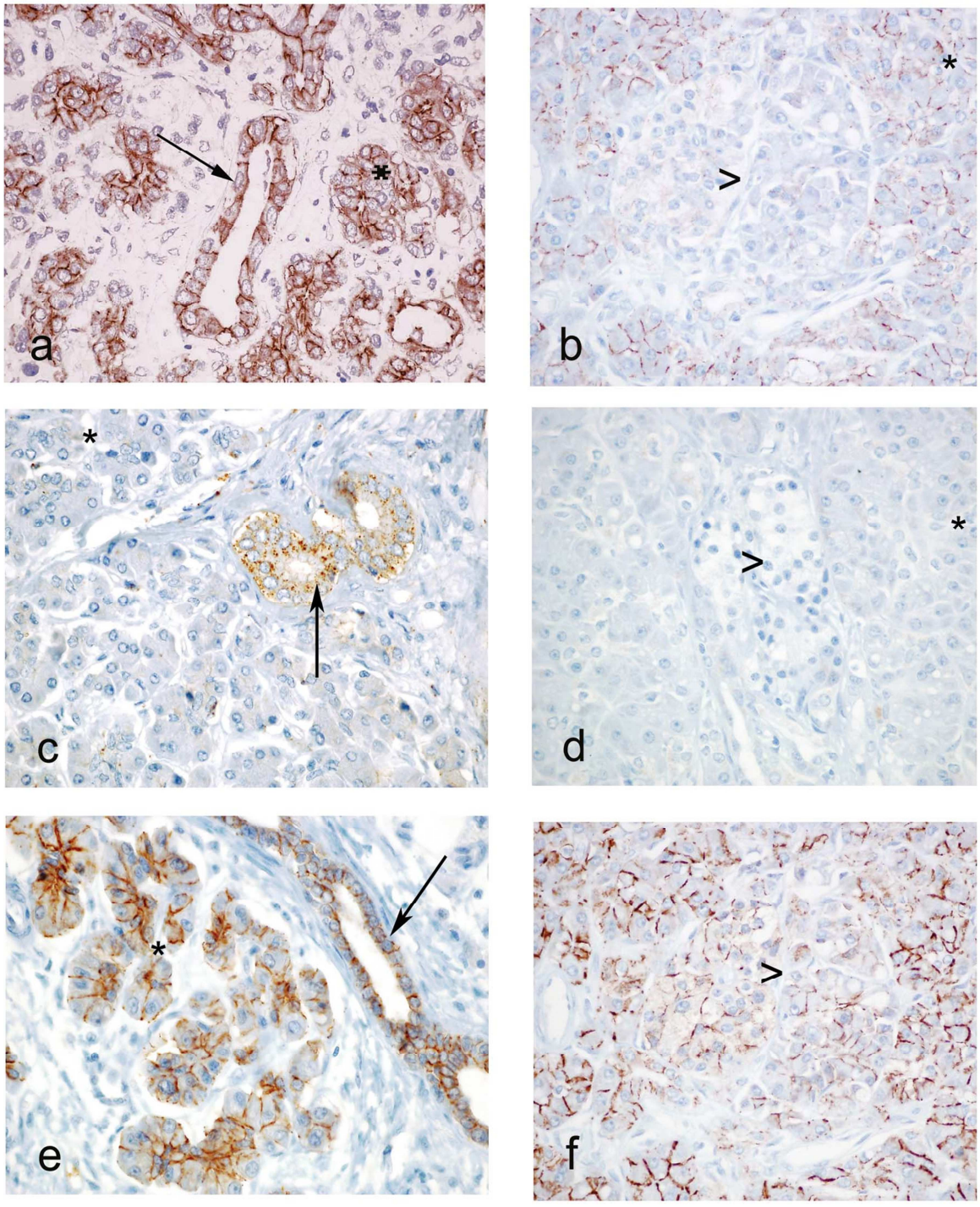
IV.1.4. Claudin és tricellulin expresszió hepato-pancreato-biliáris daganatokban

IV.1.4.1. Claudin expresszió endocrin és exocrin pancreasban

Célkitűzésünk volt a claudin expressziós mintázat feltérképezése a normál exocrin és endocrin pancreasban valamint az exocrin és endocrin carcinomákban, ezáltal feltárva a claudin expressziós profil hisztogenezis specifikus vonásait és a daganattípusokat jellemző különbségeket.

Normál pancreas claudin fehérje expressziója

A vizsgált claudinok a claudin-2 kivételével lineáris, membranosus expressziót mutattak. A claudin-2 IHK reakció citoplazmatikus granuláris pozitivitást adott. Amíg a claudin-1 mind az acinusokban, mind a ductális hámsejtekben kimutatható volt, addig a az endocrin sejtek negatívak voltak (42. ábra a, b). A claudin-2 csak a ductusokban volt detektálható. (42. ábra c, d). A claudin-3 fehérje a pancreas minden hámelemében expresszálódott: acinusokban, ductusokban és az endocrin sejtekben. (42. ábra e,f).

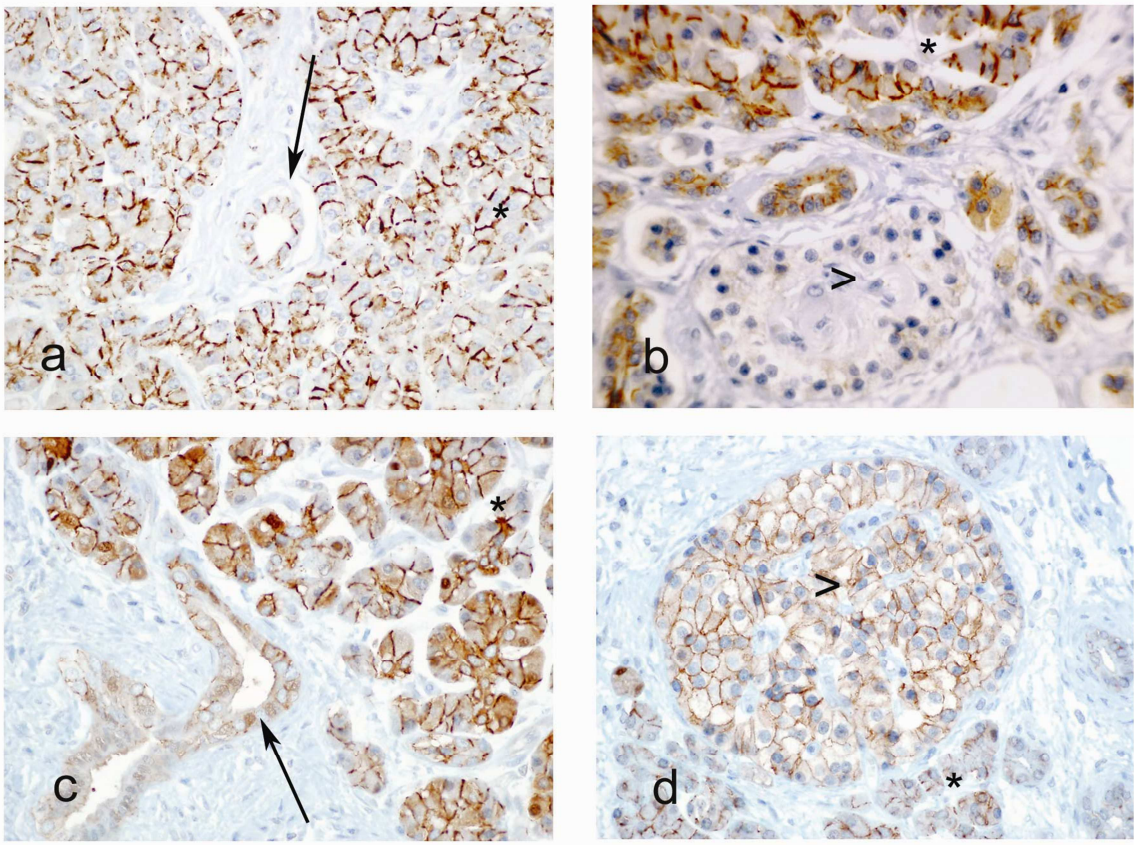


42. ábra CLDN-1, -2 és -3 expresszió normál pancreas ductusokban, acinusokban és az endocrin Langerhans szigetekben; a, b: claudin-1, c, d: claudin-2, e, f: claudin-3. (600X) csillag: acinus, nyílhegy: endocrin sejtek, nyíl: ductus sejtek. A ductusok claudin-1, -2 és -3, az acinusok CLDN-1 és -3 pozitivitást, míg az endocrin sejtek csupán CLDN-3 pozitivitást mutattak.

A claudin-4 az acinusokban és a ductusokban egyaránt detektálható volt, de a Langerhans szigetek negatívnak bizonyultak (43. ábra a,b). A claudin-7 fehérje a claudin-3-hoz hasonlóan az acinaris, ductalis és endocrin sejtes kimutatható volt IHK-val. (43. ábra c, d). A ductusok sejtkapcsoló struktúrái tehát claudin-1, -2, -3, -4 és -7 fehérjét expresszálnak, míg az endocrin sejtekben csak claudin-3 és -7 mutatható ki. Az acináris sejtek a ductusokhoz hasonló expressziót mutatnak, de a claudin-1, -3, -4, és -7 pozitivitás mellett claudin-2 nem mutatható ki (13. táblázat).

13. táblázat Claudin expressziós mintázat normál pancreasban.

Claudin altípus	Acinus sejtek	Ductus sejtek	Endocrin sejtek
CLDN-1	pozitív	pozitív	negatív
CLDN-2	negatív	pozitív	negatív
CLDN-3	pozitív	pozitív	pozitív
CLDN-4	pozitív	pozitív	negatív
CLDN-7	pozitív	pozitív	pozitív



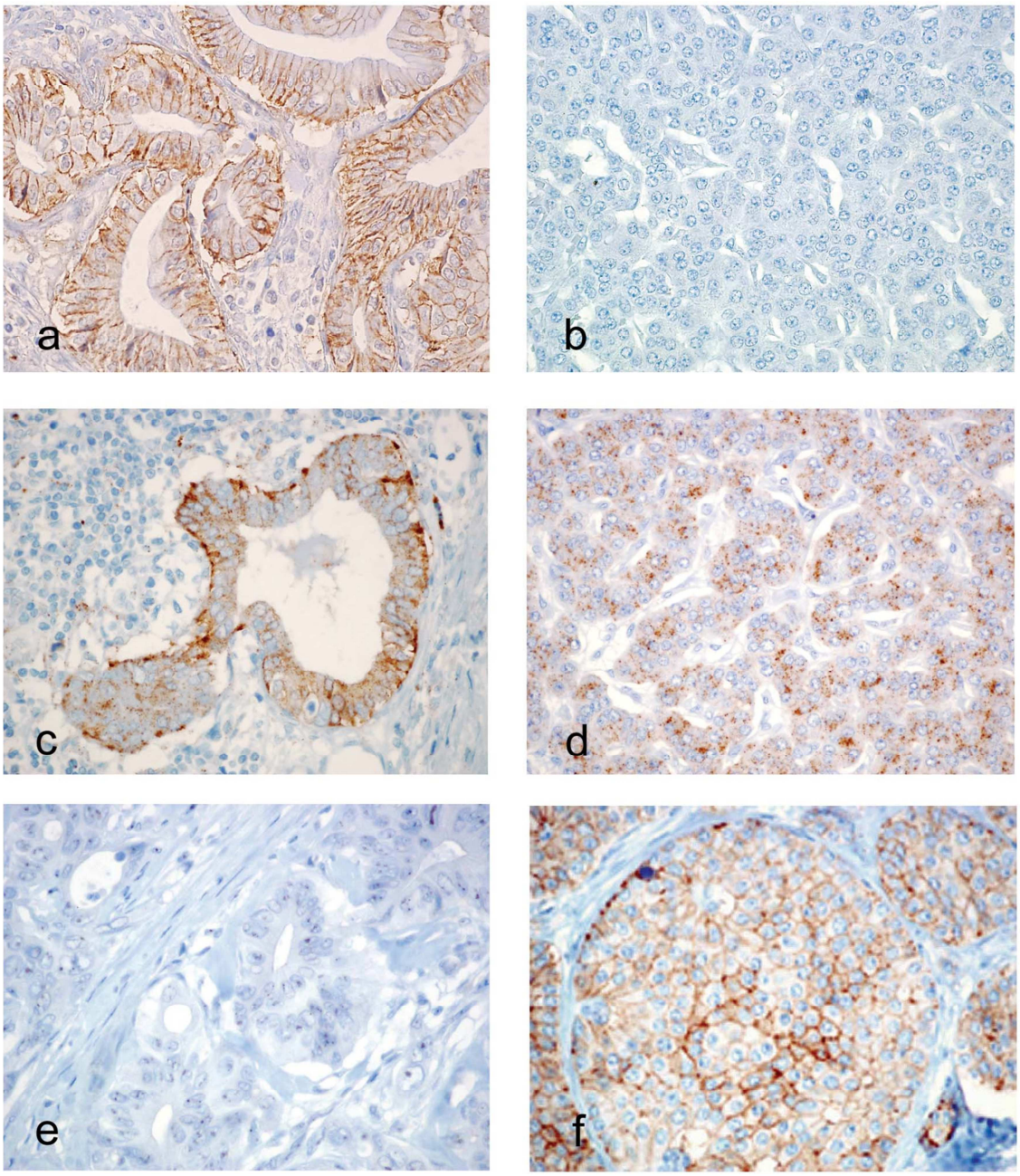
43. ábra Normál ductusok, acinusok és Langerhans szigetek claudin-4 és claudin-7 fehérje expressziója; a, b: CLDN-4, c, d: CLDN-7. (600X) csillag: acinus, nyílhegy: endocrin sejtek, nyíl: ductus sejtek. A CLDN-4 és -7 fehérje a ductusokban és acinusokban is pozitivitást ad, azonban a Langerhans sziget sejtjei CLDN-4 negatívak és CLDN-7 pozitívak.

Exocrin ductalis carcinomák és endocrin daganatok vizsgálata immunhisztokémiai módszerrel

Az adenocarcinomák claudin expressziója intratumoralisan nem mutatott nagy mértékű eltéréseket. Kifejezett, membranosus, diffúz claudin-1 (44. ábra a) és -4 (45. ábra a) pozitivitást detektáltunk az összes vizsgált adenocarcinomában. A claudin-2 a tumorok 45%-ában (9/20) adott granuláris, citoplazmatikus pozitivitás (44. ábra c). A claudin-3 ellenes antitest egyik tumorban sem adott reakciót (44. ábra e). Claudin-7 minden adenocarcinomában pozitív reakciót adott, de ez focalis és változó mértékű volt. pozitivitást kaptunk a reakció során (45. ábra c). A legerősebb

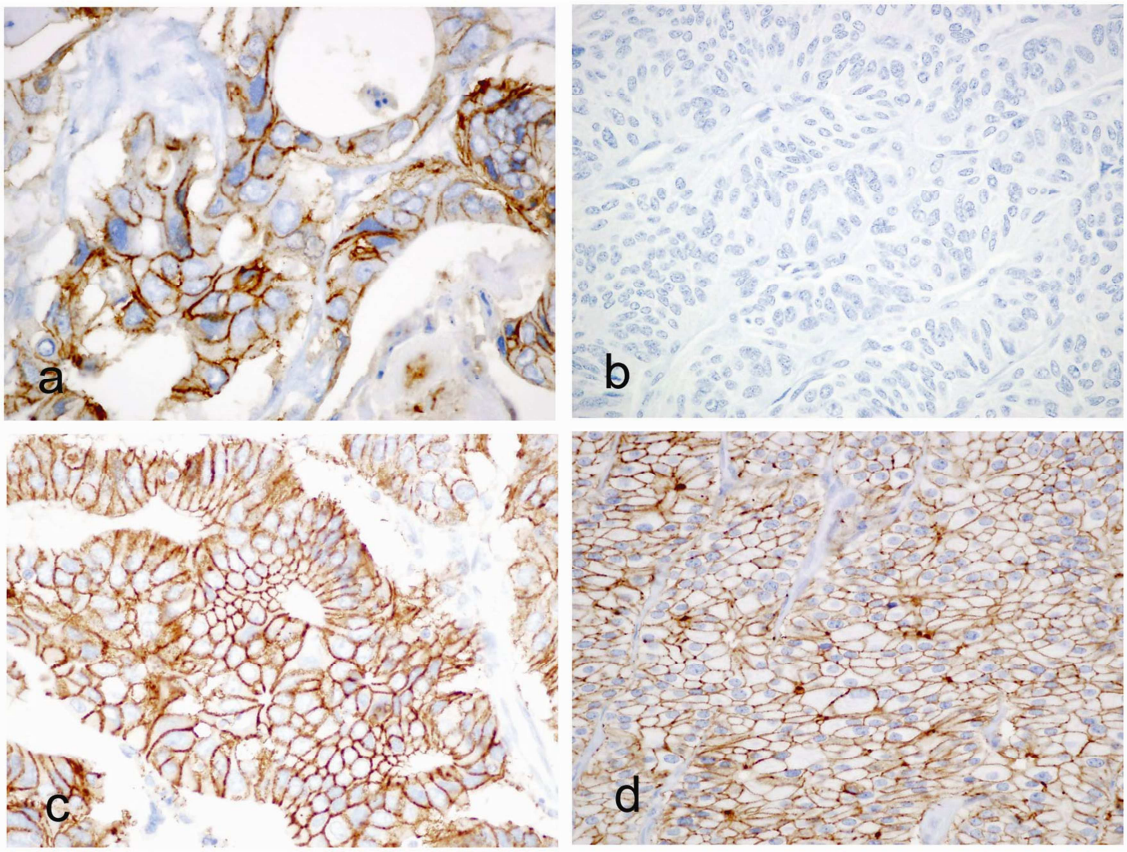
fehérje expressziót a CLDN-4 mutatta. Az expresszió mértéke nem mutatott szignifikáns eltérést az eltérő differenciáltságú Grade I, II és III-as tumorok között.

Az endocrin daganatokban a claudinok expressziója az exocrin tumorokhoz hasonlóan intratumoralisan homogénnek bizonyult. Claudin-2 pozitivitást mindössze egy esetben (1/20 – 5%) találtunk (44. ábra d). A CLDN-3 (44. ábra f) és -7 (45. ábra d) IHK reakció minden vizsgált endocrin daganatban erős pozitivitást adott. Az exocrin tumorokkal szemben az endocrin daganatokban claudin-1 (44. ábra b) és claudin-4 (45. ábra b) pozitivitást egyik tumorban sem találtunk. A claudin expresszióban a benignus, bizonytalan természetű és malignus daganatok között nem találtunk szignifikáns eltérést.



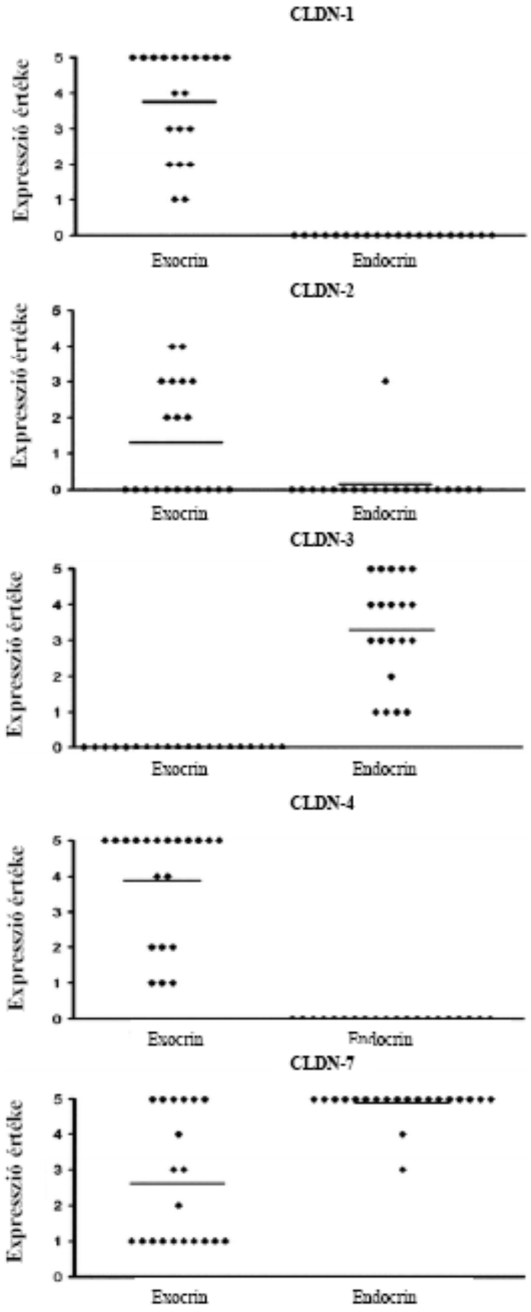
44. ábra Exocrin adenocarcinomák és endocrin daganatok vizsgálata során kapott CLDN-1, -2 és -3 expressziós mintázat. a-c, e-f: 600X, d: 1000X. Az exocrin daganatokban CLDN-1 (a) és -2 (c) pozitivitás látható, a CLDN-3 (e) reakció negatív. Az endocrin tumorok mindegyike CLDN-1 (b) negatív, a CLDN-2 a daganatok csupán 5%-ában pozitív (d), míg CLDN-3 (f) reakció a tumorok 100%-ában mutatott pozitivitást.

dc_1040_15



45. ábra Exocrin adenocarcinomák és endocrin daganatok CLDN-3 és -7 expressziós mintázata (a-c): 600X. Az adenocarcinomák CLDN-4 (a) és CLDN-7 (c) reakcióval pozitívak, míg az endocrin tumorok CLDN-4 (b) ellenes immunhisztokémiai reakció során negativitást mutatnak, viszont a CLDN-7 (d) reakció pozitív.

Az exocrin és endocrin daganatokban a claudin-1, -2, -3, -4 és -7 immunhisztokémia kiértékelésének eredményét és az egyes esetek megoszlását 46. ábra mutatja be. Az exocrin és endocrin tumorok expressziós profiljában a legjellemzőbb eltérések tehát a CLDN-1, -3 és -4 fehérjék esetében voltak megfigyelhetőek, melyek differenciáldiagnosztikai értékkel bírhatnak. Az exocrin ductalis pancreas carcinomák erőteljes claudin-1 és claudin-4 immunhisztokémiai pozitivitást mutatnak és negatívak claudin-3-ra, míg az endocrin daganatok claudin-3 fehérje expressziója erőteljes, de nem detektálható bennük claudin-1 és claudin-4. Az endocrin tumorok a CLDN-7 fehérjét jelentősen erősebb mértékben termelik az exocrin tumorokhoz képest.

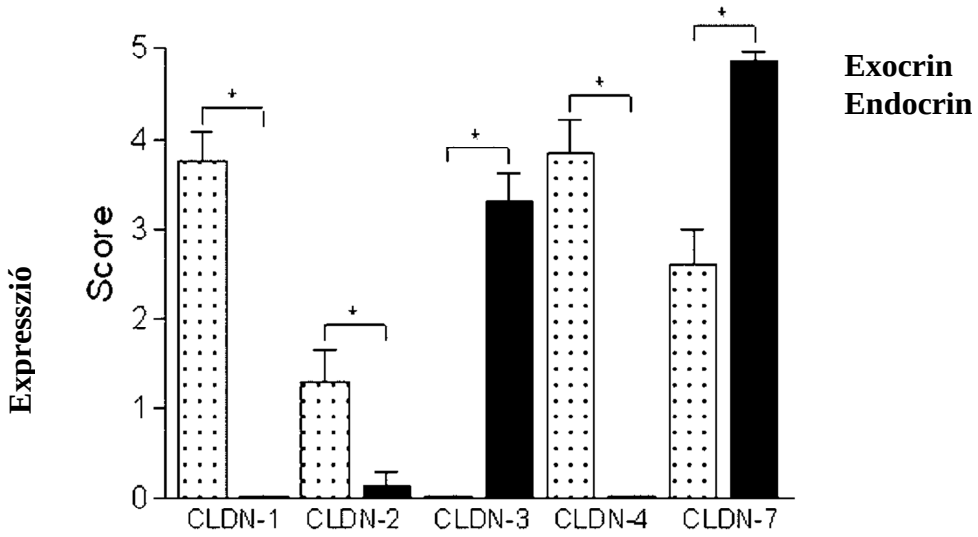


46. ábra Immunhisztokémiai reakciók során kapott CLDN expressziót mutató értékek az exocrin és endocrin pancreas tumorokban. Egyenes vonal mutatja a középértéket.

Az exocrin és endocrin tumorok vizsgálatakor az egyes csoportokban detektált claudin fehérje expresszió kiértékelésekor kapott értékeket Mann-Whitney U teszt alapján vetettük össze (47. ábra, 14. táblázat). Az endocrin carcinomákban a tumorsejtek szignifikánsan magasabb mértékben mutatnak CLDN-3 és -7 pozitivitást, mint a ductalis exocrin carcinomák daganatsejtjei, azonban az adenocarcinomákban szignifikánsan nagyobb a CLDN-1, -2, és -4 fehérje expresszió pozitivitása. A legnagyobb szignifikanciájú (<0,0001) eltérést a CLDN-1, -3 és -4 esetében láttuk, a claudin-1 és -4 fehérjét az endocrin tumorok, míg a claudin-3-t az exocrin tumorok egyáltalán nem expresszálják.

14. táblázat Exocrin adenocarcinomákon és endocrin pancreas tumorokon végzett immunhisztokémiai reakciók szemikvantitatív analízise

Claudin altípus	Exocrin	Endocrin	p érték
CLDN-1	3,8 ± 0,3	0,0 ± 0,0	<0,0001*
CLDN-2	1,3 ± 0,4	0,2 ± 0,2	0,0268*
CLDN-3	0,0 ± 0,0	3,3 ±0,3	<0,0001*
CLDN-4	3,9 ± 0,4	0,0 ± 0,0	<0,0001*
CLDN-7	2,6 ± 0,4	4,9 ± 0,1	0,0003*



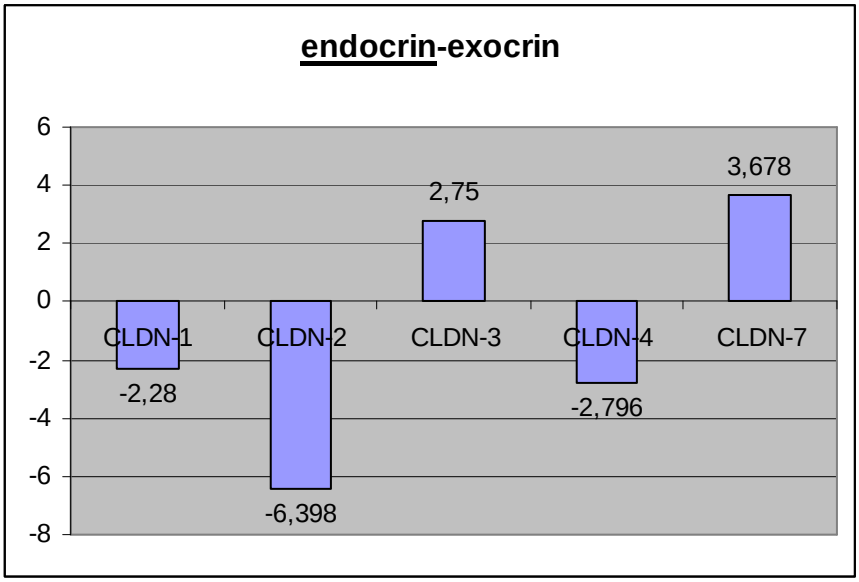
47. ábra Exocrin adenocarcinomákon és endocrin pancreas tumorokon végzett immunhisztokémiai reakciók szemikvantitatív analízise. A megadott értékek a claudin expresszió középértékét ±standard hibát (mean ± S.E.) jelölik. CLDN: claudin; p: szignifikancia, *: szignifikáns eltérés.

Az exocrin daganatok szignifikánsan magasabb mértékben termelik a CLDN-1, -2 és -4 fehérjéket, ellenben az endocrin tumorokban szignifikánsan nagyobb a CLDN-3 és -7 fehérje expresszió látható.

A claudin-1, -2, -3, -4 és -7 mRNS expresszió endocrin daganatokban és exocrin adenocarcinomákban

A ductalis *adenocarcinomák* és endocrin tumorok csoportjainak reprezentatív mintáinak mRNS expressziós analízise a vizsgált csoportok között az immunhisztokémiai reakciók eredményeihez hasonló különbségeket tárt fel. Az eredményeket a 48. ábra mutatja be. Az elvégzett RT-PCR vizsgálat azt mutatta, hogy a claudin-1, -2 és -4 mRNS expressziója a pancreas ductalis carcinomákban magasabb volt az endocrin tumorokhoz képest: CLDN-1: 2,28-szoros különbség, CLDN-2: 6,398-szeres különbség, CLDN-4: 2,796-szeres különbség). Tehát a vizsgált claudinok

mRNS expressziója alapvetően az immunhisztokémiai reakciók eredményeivel megegyező irányú különbségeket mutatott, de ezek nem bizonyultak szignifikáns eltéréseknek. Tehát az immunreakciókhoz hasonlóan magasabb, de nem szignifikáns CLDN-3 (2,75-szeres) és -7 (3,678-szeres) mRNS expressziót detektáltunk az endocrin tumorokban az exocrin daganatokhoz képest.



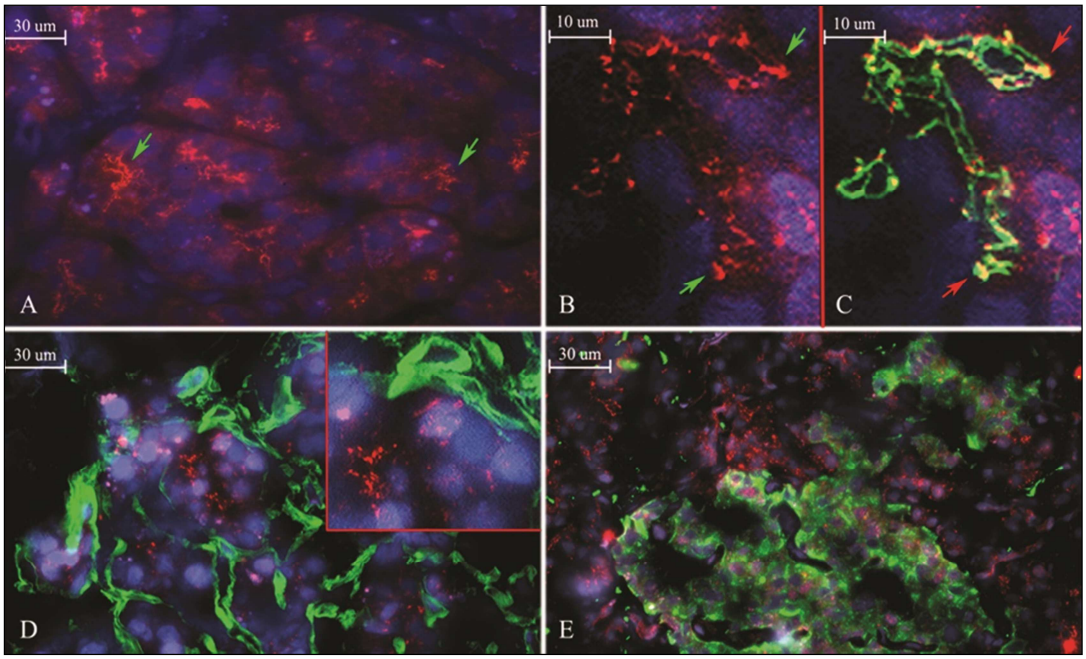
Claudin altípus	CLDN-1	CLDN-2	CLDN-3	CLDN-4	CLDN-7
p érték	*0,158* ***ns***	*0,116* ***ns***	*0,343* ***ns***	*0,107* ***ns***	*0,7* ***ns***

48. ábra Claudin expresszió kimutatása RT-PCR vizsgálattal exocrin és endocrin daganatokban. A feltüntetett értékek megadják, hogy az exocrin tumorokhoz képest az endocrin tumorok hányszor nagyobb CLDN expressziót mutatnak (ns: nem szignifikáns eltérés).

IV.1.4.2. Tricellulin expresszió detektálása immunfluoreszcenciával normál hasnyálmirigyben és májban, valamint HCC-ben, iCCC-ben és pancreas ductalis carcinomában.

Összességében célul tűztük ki az újonnan felfedezett tricellulin expressziójának a vizsgálatát a hepatobiliáris rendszerben és panceasban. Kérdésünk volt, hogy expresszálódik-e a tricellulin a normál pancreasban és májban, valamint található-e különbség az expresszió mértékében vagy lokalizációjában a májsejtek és az epeutak között, valamint a pancreasban a ductalis, acinaris, illetve endokrin struktúrákban? Kimutatható-e tricellulin a cirrhotikus, nem daganatos májszövetben, a primer (hepatocellularis carcinoma és cholangiocarcinoma) májdaganatokban és a pancreas ductalis adenocarcinomában? Van-e expressziós különbség a különböző differenciáltságú hepatocellularis carcinomák, cholangiocarcinomák és a pancreas ductalis adenocarcinomák tricellulin expressziójában, és van-e az expressziós mintázatnak prognosztikus vagy prediktív jelentősége

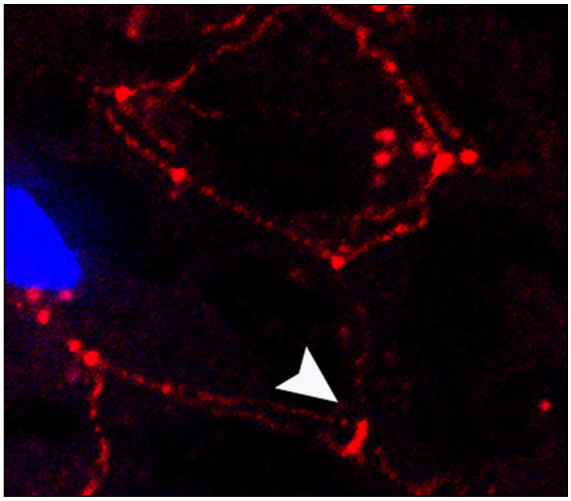
A normál hasnyálmirigyben a tricellulin nevének megfelelően a ductus- és acinussejtek apikális pólusához közeli tricelluláris találkozási pontokban pontszerűen volt detektálható (49. ábra, A), míg a bicelluláris találkozópontokon lineáris membránpozitivitás volt észlelhető (49. ábra, B és C). Az endokrin pancreas negatív volt (49. ábra, E). A lokalizáció kimutatásakor a tricellulin (vörös szín) és occludin (zöld fluorescencia) kettős jelölés során a két fehérje membranosus ko-lokalizációját találtuk a ductus- és acinussejtek apikális membránjában (49. ábra, B és C) a pontszerűen megjelenő sárga szín jelzi.



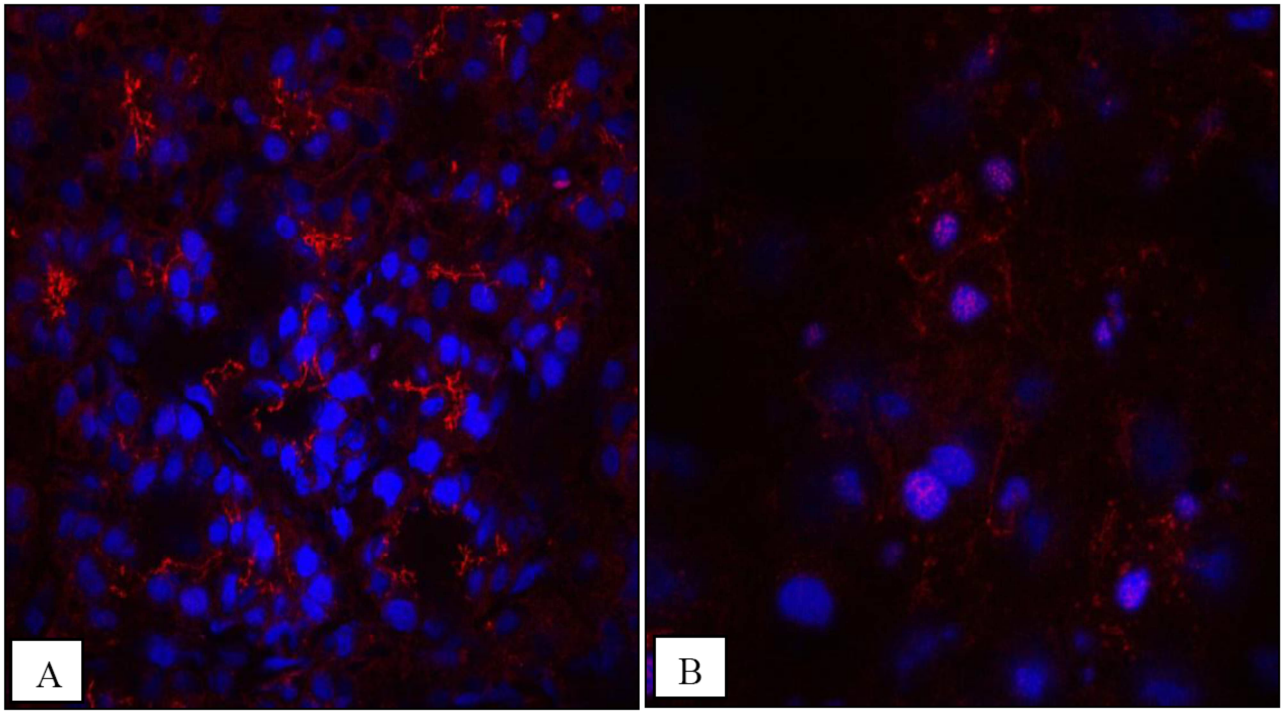
49. **ábra Immunfluoreszcens eredményeink normál pancreasban. A, Tricellulin (TRIC) expresszió az acinussejtek luminális részén (zöld nyilak; 630x; scale bar: 30 µm); B-C, TRIC (piros) és occludin (zöld) kolokalizációban (sárga) normál pancreas acinussejtjeinek apikális felszínén (zöld és piros nyilak; 1200x; scale bar: 10 µm); D, Az anti-TRIC (piros) és anti-kollagén IV (zöld) antitestek is megerősítik a TRIC apikális elhelyezkedését (630x; inset, 1000x; scale bar: 30 µm); E, Anti-TRIC (piros) és anti-synaptophysin (zöld) kettős jelölés alapján a Langerhans-szigetek területén nem észlelhető ko-lokalizáció (L; 400x; scale bar: 30 µm). Korompay A, Borka K, Lotz G et al. Tricellulin expression in normal and neoplastic human pancreas. Histopathology. 2012 May;60(6B):E76-86.**

A normál májszövetben a tricellulin heterogén expressziót mutatott. A jellemzően gyenge immunpozitivitás mellett mintáink egy részében kifejezetten erős reakció volt látható. A májban mind a hepatocyták, mind pedig az epeúti hámsejtek felületén a tricelluláris találkozási pontokban erős, pontszerű tricellulin festődést találtunk az immunfluorescens kimutatás során (50. ábra, nyílhegy), míg a pancreas exocrin mirigyekhez és ductusokhoz hasonlóan a két sejt között kialakult junkcióknak megfelelően lineáris membránpozitivitás mutatkozott. A HCC-k a májsejtekhez hasonlóan TRIC pozitivitást mutattak. (51. ábra) Kettős immunfluoreszcens vizsgálataink során a normál májban tricellulin-CLDN-1 (52. ábra A, B, C) és tricellulin-MRP2 (52. ábra D, E, F) ko-lokalizáció, mely megerősítette a tricellulin lokalizációját mind a hepatocytákban, mind pedig az epeúti hámban.

dc_1040_15

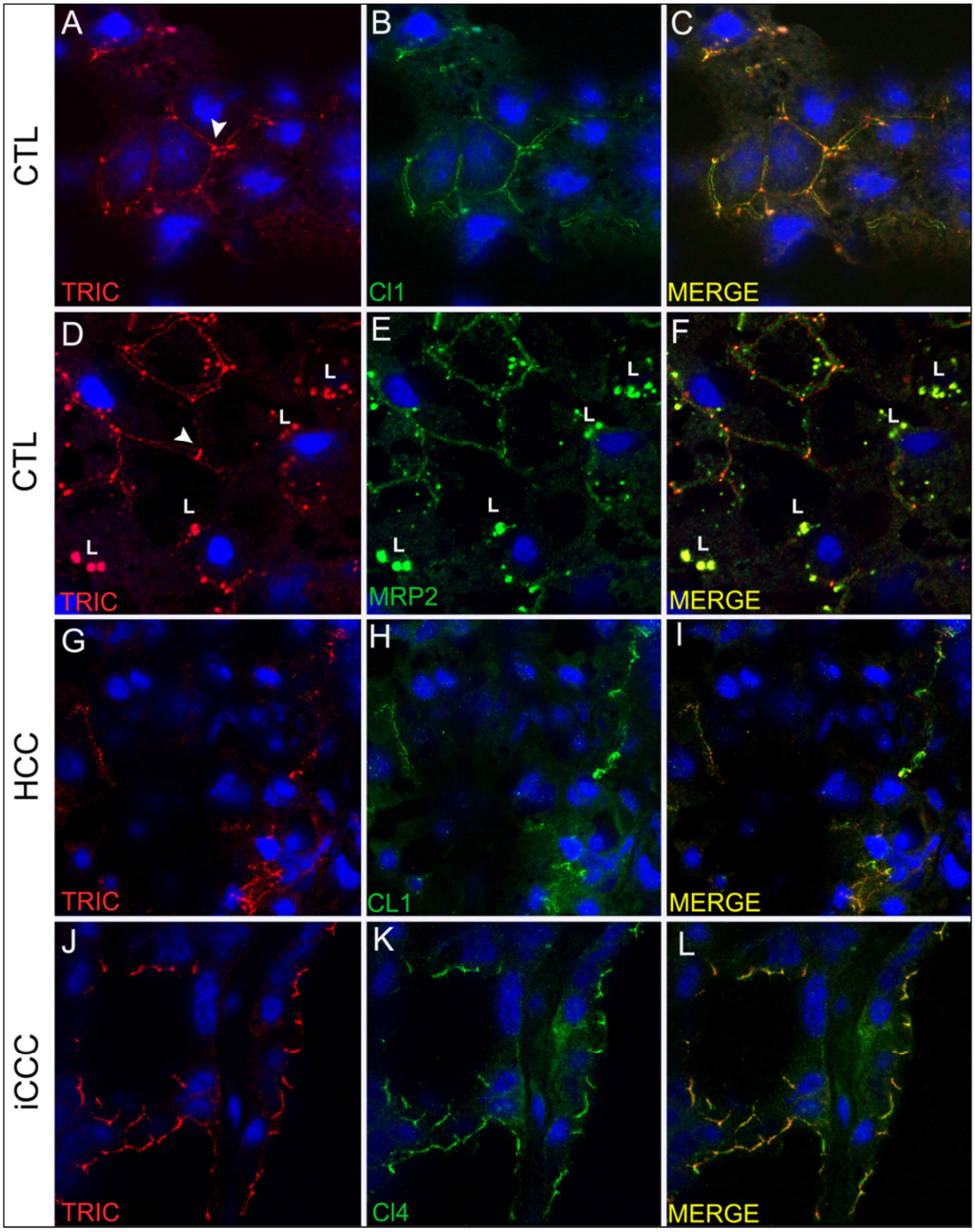


50. ábra Tricellulin immunfluoreszcencia normál májban. A tricellulin három sejt találkozási pontjánál pontszerű membránpozitivitást ad (nyílhegy), míg két hepatocyta összefekvő felszínén lineárisan membránreakció figyelhető meg (630x) Somorácz A, Korompay A, Törzsök P et al. Tricellulin expression and its prognostic significance in primary liver carcinomas. Pathol Oncol Res. 2014 Oct;20(4):755-64.



51. ábra Tricellulin immunfluoreszcencia HCC-ben (A, 630x) és FLC-ben (B, 1200x). Bicellularisan linearis, három sejt között pontszerű lokalizáció. Patonai A, Erdélyi-Belle B, Korompay A et al. Claudins and tricellulin in fibrolamellar hepatocellular carcinoma. Virchows Arch. 2011 Jun;458(6):679-88.

dc_1040_15



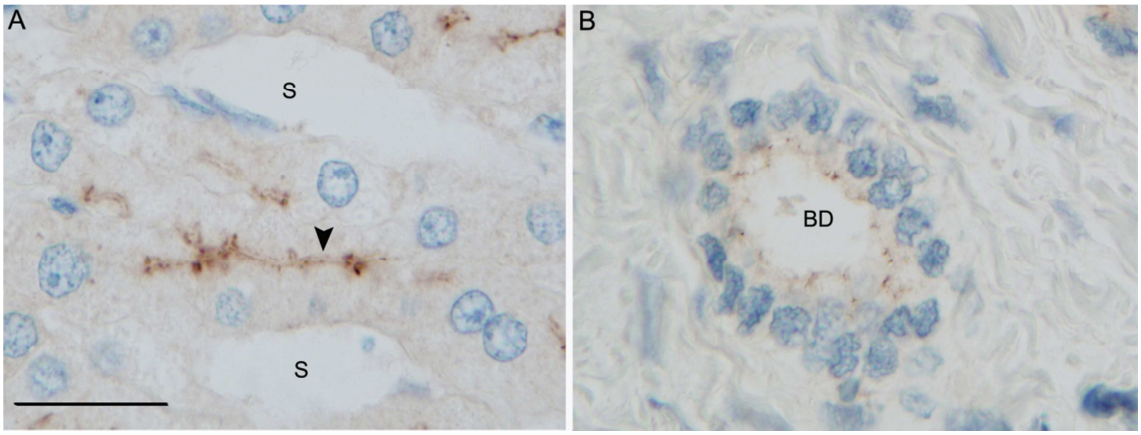
52. ábra Tricellulin ko-lokalizáció CLDN-1, CLDN-4, és MRP2 fehérjékkel normál humán májszövetben, HCC-ben és iCCC-ben. CTL: kontroll máj; Cl1: claudin-1; Cl4: claudin-4; MRP2: multidrug resistance protein 2; TRIC: tricellulin. A nagyítás mértéke: 630 X. Somorácz A, Korompay A, Törzsök P et al. Tricellulin expression and its prognostic significance in primary liver carcinomas. Pathol Oncol Res. 2014 Oct;20(4):755-64.

A normál májban a tricellulin jellemzően három sejt találkozási pontjában (nyílhegy) detektálható (52. ábra A és D), azonban a bicellularis junkcióknak megfelelően lineáris pozitivitás is megfigyelhető (52. ábra A, D). A CLDN-1 fehérjével a tricellulin mind az ép májban (52. ábra A-C), mind pedig HCC-ben (52. ábra G-I) együttes elhelyezkedést, ám az MRP2 fehérjével a ko-lokalizáció csak normál májban látható (D-F; 630x). Az E. panelben 'L'-jelölés az erős aspecifikus autofluoreszcenciát jelzi (D-F; 630x). A tricellulin az iCCC-ben ko-lokalizációt mutat a CLDN-4 fehérjével (52. ábra J-L).

Hepatocellularis carcinomákban a tricellulinnak a CLDN-1-el való ko-lokalizációját azonosítottuk (52. ábra G, H, I), míg az *intrahepaticus cholangiocarcinomákban* a TRIC a ductalis iCCC-t jellemző CLDN-4-el mutatott együttes jelölődést (52. ábra J, K, L).

IV.1.4.3. Tricellulin fehérje expresszió detektálása immunhisztokémiával normál májban és pancreasban, valamint HCC-ben, iCCC-ben és pancreas ductalis carcinomában

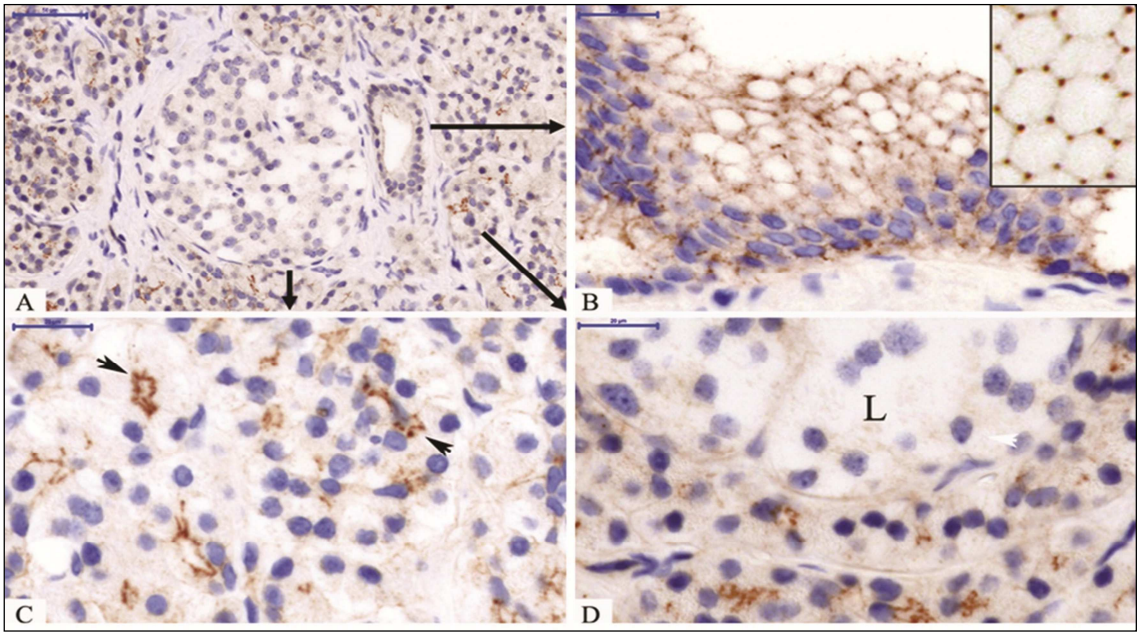
A normál májban az immunfluoreszcens vizsgálatok eredményeihez hasonlóan heterogén tricellulin-pozitivitás mutatkozott: egyes területeken gyengébb, másutt kifejezettebb festődés látszott. A tricelluláris junkcióknak megfelelően pontszerű, míg a bicelluláris sejtkapcsoló struktúrák mentén lineáris membrán pozitivitás volt detektálható a májsejtekben, a kisebb epeutak hámsejtjeiben és a nagyobb epevezetékekben egyaránt (53. ábra).



53. ábra Tricellulin expresszió normál májszövetben. A tricellulin a hepatocyták mellett az elsődleges epeutak (A) mellett, a nagyobb epeutak (B) lumináris felszínén is azonosítható S: sinusoid; BD: epevezeték. Somorácz A, Korompay A, Törzsök P et al. Tricellulin expression and its prognostic significance in primary liver carcinomas. Pathol Oncol Res. 2014 Oct;20(4):755-64.

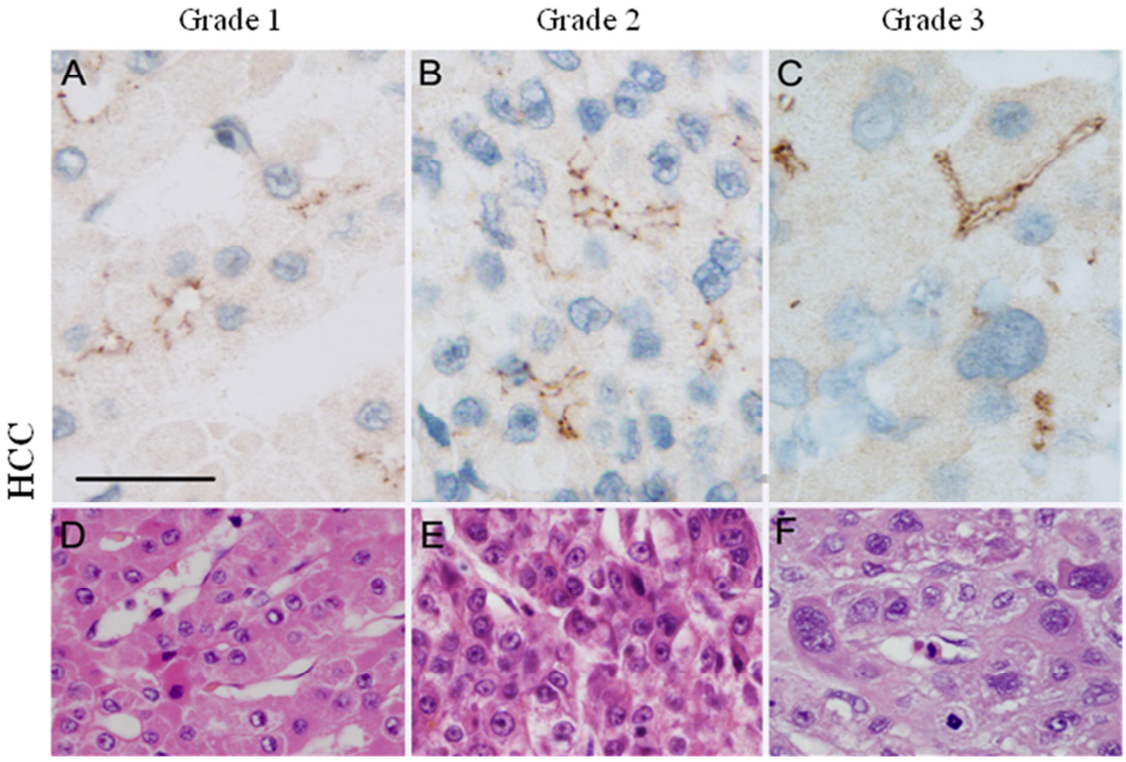
A makro- és mikronoduláris *cirrhotikus májszövet* tricellulin-expressziós mintázata hasonlónak bizonyult a normál májszövethez. A pseudonodulusok parenchymájában pontszerű és lineáris reakció is detektlható volt. A kis- és közepes méretű epeutakban túlnyomórészt pontszerű tricellulin festődés volt látható. A fibrosis súlyossága nem mutatott összefüggést a tricellulin festődés mértékével.

Az immunhisztokémiai reakciók *a normál exocrin pancreasban* pozitívak voltak mind az acinussejtekben, mind pedig a kisebb ductulusokban és a nagyobb ductusokban is (54. ábra, B-C). A membranosus fehérje expresszió ezen hámsejtekben a luminális pólusnál volt detektálható intenzív, pontszerű membránpozitivitás formájában, döntően a tricelluláris junkcióknak megfelelően. Emellett gyengébb, lineáris festődés is látható volt a két sejt közötti, bicelluláris junkciókat alkotó területeken. Az *endocrin pancreas* nem mutatott tricellulin-pozitivitást (54. ábra, D).



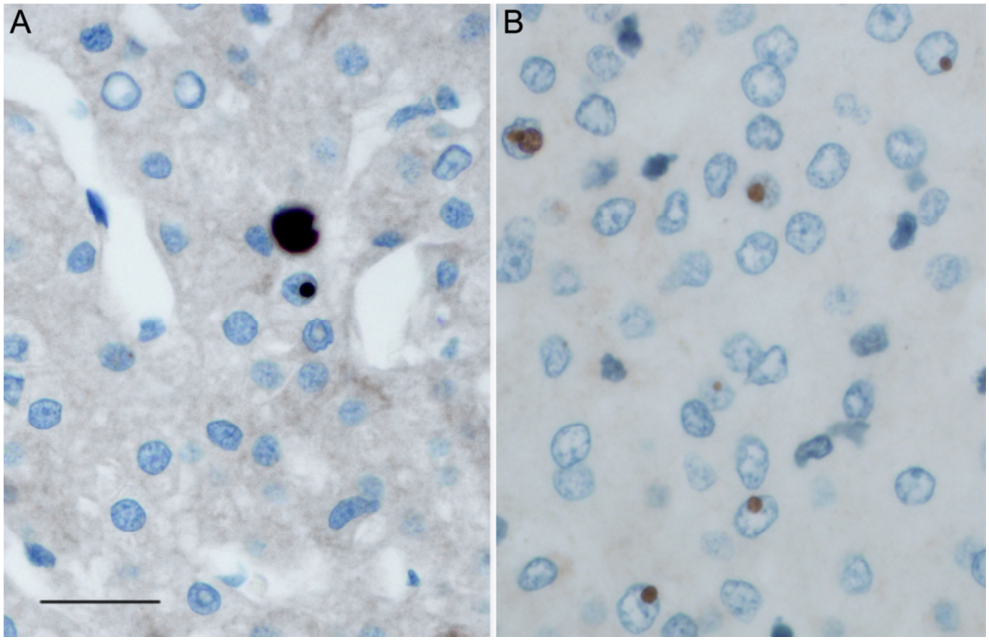
54. ábra Tricellulin kimutatása IHK-val normál pancreasban. A, Humán pancreas exocrin és endocrin területei (200x; méretjelölés: 50 µm) A nyilak ezen területek nagyobb nagyítású képeire mutatnak. B, Erős pontszerű és mérsékelt lineáris membránpozitivitás a ductus hámsejtek apikális pólusán (600x; méretjelölés: 20 µm; képbetét: 1000x); C, Intenzív festődés látható az acinussejtek luminális pólusán (600x; méretjelölés: 20 µm); D, A Langerhans-szigetek (L) TRIC-negatívak (600x; méretjelölés: 20 µm). Korompay A, Borka K, Lotz G et al. Tricellulin expression in normal and neoplastic human pancreas. Histopathology. 2012 May;60(6B):E76-86.

A tricellulin IHK reakció a vizsgált *hepatocelluláris carcinomákban (HCC)* igen heterogén volt. Egyes HCC-k tricellulin-negatívnak mutatkoztak, míg más tumorokban ezen fehérje kifejezett termelődését észleltük. A jól és közepesen differenciált HCC-k pszeudoglanduláris struktúráiban a normál epeúti hámhoz hasonló tricellulin expressziós mintázatot figyeltünk meg, azaz a tumorsejtek apikális pólusához közel, három sejt találkozásánál pontszerű (55. ábra, A), míg a bicelluláris kapcsolódásnak megfelelően lineáris membránpozitivitás (55. ábra, B) volt látható. A dezorientált sturuktúrát mutató, trabekulákat és/vagy sejtfészkeket alkotó daganatsejtek között lineáris festődés volt látható. Egyes rosszul differenciált, grade 3-s HCC-ben kifejezett, erős immunpozitivitást tapasztaltunk (55. ábra, C).



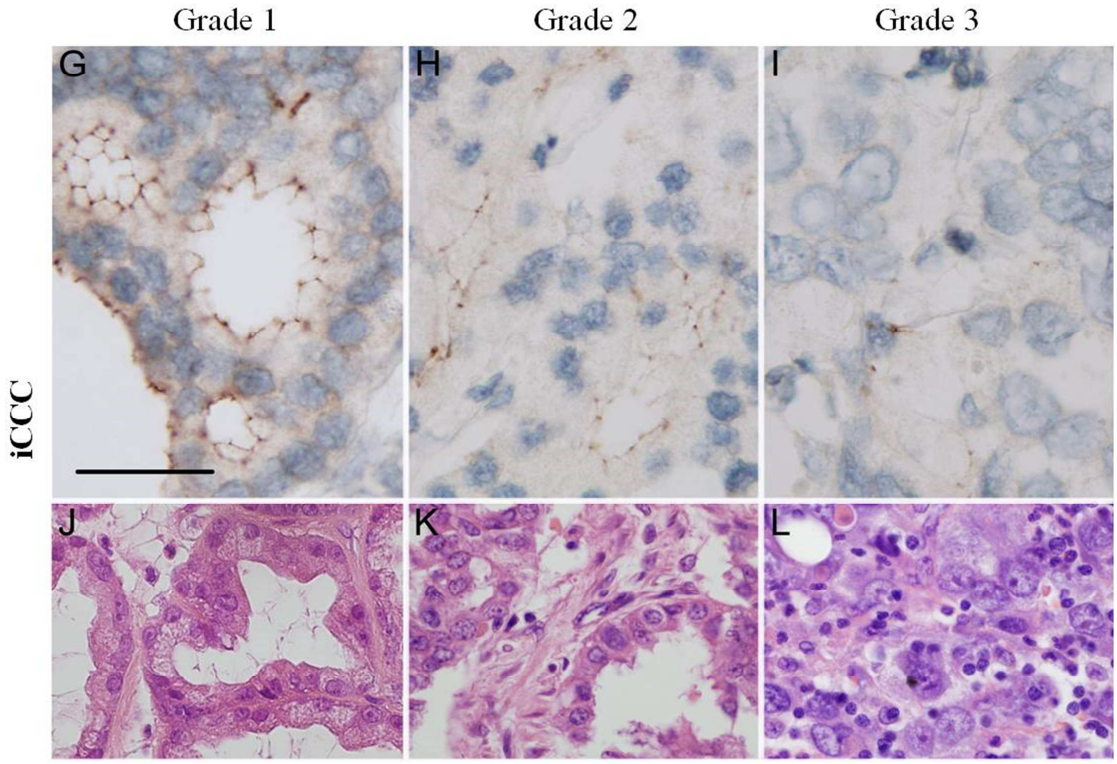
55. ábra Tricellulin expresszió detektálása immunhisztokémiával HCC-ben. A jól differenciált HCC-k pszeudoglanduláris struktúrájában a normál epeúti hámhoz hasonló tricellulin expresszió látható (A). A trabekuláris szerkezetű HCC-kben lineáris és pontszerű immunpozitivitást észleltünk. (B). Egyes dedifferenciált HCC-k erős tricellulin-expressziót mutattak (C). A különböző grade-el rendelkező HCC-k (D, E, F), HE festés. Somorácz A, Korompay A, Törzsök P et al. Tricellulin expression and its prognostic significance in primary liver carcinomas. Pathol Oncol Res. 2014 Oct;20(4):755-64.

Érdekes módon a vizsgált HCC-k közül hat esetben a daganatsejtek kicsiny frakciójában (1-2%) a membranózus immunreakciók mellett magi pozitivitás is kimutatható volt. (56. ábra). Ezekben az HCC esetek közül 5-ben a nukleáris tricellulin-pozitivitás mellett a HCC-kben csak igen gyenge membranózus festődés volt látható (56. ábra).



56. ábra Magi tricellulin-pozitivitás HCC-ban. A magi TRIC pozitivitás a hepatocelluláris tumorsejtek 1-2%-ában volt látható. Emellett ezen esetekben jellemzően csak igen gyenge membránpozitivitás volt észlelhető. Somorácz A, Korompay A, Törzsök P et al. Tricellulin expression and its prognostic significance in primary liver carcinomas. Pathol Oncol Res. 2014 Oct;20(4):755-64.

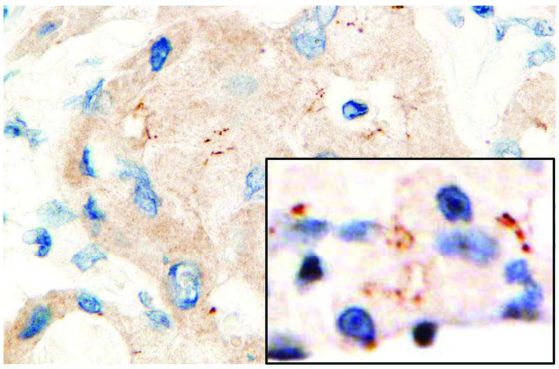
Az intrahepatikus cholangiocarcinomákban (iCCC) a daganatok grade-jének növekedésével, azaz a tumorok dedifferenciálódásával párhuzamosan a tricellulin fehérje expressziójának egyértelmű csökkenését észleltük. A grade 3-s daganatok gyenge festődést mutattak, míg a jól differenciált tumorok mirigyes szerkezetű részében a normál epeutakhoz hasonló, pontszerű tricellulin (57. ábra, G) immunpozitivitást tapasztaltunk. A CCC-k mirigyeket nem képző típusaiban csak igen gyenge TRIC festődést, vagy a fehérje hiányát észleltük (57. ábra, I).



57. ábra Tricellulin expresszió iCCC-ben. A jól differenciált cholangiocarcinomákban diffúz, erős immunpotizivitás látható (G). A grade 2-s tumorok esetében a tricellulin expresszió csökkent volt (H), míg a rosszul differenciált grade 3-s tumorokban minimális TRIC festődés, vagy a fehérje hiánya volt (I) látható. A különböző grádusú iCCC-k HE-festett metszetei (J, K, L). Somorácz A, Korompay A, Törzsök P et al. Tricellulin expression and its prognostic significance in primary liver carcinomas. Pathol Oncol Res. 2014 Oct;20(4):755-64.

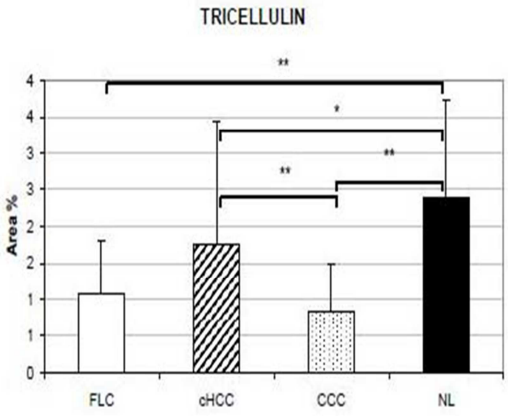
A fibrolamelláris hepatocelluláris carcinomákban (FLC) a klasszikus HCC-csoporthoz hasonlóan az acináris struktúrákban a tumorsejtek apikális pólusán látható döntően lineáris membránpozitivitás (58. ábra).

dc_1040_15



58. ábra Tricellulin (TRIC) imunhisztokémiai reakció FLC-ben. A pseudoglandularis, acináris szerkezetnek megfelelően, illetve a tumorsejtek mentén pontszerű pozitív reakció látható (600x, képbetét: 1200x). Patonai A, Erdélyi-Belle B, Korompay A et al. Claudins and tricellulin in fibrolamellar hepatocellular carcinoma. Virchows Arch. 2011, 458(6):679-88.

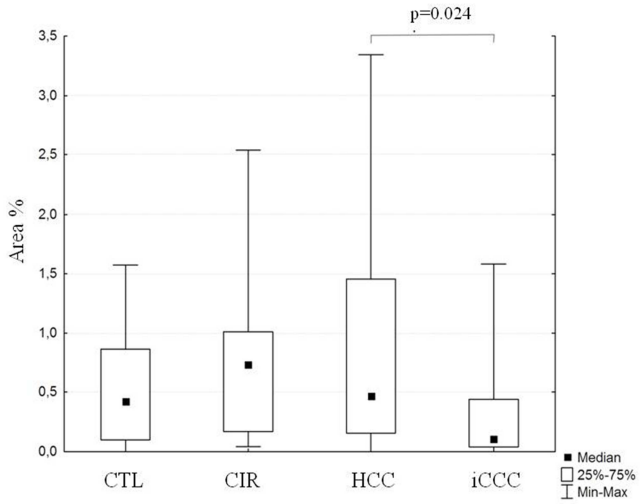
Az FLC-k vizsgálata során munkacsoportunk a vizsgált kis számú normál, kontroll májminta elemzése kapcsán azt találta, hogy a normál májhoz képest mind a cholangiocarcinomák, és a HCC-k, mind pedig az FLC-k szignifikánsan csökkent TRIC festődést mutatnak. Emellett konvencionális HCC-k a TRIC-fehérje szignifikánsan magasabb expresszióját mutatták az iCCC csoporthoz képest (59. ábra). A nagyobb esetszámon elvégzett vizsgálatok (Somoracz,2014) eredményét tekintjük mérvadónak, mivel a kisebb esetszám (Patonai,2011) eredményeinek statisztikai megbízhatósága kisebb.



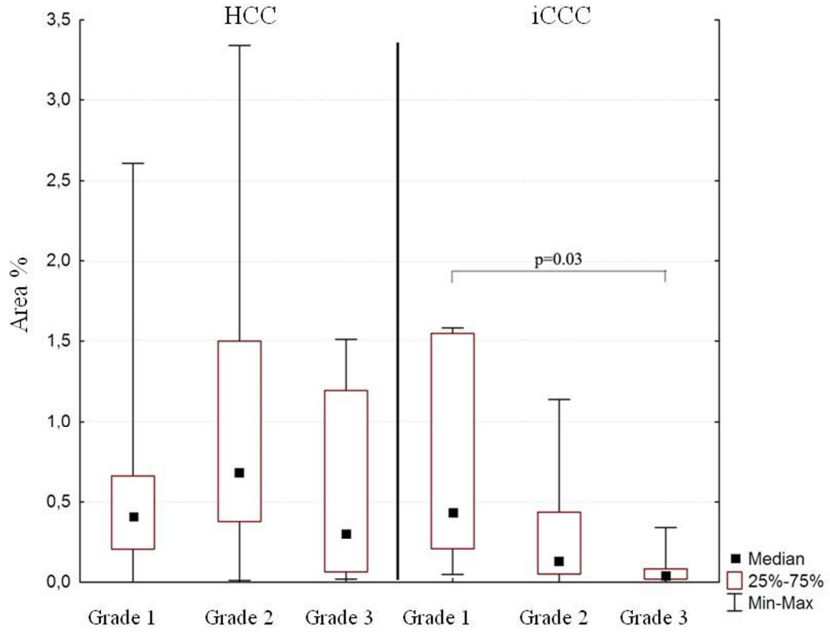
59. ábra FLC, konvencionális HCC, CCC és normál májszövet immunhisztokáémiával detektált TRIC expressziójának morfometriai elemzése. A normál májszövethez képest a tumorokban, így a fibrolamellaris carcinomában (FLC), konvencionális HCC-ben (cHCC), valamint a cholangiocarcinoma (CCC) csoportban szignifikánsan alacsonyabb (* p<0.05, ** p<0.01) TRIC expressziót észleltünk.Patonai A, Erdélyi-Belle B, Korompay A et al. Claudins and tricellulin in fibrolamellar hepatocellular carcinoma. Virchows Arch. 2011;458(6):679-88.

A jóval nagyobb esetszámon elvégzett vizsgálatok eredményeinek morfometriai kiértékelése nem mutatott szignifikáns különbséget a normál májszövet, a cirrhotikus máj és a primer májdaganatok (HCC, iCCC) tricellulin-expressziójában (Somoracz,2014) (60. ábra). Azonban a HCC-k közel felében a normál májszövet tricellulin-expressziójának kétszerese volt mérhető, egyes HCC-kben kifejezetten erős tricellulin festődést tapasztaltunk. A HCC-k és az iCCC-k vizsgálata során sem a daganat differenciáltsága, sem a tumor mérete, vagy a betegek életkora között nem mutatkozott statisztikai összefüggés. Az intrahepatikus cholangiocarcinomák elemzése azt mutatta, hogy ezek a

tumorok a HCC-hez képest szignifikánsan csökkent tricellulin expressziót mutatnak. Ellentétben a hepatocelluláris carcinomával a tricellulin expressziója az iCCC tumorokon belül a pancreas ductalis carcinomákhoz hasonlóan a tumor dedifferenciáltságával is szignifikáns összefüggést mutatott. A rosszul differenciált grade 3-s tumorok tricellulin fehérje expressziója kifejezetten csökkent a grade 1-s, jól differenciált tumorokhoz képest ($p < 0,05$; 61. ábra).

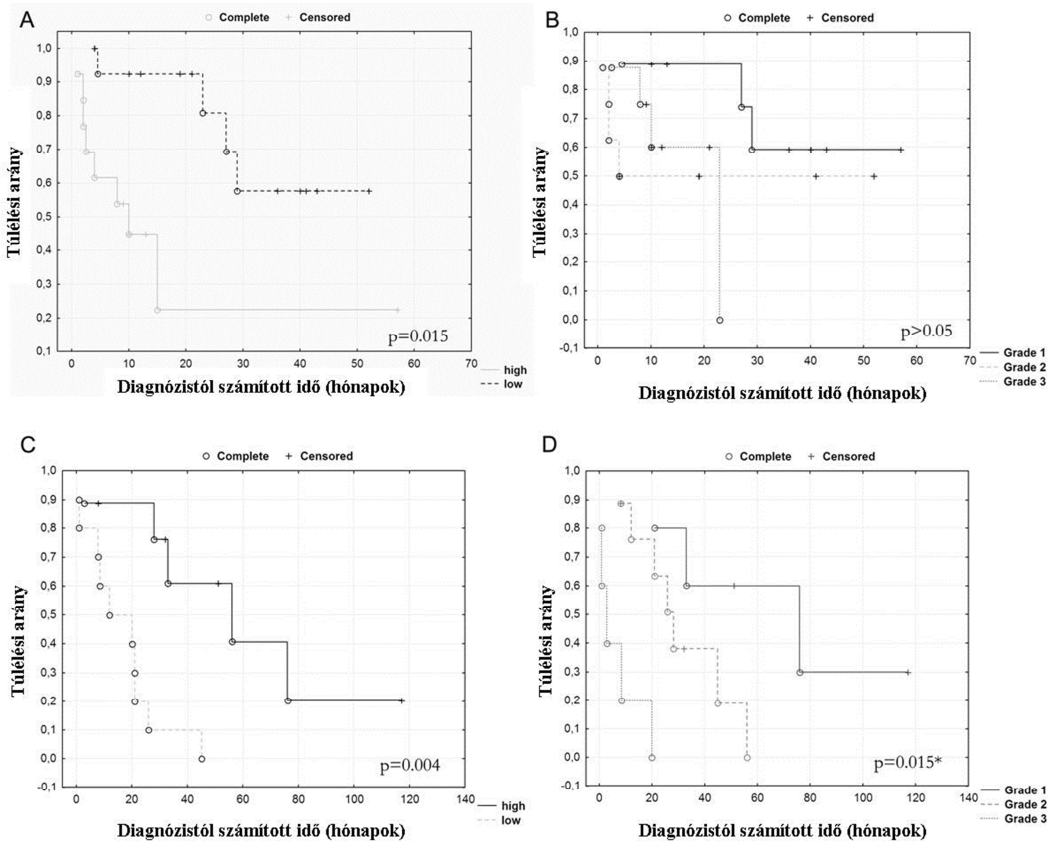


60. ábra A tricellulin immunhisztokémiai vizsgálatok morfometriai elemzése normál májban, cirrhosisban, HCC-ben és iCCC-ben. A normál májhoz képest a többi vizsgált csoport tricellulin fehérje expressziója nem mutatott szignifikáns különbségeket, azonban az iCCC-ben a HCC-hez képest szignifikánsan csökkent a TRIC festődés mértéke (Mann-Whitney U-teszt). CTL: kontroll máj; CIR: cirrhosis; HCC: hepatocelluláris carcinoma; iCCC: intrahepatikus cholnagiocellularis carcinoma. Somorácz A, Korompay A, Törzsök P et al. Tricellulin expression and its prognostic significance in primary liver carcinomas. Pathol Oncol Res. 2014 Oct;20(4):755-64.



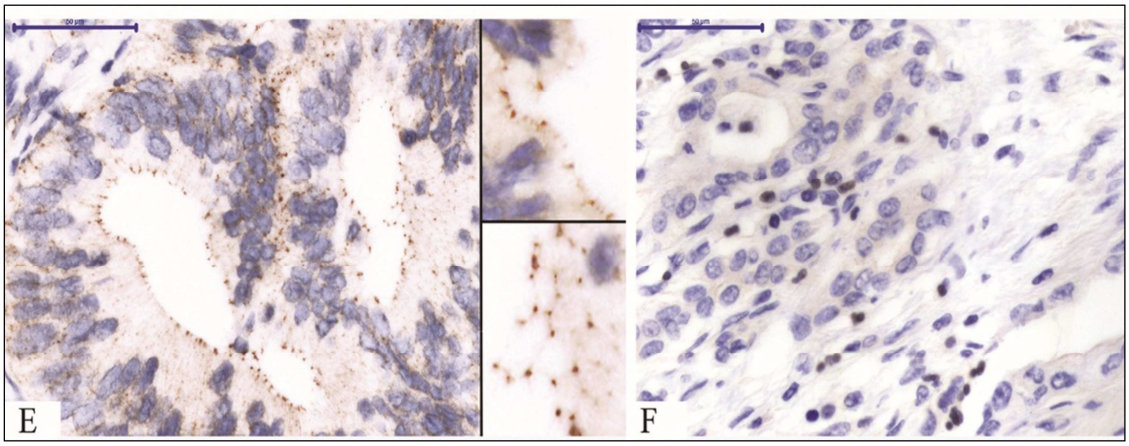
61. ábra Tricellulin immunhisztokémiai reakció morfometriai elemzése különböző differenciáltságú hepatocellularis és intrahepatikus cholangiocarcinomában. Az eltérő differenciáltságú HCC-csoportok tricellulin expressziójában nem találtunk szignifikáns különbséget, míg a rosszul differenciált, grade 3-s cholangiocarcinomák a TRIC fehérje szignifikáns csökkenését mutatták a jól differenciúlt grade 1-s csoport iCCC-ihez képest (Mann-Whitney U-teszt). Somorácz A, Korompay A, Törzsök P et al. Tricellulin expression and its prognostic significance in primary liver carcinomas. Pathol Oncol Res. 2014 Oct;20(4):755-64.

A digitális morfometriai eredmények alapján a daganatcsoportokat a tricellulin expresszió medián értékét véve határnak a HCC-ket- és a cholangiocarcinomákat a tricellulin magasan expessząló „tricellulin-high” és alacsonyan expresszáló „tricellulin-low” alcsoportokra osztottuk. A Spearmen-féle rangkorrelációban a daganatok differenciáltságát, méretét és a betegek életkorát független tényezőnek tekintettük. A vizsgált tumoros betegek túlélésének vizsgálata során a Kaplan-Meier elemzés nem mutatott összefüggést a tumor differenciáltsága, mérete, a betegek életkora és a teljes túlélés között. A tricellulin fehérjét magasan expresszáló HCC-k esetében azonban a betegek teljes túlélési ideje szignifikánsan rövidebb volt ($p < 0,05$). A Cox-regresszió analízis a ’tricellulin-high’ – csoport szignifikánsan magasabb 3.12 (CI: 1,35-7,2; $p < 0,01$) kockázati arányát találta. A cholangiocarcinomák esetében a tricellulin fehérjét magasan expresszáló ’tricellulin high’-csoportjának túlélését szignifikánsan hosszabbnak találtuk az alacsonyan expresszáló ’tricellulin low’ csoporthoz képest ($p < 0,05$). Az iCCC-k differenciáltságával szignifikánsan csökkenő tricellulin-expresszió szignifikáns asszociációt mutatott a betegcsoportok egyre rosszabb túléléssel is ($p < 0,05$; 62. ábra).



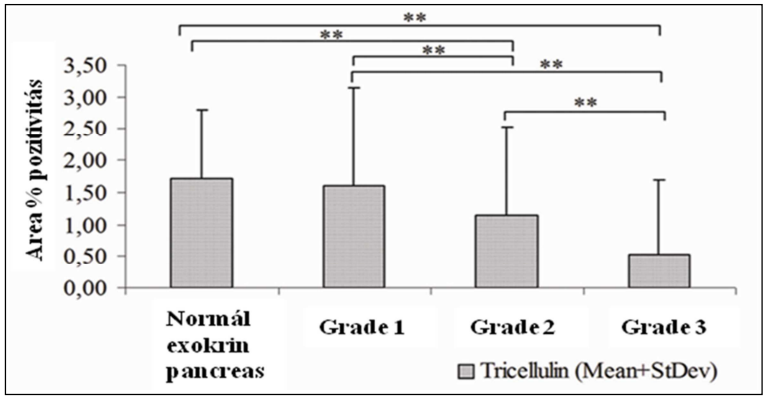
62. ábra A HCC és iCCC betegek túlélésének Kaplan-Meier elemzése a differenciáltság és a tricellulin expresszió függvényében. A HCC-ben a mgas tricellulin expresszió rosszabb prognózissal társult (A), míg ezen tumorok differenciáltsága nem mutatott összefüggést a túléléssel (B). Az intrahepatikus epeúti tumorok (iCCC) esetében a magas tricellulin fehérje expresszió jobb túléléssel asszociált, egyben a jól differenciált, grade 1-s daganatokkal bíró betegek - mely tumorok jellemzően magasabb tricellulin expressziót mutattak - szignifikánsan hosszabb túlélést mutattak (D). (Somoracz,2014)

A vizsgált 12 grade 1 differenciáltságú *pancreas ductalis adenocarcinomában*, a normál hasnyálmirigy ductus hámsejtjeiben észleltekhez hasonlóan a tricellulin IHK reakció a daganatsejtek luminális pólusán mutatott pontszerű pozitivitást (63. ábra, E). A normál pancreas ductusokhoz képest a jól differenciált ductalis pancreas daganatokban jelentősen kisebb mértékű lineáris immunpozitivitás volt detektálható. A vizsgált tumorokban a grade növekedésével, tehát a daganatok dedifferenciációjával párhuzamosan a tricellulin expressziójának kifejezett csökkenését tapasztaltuk. A morfometriai eredmények statisztikai elemzése (64. ábra) kimutatta, hogy a tricellulin termelődése a grade 2-s daganatokban szignifikáns csökkenést mutatott mind a normál pancreas ductusokhoz, mind pedig a grade 1-s tumorokhoz képest. A rosszul differenciált, grade 3-s adenocarcinomák hasonlóan szignifikánsan csökkent TRIC expressziót mutattak a normál hasnyálmirigy ductusokhoz és a jól differenciált, grade 1-s tumorokhoz és a grade 2-s, közepesen kiérett daganatokhoz képest is (63. ábra, F).

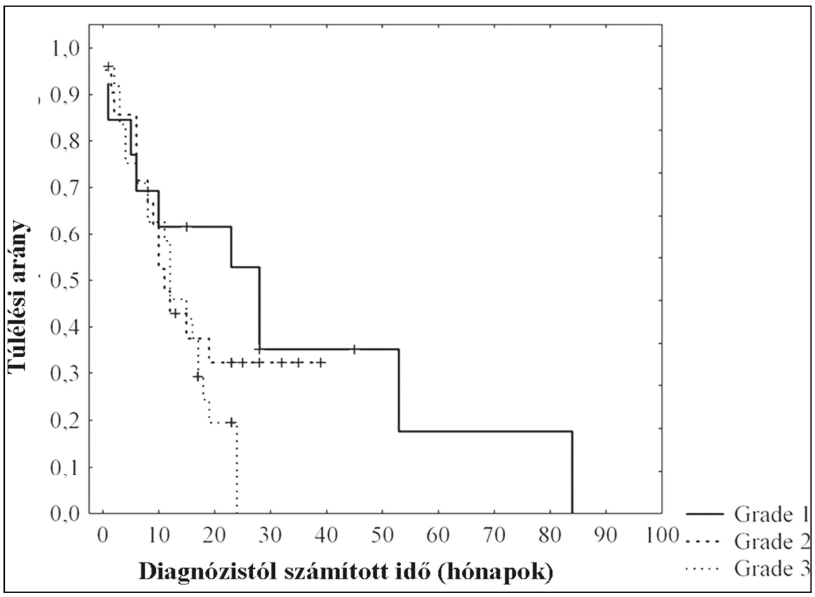


63. ábra Tricellulin expresszió pancreas ductalis adenocarcinomákban. E,: A jól differenciált, grade 1-s tumorokban a daganatsejtek tricelluláris találkozási pontjainak megfelelően erős, pontszerű festődés volt észlelhető (600x; képbetét: 1000x; méretjelölés: 30 µm); F: , A rosszul differenciált, grade 3-s pancreas ductalis adenocarcinomák szignifikánsan csökkent tricellulin reakciót adtak (600x; méretjelölés: 30 µm). Korompay A, Borka K, Lotz G et al. Tricellulin expression in normal and neoplastic human pancreas. Histopathology. 2012 May;60(6B):E76-86.

A túlélési vizsgálatok során Kaplan-Meier analízist végeztünk, mely szignifikáns összefüggést mutatott a ductalis adenocarcinomák differenciáltsága és a betegség túlélése között (p=0,02). Másfelől a tricellulin expresszió és a tumor differenciáltsága között tapasztalt szignifikáns összefüggések alapján a vizsgált fehérje expressziója és a túlélés mértéke között indirekt pozitiv összefüggés, korreláció mutatható ki (65. ábra).

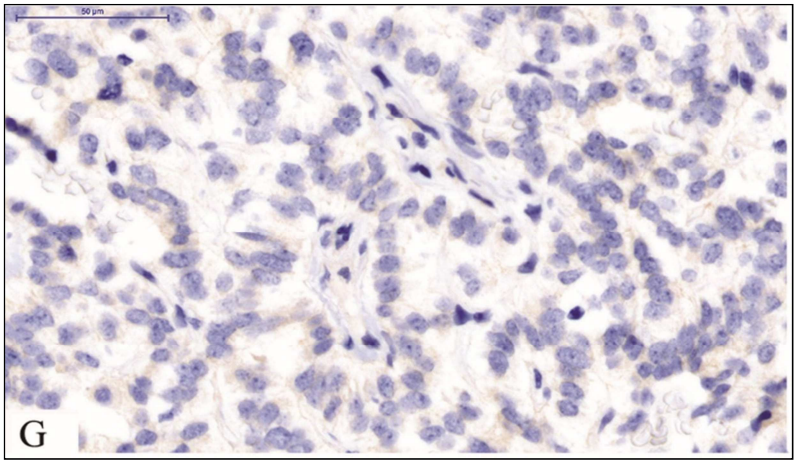


64. ábra A tricellulin immunreakciók eredményeinek morfometriai kiértékelése alapján a pozitivitás megoszlása a grade 1-s, grade 2-s és grade 3-s hasnyálmirigy ductalis adenocarcinomákban valamint normál exocrin pancreasban. Szignifikáns korreláció: ** = p< 0.01. Korompay A, Borka K, Lotz G et al. Tricellulin expression in normal and neoplastic human pancreas. Histopathology. 2012 May;60(6B):E76-86.



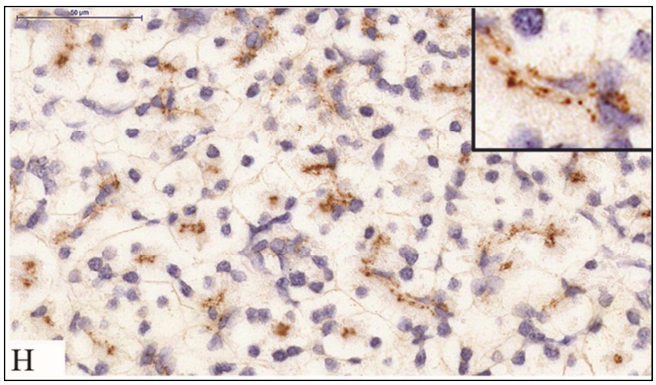
65. ábra Hasnyálmirigy ductalis adenocarcinomában szenvedő betegek túlélésének és a tricellulin fehérje expresszió mértékének összefüggése Kaplan-Meier elemzés alapján. A daganat differenciáltsága és a túlélési adatok között szignifikáns negatív korrelációt észleltünk (p=0.02). Korompay A, Borka K, Lotz G et al. Tricellulin expression in normal and neoplastic human pancreas. Histopathology. 2012 May;60(6B):E76-86.

A vizsgált 15 neuroendocrin hasnyálmirigy daganat uniform módon nem mutatott tricellulin immunpozitivitást (66. ábra). A TRIC negativitás - az immunfluoreszcens leletekhez hasonlóan - tehát független volt a pancreas endocrin tumorok differenciáltságának mértékétől.



66. ábra Tricellulin vizsgálata endocrin pancreasdaganatokban. G, A tricellulin fehérje a pancreas endokrin tumoraiban nem expresszálódik. (600x; méretjelölés: 30 µm). Korompay A, Borka K, Lotz G et al. Tricellulin expression in normal and neoplastic human pancreas. Histopathology. 2012 May;60(6B):E76-86.

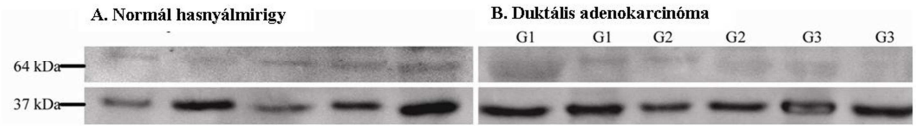
A pancreas ritka, acinussejtes daganataiban kifejezett, pontszerű immunreakció volt kimutatható az abortív, mirigyszerű struktúrákat képező daganatsejtek membránján, a sejtek apikális pólusában. (67. ábra).



67. ábra Acinussejtes carcinoma tricellulin expressziója. Kifejezett IHK pozitivitás a tumor abortív mirigyeinek acinussejtjeiben, a luminális póluson (600x; képbetét: 1000x ; méretjelölés: 30 µm). Korompay A, Borka K, Lotz G et al. Tricellulin expression in normal and neoplastic human pancreas. Histopathology. 2012 May;60(6B):E76-86.

IV.1.4.4. **Tricellulin fehérje expresszió vizsgálata Western blot analízissel normál hasnyálmirigyben és pancreas ductalis adenocarcinomában**

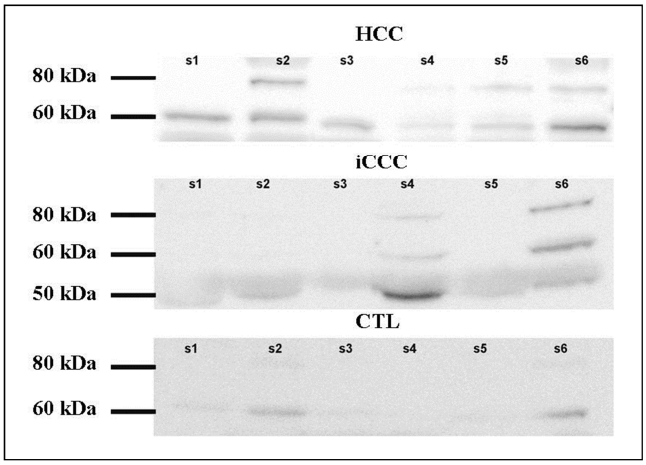
A Western-blot analízis mind a *normál hasnyálmirigyben*, mind pedig a *pancreas ductalis adenocarcinomában* kimutatta a tricellulin jelenlétét. A pozitív jelölődése mindkét szövetben 64kDa molsúlyú fehérjét jelzett (68. ábra). A normál pancreas minták mindegyike mérsékelt intenzitású jelet adott (A), míg a pancreas tumorokban a dedifferenciációval párhuzamosan, tehát a daganatok grade-jének emelkedésével fordítottan csökkenő jelsávokat észleltünk (B).



68. ábra A tricellulin fehérje kimutatása normál pancreasban és pancreas ductalis adenocarcinomában Western-blottal. A, A normál pancreasban mérsékelt intenzitású sávok láthatóak B, A tumorok grade-jének emelkedésével párhuzamosan csökkenő

intenzitású tricellulin jelölődés. Kontroll fehérjeként a GAPDH-t választottuk, mely 37 kDa molsúlynál, az irodalmi adatoknak megfelelően adott pozitív jelölődést, míg a tricellulin 64kDa molsúlynál volt kimutatható. Korompay A, Borka K, Lotz G et al. Tricellulin expression in normal and neoplastic human pancreas. Histopathology. 2012 May;60(6B):E76-86.

A normál májmintákban a Western blot 60 kDa molsúlynál jelzett specifikus tricellulin fehérjét. Hasonló méretnél, 60 kDa közelében észleltünk az antitest bekötődését az összes vizsgált hepatocelluláris carcinomában, azonban érdekes módon a minták mintegy kétharmadában egy nagyobb molsúlyú, 80 kDa-s pozitív jelölődés is látható volt. A vizsgált epeúti tumorok egyharmadában, döntően a jól differenciált tumorokban mutattuk ki a tricellulin jelenlétét, ahol a HCC mintákhoz hasonlóan a cholangiocarcinomák esetében is észlehető volt egy nagyobb, 80 kDa körüli mérettel rendelkező fehérjét jelző sáv. emellett az iCCC-kben egy 50 kDa körüli specifikus termék is azonosítható volt (69. ábra).

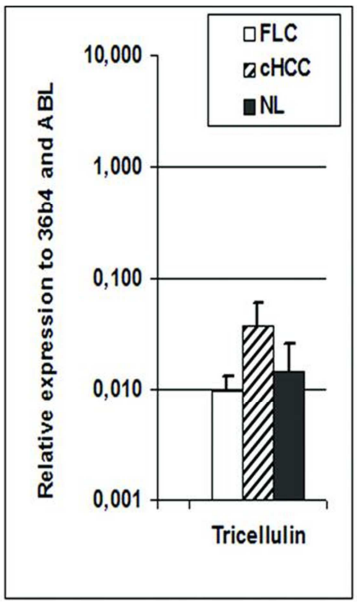


69. ábra Western-blot elemzés eredményei normál májban, HCC-ben és iCCC-ben. A HCC minták mindegyikében kimutatható volt 60 kDa egy specifikus sáv, emellett néhány minta esetében 80 kDa molsúlynál is észlelhető volt jelölődés. Az iCCC-kben a HCC-khez hasonló eredményeket kaptunk, de ezen tumorokban 50 kDa körüli mérettartományban is azonosítottunk tricellulin jelölődést. Somorácz A, Korompay A, Törzsök P et al. Tricellulin expression and its prognostic significance in primary liver carcinomas. Pathol Oncol Res. 2014 Oct;20(4):755-64.

IV.1.4.5. Tricellulin mRNS expresszió detektálása real time RT-PCR módszerrel normál májban és a máj primer malignus daganataiban, valamint normál pancreasban és pancreas ductalis carcinomában

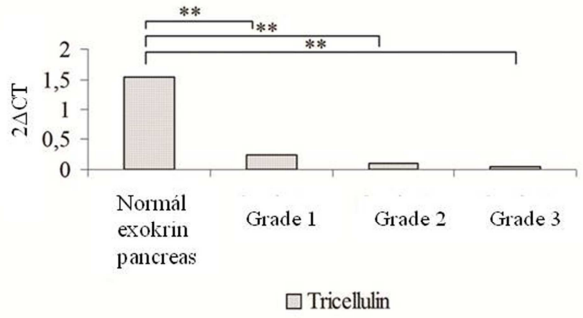
A *primer májrákok* körében a tricellulin mRNS-expresszió a normál májhoz képest emelkedett volt: a legmagasabb a konvencionális HCC-csoportban, míg az FLC-ben a TRIC mRNS termelődés a HCC-hez képest alacsonyabb volt, de a csoportok közti különbségek nem bizonyultak szignifikánsnak (70. ábra).

dc_1040_15



70. ábra Tricellulin-mRNS relatív expressziójának ábrázolása normál májban és konvencionális HCC-ben, valamint FLC-ben kvantitatív valós idejű RT-PCR módszerrel. FLC: fibrolamellaris carcinoma, cHCC: konvencionális hepatocelluláris carcinoma, NL: normál máj. Patonai A, Erdélyi-Belle B, Korompay A et al. Claudins and tricellulin in fibrolamellar hepatocellular carcinoma. Virchows Arch. 2011 Jun;458(6):679-88.

A pancreas carcinomák esetében a tricellulin-mRNS relatív expressziójának mérését kvantitatív valós idejű RT-PCR vizsgálatokkal végeztük. Normál pancerashoz képest a tricellulin mRNS expressziója mind a jól differencilt grade-1-s (p=0,0002), mind a közepesen differenciált grade-2-s (p=0,0001), mind pedig a rosszul differenciált grade-3-s ductalis adenocarcinomákban (p=0,0002) szignifikánsan csökkent volt. A pancreas tumorok különböző differenciáltságú csoportjai között nem volt szignifikáns különbség a tricellulin mRNS expresszióban. Mindazonáltal a tumor grade növekedésével egyértelmű csökkenés látszott az mRNS termelődésben: a grade-3-s csoport tumormintái a grade-1-s és a grade-2-s daganatokhoz képest, míg a grade-2-s tumorok a jól differenciált, grade-1-s adenocarcinomákhoz képest csökkenő tricellulin mRNS expressziót mutattak (71. ábra).



71. ábra Tricellulin-mRNS relatív expressziójának ábrázolása normál pancreasban és pancreas ductalis adenocarcinomában kvantitatív valós idejű RT-PCR módszerrel. A vizsgált normál pancreasszövethez képest szignifikánsan alacsonyabb tricellulin-mRNS detektálható a különböző differenciáltságú duktális adenocarcinomákban. Jól látható, a daganatok grádusának emelkedésével a tricellulin-mRNS expressziója csökkenő tendenciát mutat. Szignifikanciahatár: ** = p < 0.01. Korompay A, Borka K, Lotz G et al. Tricellulin expression in normal and neoplastic human pancreas. Histopathology. 2012 May;60(6B):E76-86.

IV.1.5. Claudin és tricellulin expresszió hepatoblastomában

IV.1.5.1. Claudin expresszió vizsgálata human hepatoblastomában

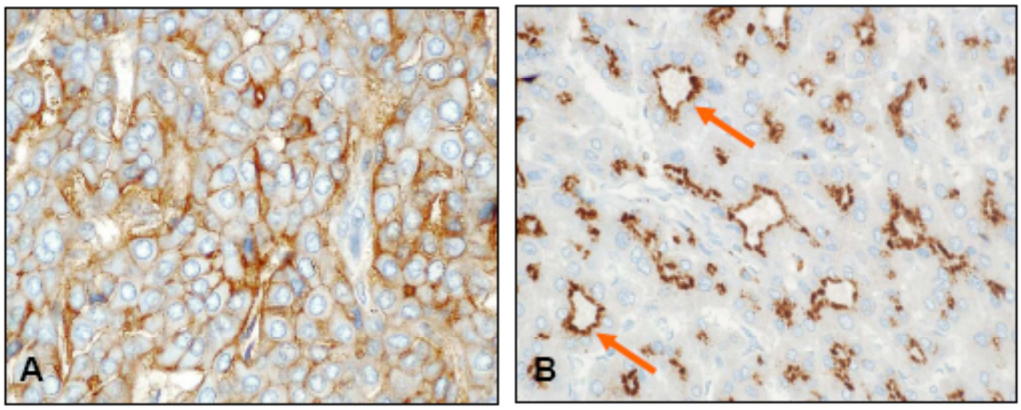
Általános kérdésünk volt, hogy jellemzi-e a TJ mintázat a hepatoblastomák különböző altípusait és mutat-e összefüggést a klinikai paraméterekkel ? Egyfelől arra kerestünk választ, hogy a claudinok mRNS és fehérje szintű expressziós mintázata, valamint az újonnan felfedezett tight junction fehérje, a tricellulin mutatnak-e jellegzetes eltéréseket a hepatoblastoma különböző differenciáltságú két epitheliális komponensében? Található-e prognosztikus, illetve prediktív összefüggés az immunhisztokémiai vizsgálatokkal kapott eredmények és a klinikai adatok között, különös tekintettel a túlélésre?

CLDN-1, -2, -3, -4 és -7 fehérje expresszió vizsgálatata a tumormentes, környező májban:

A *CLDN-1* reakció lineáris membránpozitivitása legkifejezettebben az epeúti hámsejtekben volt detektálható, a sejtek lumináris pólusán erősebb expresszióval. A hepatocyták a lumináris (apikális) póluson adtak gyenge membranózus reakciót. A *CLDN-2* granuláris, citoplazmatikus festődése mind a hepatocyták többségében, mind az epeúti sejtjekben kimutatható volt. A *CLDN-3, CLDN-4* és *CLDN-7* IHK reakciók lineáris membránpozitivitása az epeúti hámsejtekben mutatkozott, erősebb festődéssel a lumináris pólusokon. Ezen claudinok a hepatocyták többségén nem volt kimutatható. Helyenként igen gyenge expresszió a hepatocyták a lumináris (apikális) pólusán volt látható.

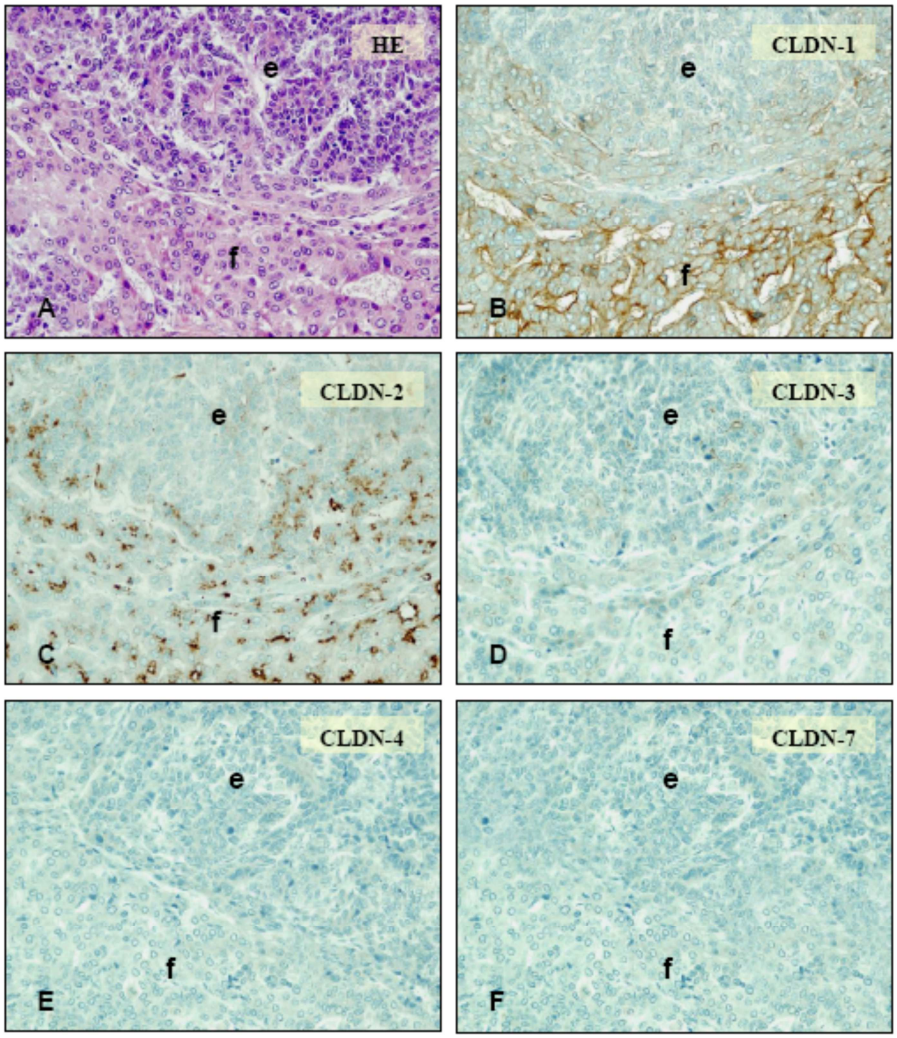
CLDN-1, -2, -3, -4 és -7 fehérje expresszió vizsgálatata hepatoblastoma mintákban

A *CLDN-1* és a *CLDN-2* fehérjék fokozott expressziója volt megfigyelhető a daganat epithelialis (fetalis/embryonalis) komponenseiben. A normál májban tapasztalthoz hasonlóan az IHK reakció a CLDN-1 esetében membranózus és lineáris, míg a CLDN-2 esetében citoplazmatikus és granuláris volt. A *CLDN-1* a *fetalis* komponensben erős membranózus IHK reakciót adott, csaknem a tumorsejtek teljes kerületén, ezáltal „lépesmézszerű” mintázat alakult ki. (72. ábra). Az *embryonalis* komponens néhány elszórtan, gyenge pozitivitást mutató sejttől eltekintve negatív volt. A *CLDN-2* a *fetalis* részben erős citoplazmatikus és granuláris festődést mutatott, mely jellemzően a pszeudorozetták (acináris struktúrák) luminalis (apikális) pólusára lokalizálódott (72. ábra). Az *embryonalis* komponens negatív volt, csak elszórtan volt észlelhető egyes sejtek gyenge pozitivitása. A *CLDN-3* expresszió lényegileg a tumor mindkét komponensében negatív volt, csak elvétve mutatkozott a fetalis kompartment egyes acináris struktúráiban gyenge apikális pozitivitás. A *CLDN-4 és a CLDN-7* expresszió a tumor mindkét komponensében negatív volt.



72. ábra A: CLDN-1 IHK reakció membranózus pozitivitás fetalis komponensben. B: CLDN-2 IHK reakció citoplazmatikus, granuláris expressziója a fetalis komponensben. A nyíl a daganatsejtek által alkotott pszeudorozetták (acináris struktúrák) luminális (apikális) pólusát jelöli (A-B: 600x).

A fetalis és embryonalis komponensek claudin fehérjeexpressziós mintázatát a 73. ábra szemlélteti.



73. ábra A CLDN-1, -2, -3, -4 és -7 fehérjék expressziója a hepatoblastoma fetalis és embryonalis komponensében. A hepatoblastoma fetalis és embryonalis komponense hematoxilin-eosin (H&E) festéssel Az embryonalis komponens (A). A CLDN-1 reakcióval (B) a fetalis komponens erős pozitivitása mellett az embryonális komponens negatív. A granuláris és citoplazmatikus CLDN-2 reakció pzitivitása (C) a komponensekben a CLDN-1-hez hasonló különbségeket mutat a komponensek között. A CLDN-3 (D), CLDN-4 (E) és CLDN-7 (F) reakciók a hepatoblastoma mindkét epitheliális komponensében negatívak. (A-F: 400x) (f) fetális komponens, (e) embryonalis komponens.

Az immunhisztokémiai vizsgálatokat statisztikai elemzését Mann-Whitney U teszt segítségével végeztük, az eredményeket a 15. táblázat mutatja be.

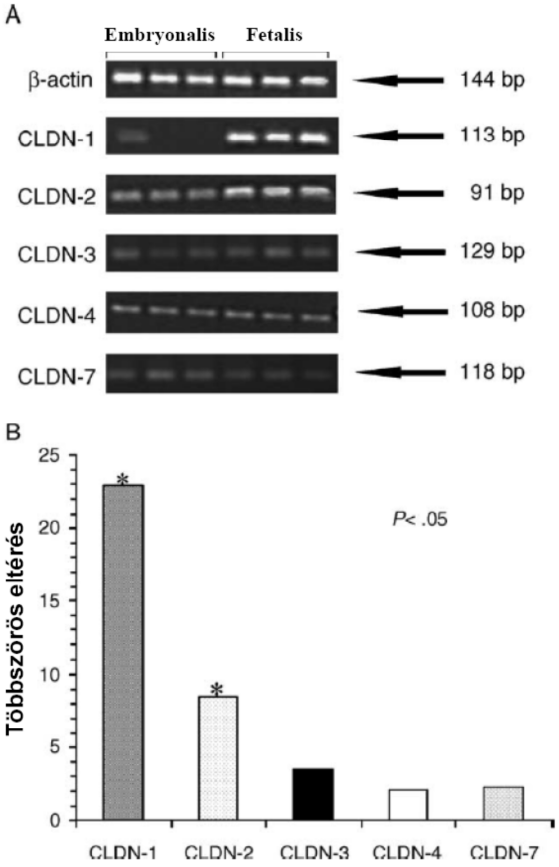
15. táblázat A CLDN-1, -2, -3, -4 és -7 IHK vizsgálatok szemikvantitatív kiértékelése és statisztikai elemzése a hepatoblastoma fetalis és embryonalis komponensében. Az értékek a claudin expresszió középértékét ± standard hibát (mean ± S.E.) mutatják. CLDN: claudin; P: szignifikancia (P<0,05), NS: nem szignifikáns (Mann-Whitney U teszt).

	Embryonalis komponens	Fetalis komponens	P
CLDN-1	0,6 ± 0,2	4,2 ± 0,4	0,0008
CLDN-2	0,6 ± 0,2	4,4 ± 0,3	0,0005
CLDN-3	0,5 ± 0,5	0,6 ± 0,4	NS
CLDN-4	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	NS
CLDN-7	0,4 ± 0,4	0,5 ± 0,3	NS

CLDN-1, -2, -3, -4 és -7 mRNS expressziójának vizsgálata real time RT PCR-el human hepatoblastoma fetalis és embryonalis komponenseiben

A kiválasztott öt hepatoblastoma eset paraffinos blokkjaiból a fetalis és embryonalis komponensek szövetét makrodisszekcióval nyertük ki, és RNS izolálást követően real time RT-PCR-el vizsgáltuk ezen epitheliális komponensekben az mRNS expressziót. Az mRNS expressziós értékek jól korreláltak az IHK eredményekkel. A CLDN-1 mRNS expresszió szignifikánsan magasabb volt a fetalis komponensben az embryonalis komponenshez képest (23-szoros változás; P = 0,001). A CLDN-2 esetében szintén a fetális komponens mutatott magasabb expressziót (8,5-szörös változás; P = 0,001). A CLDN-3, -4 és -7 mRNS expresszió (3,5, 2- és 2,2-szeres eltérés) nem mutatott szignifikáns különbséget a két komponens között, bár a fetalis komponensben magasabb mRNS expresszió volt észlelhető **(**74. ábra).

dc_1040_15

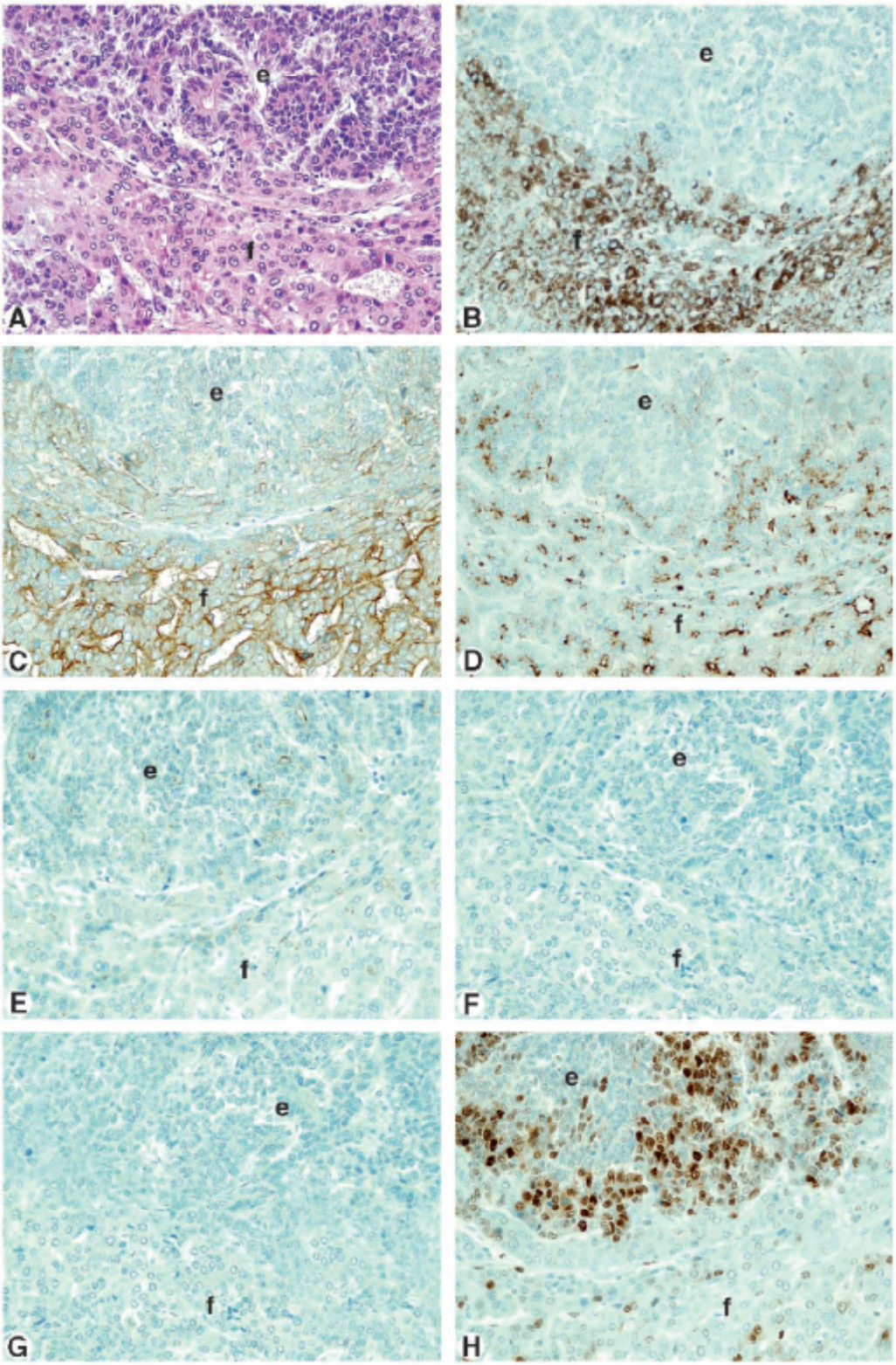


74. ábra A: A real time RT-PCR termékek 2 %-os agaróz gélen vizsgált elektroforézise. A CLDN-1 és CLDN-2 esetében szignifikánsan nagyobb mRNS expresszió látható a fetalis komponensben. B: CLDN-1, -2, -3, -4 és -7 mRNS expresszió fold change (többszörös) különbsége a fetalis komponensben az embryonalishoz képest. (* szignifikáns különbség, P<0,05).

Proliferációs (Ki-67, PCNA) és egyéb markerek (HSA, CK-7, β-CATENIN, EZH-2) vizsgálata humán hepatoblastomában immunhisztokémiai módszerekkel

Claudin, HSA és proliferációs markerek expressziójának immunhisztokémiai vizsgálata: A HSA a fetalis komponensben erős citoplazmatikus pozitívitást mutat, míg az embryonalis komponensben nem észlelhető pozitivitás (75. ábra B.) A CLDN-1 és -2 fehérjék fokozottan expresszálódtak a HB-nak mind a fetalis, mind pedig az embryonalis epitheliális komponenseiben. A CLDN-1 immunhisztokémiai reakció membranózus, lineáris volt, mely „lépesmézszerű" megjelenést adott, míg a CLDN-2 esetében citoplazmatikus, granuláris, perimembranosus reakciót tapasztaltunk. A CLDN-1 (75. ábra C.) és a CLDN-2 (75. ábra D.) reakciók a hepatoblastoma fetalis komponensében egyértelműen erősebb fehérje expressziót jeleztek a szórványos pozitivitástól eltekintve negatív embryonalis komponenshez képest. A fetalis komponensben claudin-1 és -2 pozitivitás típusosan a pszeudorozetták luminalis, vagy más néven apikális pólusán volt kimutatható. A CLDN-3 (75. ábra E.), -4(75. ábra F.) és -7 (75. ábra G.) immunhisztokémiai reakció lényegileg mindkét epitheliális szubtípusban negatív volt. A Ki-67 magi pozitivitás az embryonalis komponensben jóval gyakoribb a fetalis komponenshez viszonyítva, és a proliferációs

marker PCNA (75. ábra H.) szintén fokozottabban expresszálódott az embryonalis komponensben. A **CK-7** reakció a tumor mindkét komponensében negatív volt.



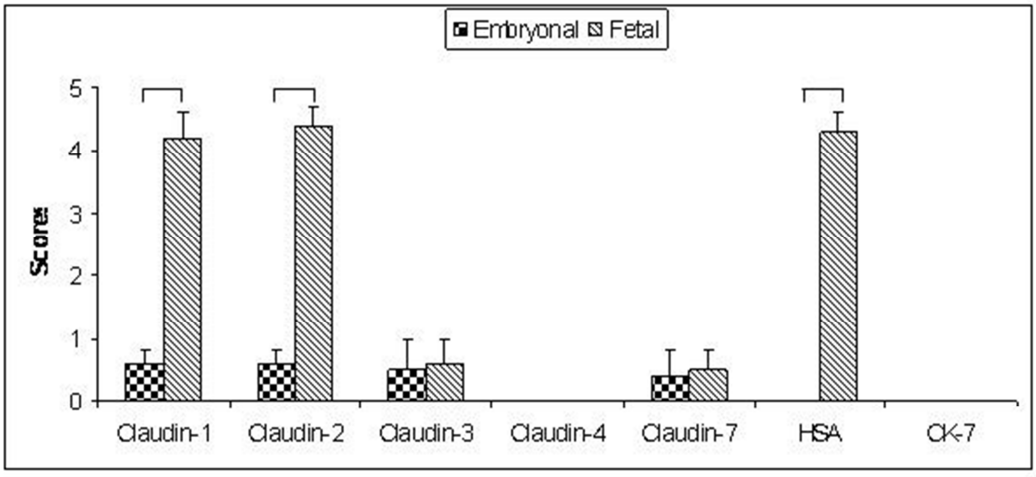
75. ábra Claudin, HSA és PCNA immunhisztokémiai reakciók hepatoblastomában. 8(A), hematoxilin/eosin festés. A HSA (B) és a CLDN-1 (C) és -2 (D) immunhisztokémiai reakciók pozitvitást mutatnak mind a fetalis, mind az embryonalis sejtekbens. A CLDN-3 (E), -4 (F), és -7 (G) immunhisztokémiai reakciók mindkét altípusban negatívnak bizonyultak. (H) PCNA immunhisztokémiai reakció (H) (nagyítás: 400X). e: embryonalis ; f, fetalis.

Az IHK reakciók statisztikai analízisét a Mann-Whitney U teszt segítségével végeztük el. A fetalis komponens az embyonalis komponenshez képest a claudin-1 és claudin-2 fehérjét szignifikánsan magasabb mértékben expresszálta. Az eredményeket a 16. táblázat és a 76. ábra szemlélteti.

16. táblázat A HSA, CK-7, PCNA és Ki-67 IHK vizsgálatok szemikvantitatív kiértékelése a hepatoblastoma fetalis és embryonalis komponensében. A táblázat értékei a HSA, CK-7, PCNA és Ki-67 expresszió középértékét ± standard hibát (mean ± S.E.) mutatják; p: szignifikancia (P<0,05), NS: nem szignifikáns (Mann-Whitney U teszt) Ki-67 és PCNA a vizsgálat tumorsejtek %-ában számolva.

	Embryonal komponens	Fetalis komponens	P
HSA	0.0 ± 0.0	4.3 ± 0.3	0.0018
CK-7	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	NS
PCNA %	86.8 ± 4.1	67.3 ± 4.7	0.013
Ki-67 %	10.7 ± 2.7	4.1 ± 0.6	0.0312

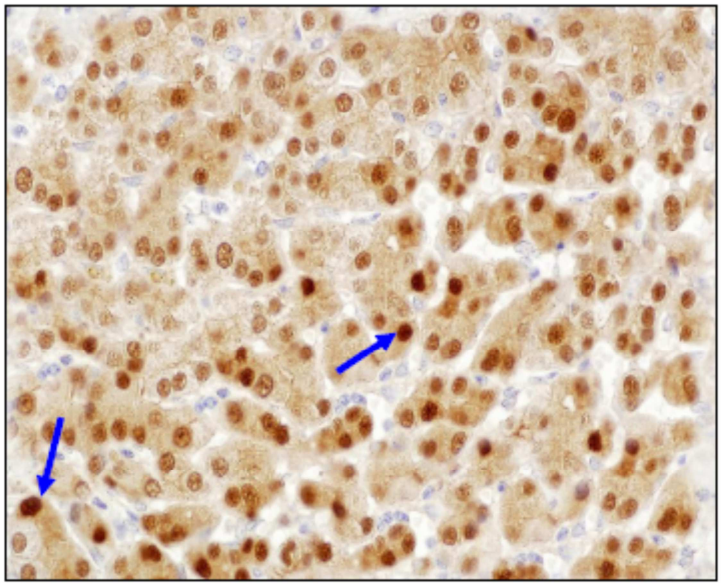
Az immunhisztokémiai vizsgálatok eredményének grafikus ábrázolása **(**76. ábra**).**



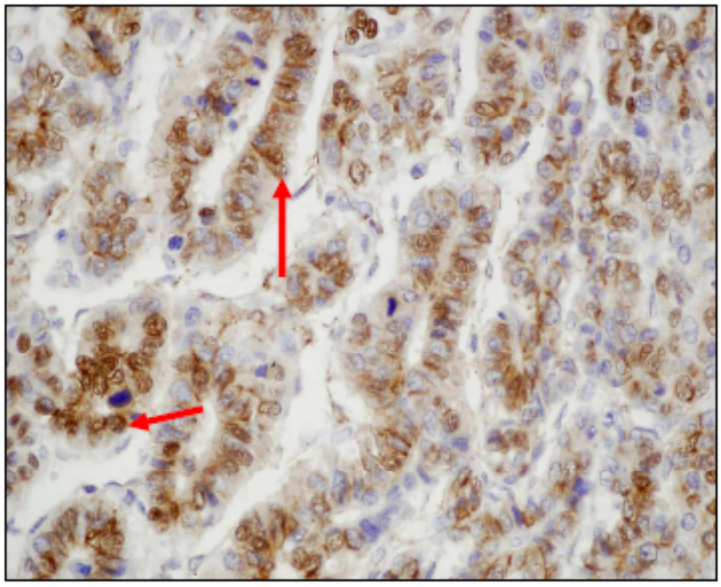
76. ábra CLDN-1, -2, -3, -4, -7, HSA és CK-7 IHK reakciók szemikvantitatív kiértékelésének ábrázolása a hepatoblastoma fetalis és embryonalis komponensében a kiértékeléshez használt pontértékek függvényében. A CLDN-1, CLDN-2 és HSA pozitivitás a hepatoblastoma fetalis komponensében szignifikánsan magasabb, mint az embryonalis komponensben. *: szignifikáns eltérés (P<0,05)

A vizsgált 14 hepatoblastoma esetből 13-ban β-catenin citoplazmatikus/**magi** festődés kimutatható. A fetalis 9/14, míg az embryonalis komponensek 6/9 esetben mutattak citoplazmatikus/**magi** pozitivitást (77. ábra és 78. ábra). A két epitheliális komponens között a β-catenin pozitivitásban nem volt szignifikáns különbség (17. táblázat).

dc_1040_15



77. ábra β-catenin fehérjeexpresszió a hepatoblastoma fetalis komponensében. Citoplazmatikus és magi reakció (nyílak) egyaránt látható a tumorsejtekben (400x).

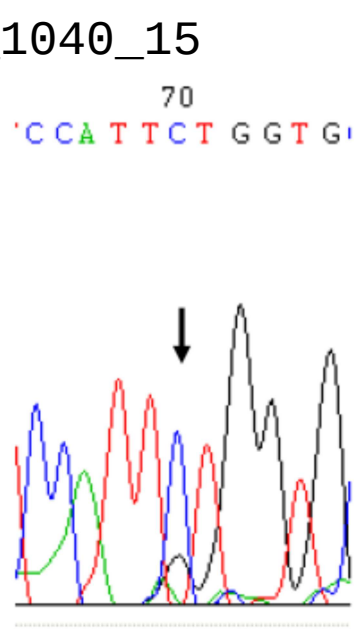


78. ábra β-catenin fehérjeexpresszió a hepatoblastoma embryonalis komponensében. Magi és citoplazmatikus festődés (nyíl) egyaránt látható a tumorsejtekben (400x).

17. táblázat A β-cateninnel végzett IHK vizsgálatok szemikvantitatív kiértékelése és statisztikai elemzése human hepatoblastoma fetalis és embryonalis komponensében. Az értékek a β-catenin expresszió középértékét ± standard hibát (mean ± S.E.) mutatják. P: szignifikancia (P<0,05), NS: nem szignifikáns (Mann-Whitney U teszt).

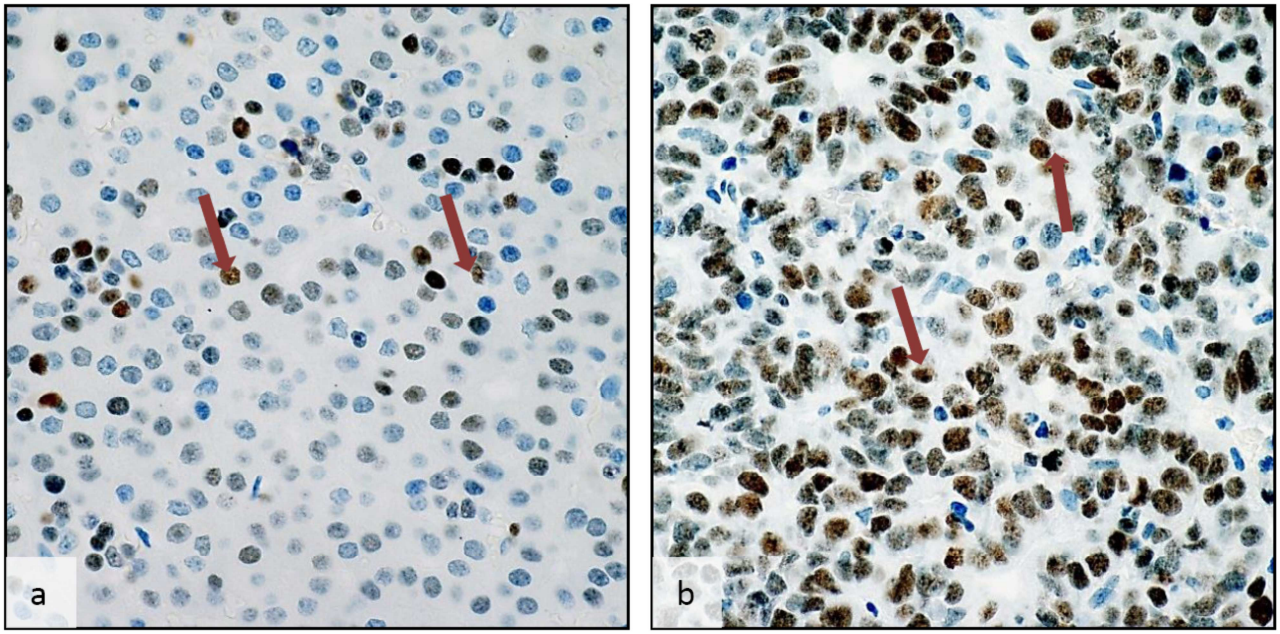
	Embryonalis	Fetalis	P
β-catenin	63,2±17,2	51,7±13,3	NS

A β-catenin gén mutációjának vizsgálata: Négy darab fetalis és embryonalis komponenst egyaránt tartalmazó mintában a makrodisszekált mintákból izolált DNS szekvenálása mind a fetalis mind az embryonalis komponensben egy-egy esetben mutatott missens mutációt a β-catenin génben. Mindkét szomatikus mutáció a 3. exon 37-es kodonjában jött létre, ahol a *TCT→TGT* váltás egy *szerin→cisztein* cserét eredményezett **(**79. ábra**).**



79. ábra A β-catenin mutáció analízis szekvenogramja. A mutáció a TCT kodonban citozin guanin cserét eredményezett. A mutációs pozíciót a kék színű görbével átfedésben lévő fekete színű görbe megjelenése szemlélteti (nyíl).

EZH2 fehérje expresszió vizsgálata immunhisztokémiai módszerrel ép májban és humán hepatoblastomában: A *tumormentes májban* a hepatocyták és az epeutak nem adtak pozitív reakciót a vizsgált mintákban. A *hepatoblastomák* vizsgálata során magi EZH2 pozitivitás minden tumormintában (21 HB) kimutatható volt, mind az embryonális, mind a fetális sejtekben *(*80. *ábra)*. Mindkét altípusban közepesen erős, illetve nagyon kifejezett festődést észleltünk. A pozitív sejtek százalékos aránya és a reakció intenzitása egyaránt szignifikánsan magasabb volt az embryonális kompartmentben a fetális altípushoz képest (p= 0,047), azonban a normál májhoz képest mindkét HB szubtípus szignifikánsan magasabb expressziót mutatott a kiértékelés során (p< 0,001), 18. *táblázat*, 81. *ábra*.

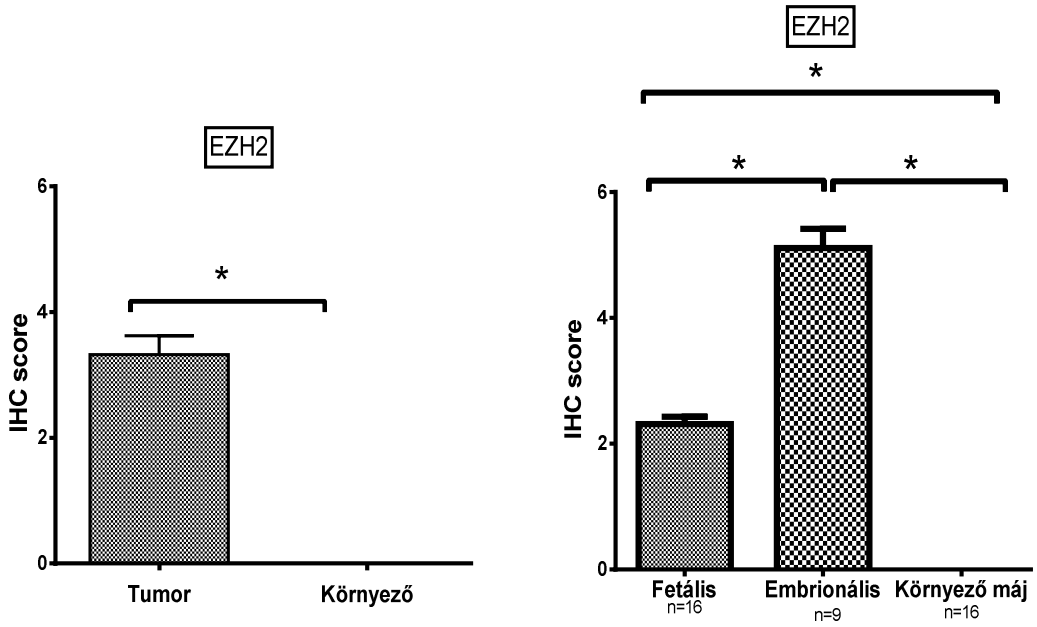


80. ábra EZH2 immunhisztokémiai reakció hepatoblastomaban. Mind a fetális (a), mind az embryonális (b) sejtek erőteljesen expresszálnak EZH2 fehérjét (600x).

18. táblázat EZH2 immunreakció szemikvantitatív kiértékelése. A táblázatban az első három oszlop értékei a Kruskal-Wallis ANOVA teszttel, míg az utolsó oszlopban a Mann-Whitney U elemzéssel kapott szignifikancia értékeket (p értéket) mutatja. A szignifikánsan eltérő értékeket (p<0.05) vastag kiemelés mutatja. /vs= viszonyítva (versus)/

	Fetális vs embryonális	Fetális vs környező máj	Embryonális vs környező máj	Tumor vs környező máj
EZH2	**0,047**	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**

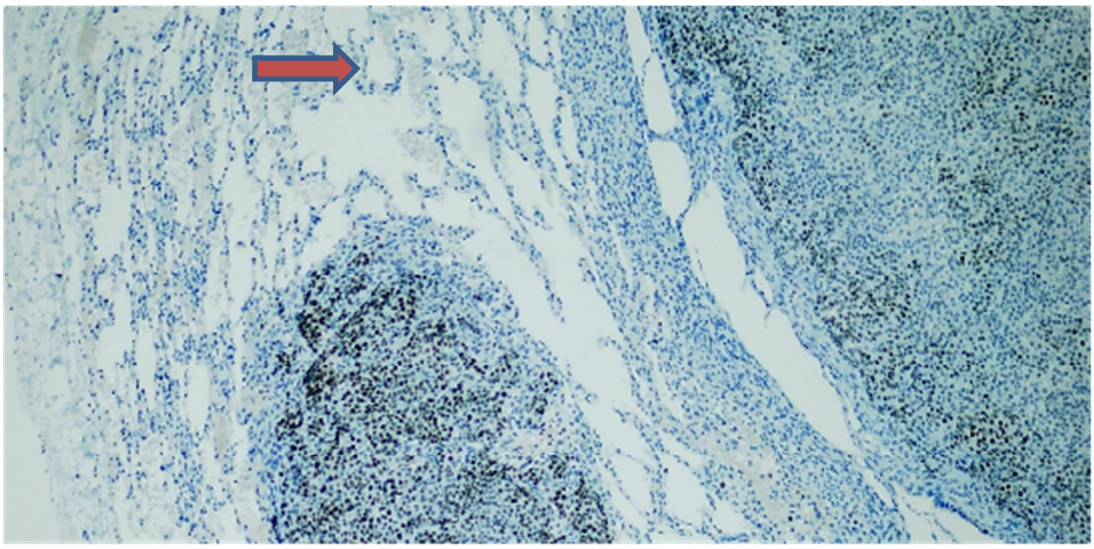
A vizsgált hepatoblastoma esetek EZH2 fehérje expressziójának IHC-val végzett elemzésének grafikus ábrázolását − a középérték és a standard hiba (SEM) megadásával − a 81. ábra mutatja.



81. ábra EZH2 fehérje expresszió vizsgálata a hepatoblastoma esetek fetális és embryonális komponenseiben szemikvantitatív immunhisztokémiai kiértékeléssel: a), a tumormentes, környező májban szignifikánsabb alacsonyabb (p< 0.001) pontértékeket kaptunk. b), Az embryonális komponens szignifikánsan magasabb expressziót (p= 0,047) mutatott a fetális komponenshez és a környező májhoz (p< 0.001) képest. A környező májhoz viszonyítva a fetális komponens is magasabb EZH2 expressziót mutatott (p <0.001). A * jelölés a csoportok közti szignifikáns különbséget jelzi.

Az egyik vizsgált eset *kevert* szubtípusú (embryonális/fetális) tüdő áttéte pozitív EZH2 reakciót mutatott *(*82. ábra*)*, *az* EZH2 elleni antitesttel, hasonlóan a primer tumorhoz.

dc_1040_15

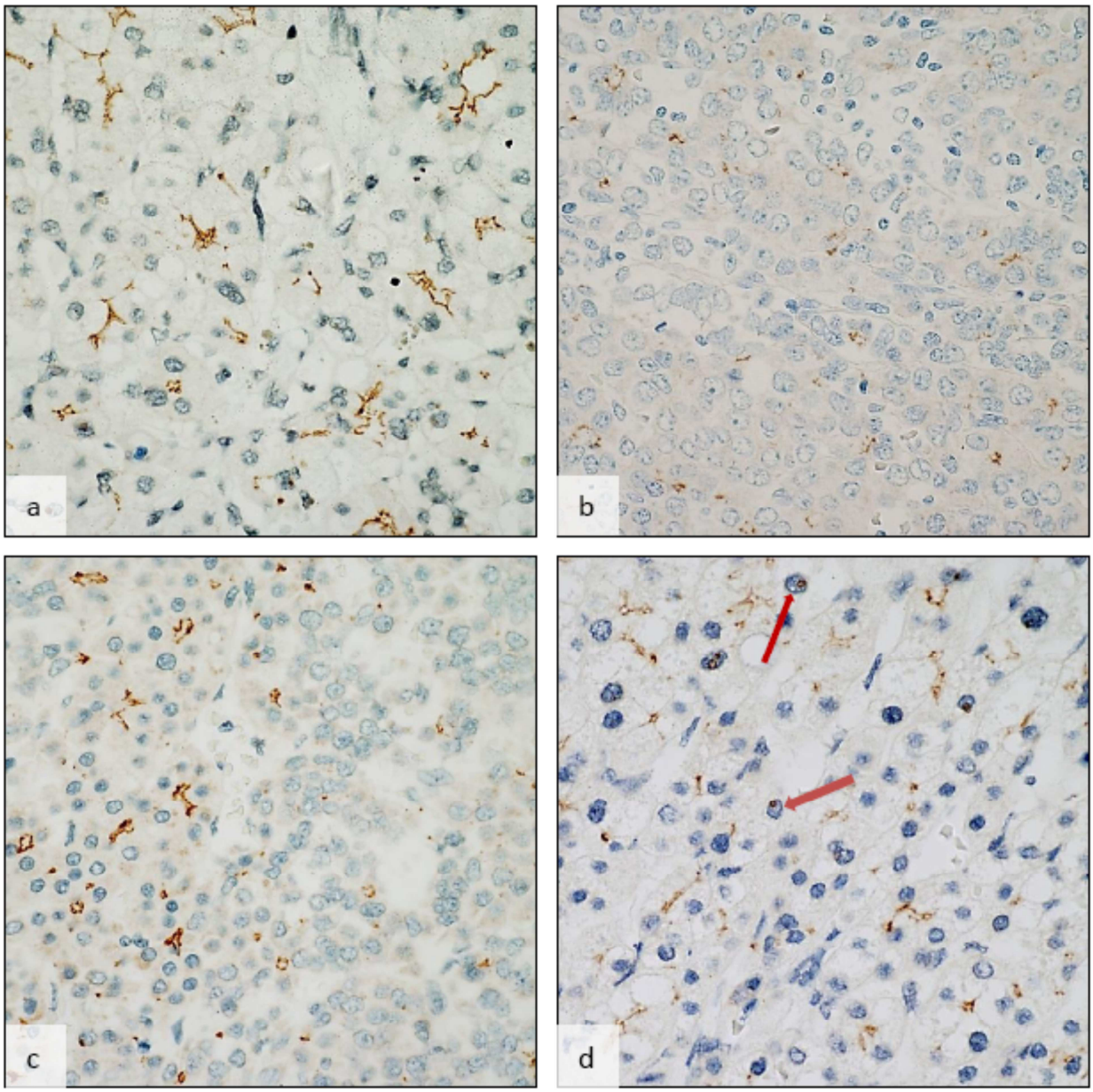


82. ábra EZH2 IHC reakció hepatoblastoma tüdő áttétben. Mind a fetális, mind az embryonális komponens sejtjei nagymértékben expresszálják a fehérjét. A nyíl a tüdőszövet alveolusait jelzi (100x).

IV.1.5.2. Tricellulin expresszió vizsgálata human hepatoblastomában

Tricellulin expresszió vizsgálata epitheliális hepatoblastomában

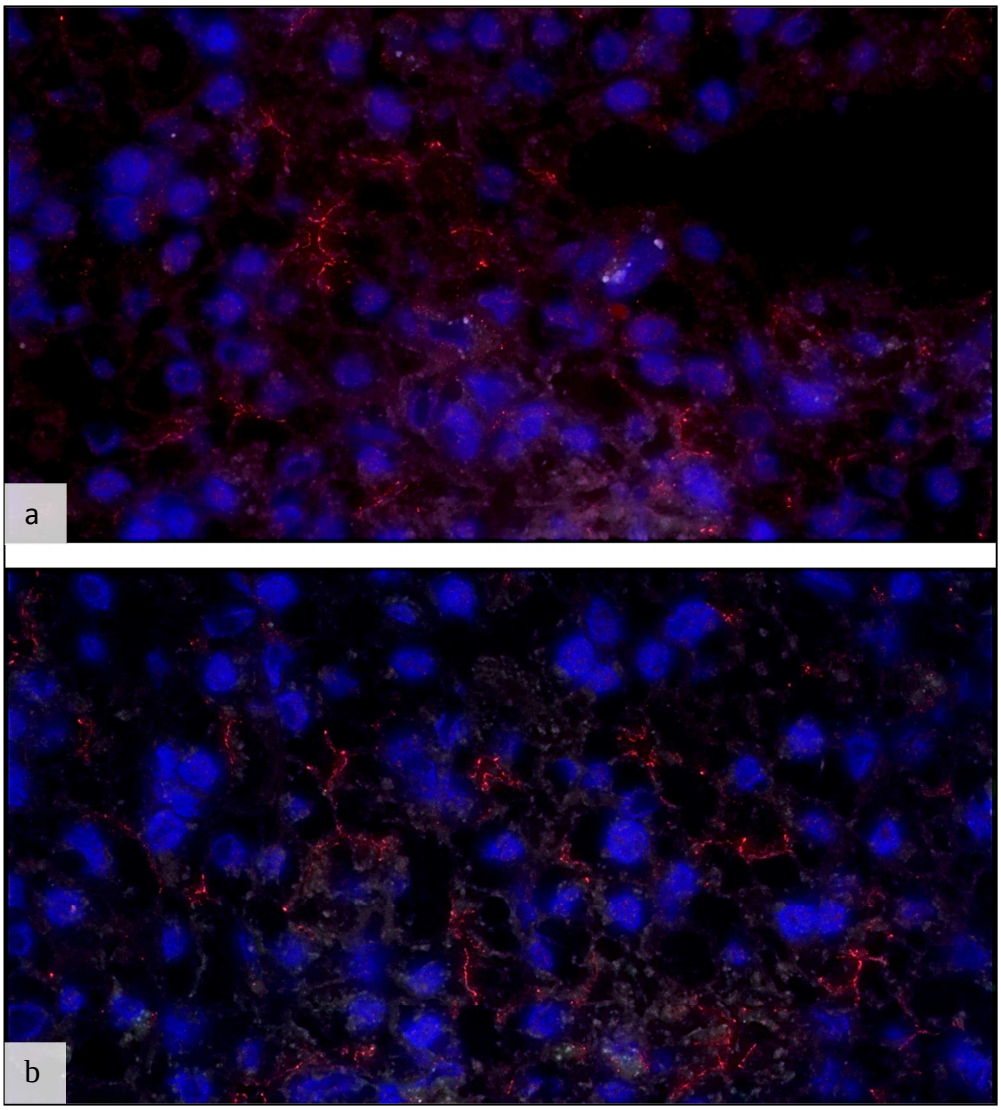
A vizsgált HB mintákban túlnyomórészt (19/21 eset) membranózhus, vagy pontszerű TRIC expressziót detektáltunk. A tumor körüli vizsgált májszövet mindegyike (16/16 eset) különböző mértékben, de expresszálta a tricellulint. A jól differenciált fetális szubtípusban a tumorsejtek erős, membranosus, kiterjedt reakciót pontszerű vagy lienáris pozitivitás formájában. Az embryonális altípus tumorsejtjeinek pozitivitása kevésbé volt erős, és százalékosan is kevesebb tumorsejt mutatott rekciót a fetális kompartmenthez képest. Az embryonális típusú tumorsejteken pontszerű expresszió volt látható, dominálóan a pszeudorozettákban a sejtek apikális pólusán. A tricellulin immunhisztokémiai reakciót a hepatoblastoma epitheliális komponenseiben a 83. ábra/a., /b., /c. szemlélteti.



83. ábra Tricellulin expressziója humán epitheliális hepatoblastomában. A fetális típusú sejtek (a) membranosus, erős reakciót adnak, jellemzően az apikális pólusukon. Az embryonális szubtípusban (b) pontszerű reakciót látunk, a tumorsejtek jellemzően az általuk alkotott pszeudorozetták apikális pólusán adnak pozitivitást. A két szubtípus összehasonlítható TRIC expresszióját a (c) ábra demonstrálja. A (d) ábrán a nyilak által is jelzett nukleáris TRIC expresszió látható (600x).

A 21 vizsgált hepatoblastoma közül 5 esetben (24%) a szokott membranózus TRIC pozitivitás helyett a tumorsejtek kis részében, 2-3%-ban nukleáris tricellulin reakciót lehetett megfigyelni. A magi pozitív esetek közül 4 a fetális, míg 1 az embryonális szubtípushoz tartozott. Ezekben a magi pozitív sejtekben jellemzően nem volt megfigyelhető membranosus reakció. A TRIC magi lokalizációja a 83. ábra/d ábrán látható.

A TRIC lokalizációjának pontosabb feltérképezéséhez fagyasztott mintákon immunfluorescens immunhisztokémiai vizsgálatot végeztünk (84. ábra *a és b*). 5 fagyasztott tisztán fetalis típusú minta állt rendelkezésre, és ezekben a tumorsejtek membránpozitivitást adtak, jellemzően az apikális pólusukon.



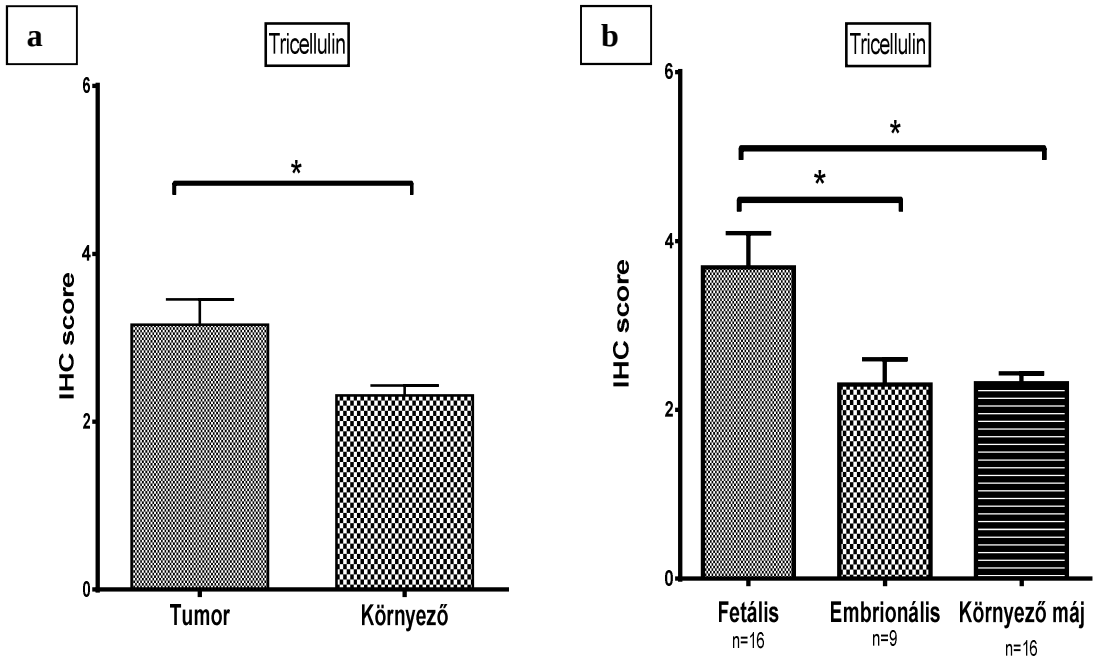
84. ábra TRIC immunfluoreszcens képe humán hepatoblastoma mintákon. A tumorsejtek között (a, b) jól látható SpectrumRed jelöléssel a tricellulin membranózus expressziója. Alexa 568: SpectrumRed (piros); DAPI (kék) magfestés. Eredeti nagyítás 600x.

A tricellulin fehérje expresszió intenzitása és festődő sejtek aránya is szignifikánsan magasabb (p=0,04) volt a hepatoblastoma mintákban a tumor körüli, tumormentes májszövethez viszonyítva. A fetális szubtípusban a tricellulin immunreakció szemikvantitaív kiértékelése szignifikánsan magasabb értéket mutatott mind a környező májhoz (p=0,001), mind pedig az embryonális altípushoz (p=0,023) viszonyítva. Az embryonális komponens tricellulin pozitivitása nem mutatott szignifikánsan eltérést a tumormentes, környező májhoz képest. Az immunhisztokémiai kiértékelés statisztikai analízisét a 19. táblázat mutatja.

19. táblázat Tricellulin immunreakció szemikvantitatív kiértékelése. A megadott értékek az első három oszlopban a Kruskal-Wallis ANOVA teszt, az utolsó oszlopban a Mann-Whitney U teszt kiértékelése során kapott szignifikancia értékek (p értékek) A szignifikáns értékeket vastag kiemelés mutatja.

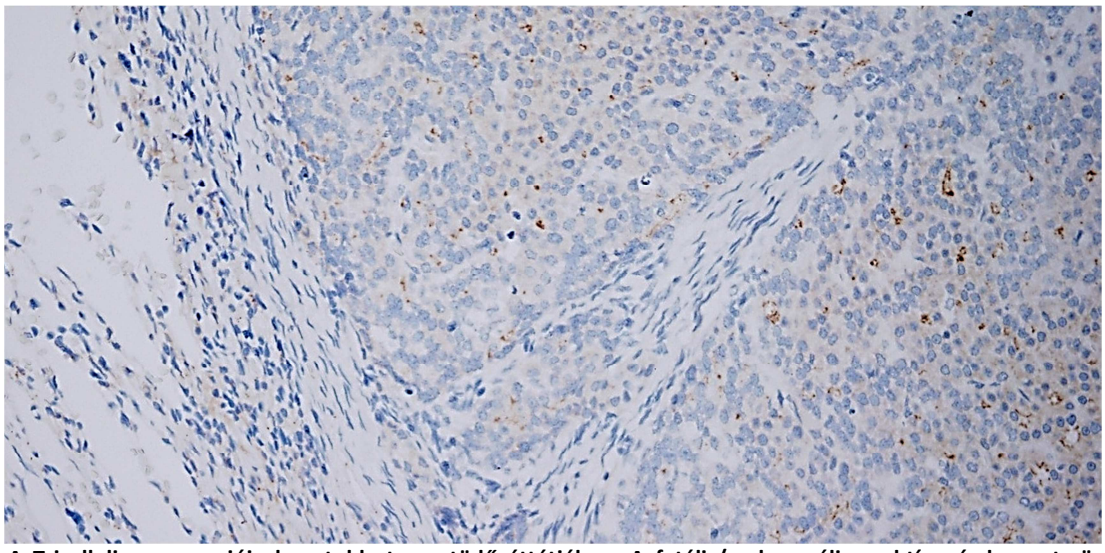
	Fetális versus embryonális	Fetális versus környező máj	Embryonális versus környező máj	Tumor versus környező máj
Tricellulin	**0,023**	**0,001**	**>1 NS**	**0,04**

A HB és szubtípusainak tricellulin expresszióját a középérték és a standard hiba (SEM) szemléltetésével a 85. ábra mutatja be.



85. ábra A tricellulin fehérje expressziójának vizsgálata a hepatoblastoma fetális és embryonális altípusaiban a használt szemikvantitatív immunhisztokémiai pontrendszer (IHC score) kiértékelése szerint. a, A tumormentes, környező májban szignifikánsabb alacsonyabb (p< 0,04) tricellulin immunhisztokémiai expressziós pontértéket kaptunk. b, A fetális komponensben viszont szignifikánsan magasabb értéket (p= 0,023) detektáltunk mind az embryonális komponenshez, mind pedig a környező májhoz (p= 0,001) képest. Az embryonális komponens azonban nem különbözött szignifikánsan a környező májtól (p <0,001). A * jelölés a két csoport között talált szignifikáns eltéréseket demonstrálja, a középérték és a standard hiba (SEM) feltüntetésével.

Egy esetben rendelkezésre állt a HB távoli, tüdő áttétje is, melynek vizsgálata során a metastasisban is pozitív TRIC reakciót találtunk *(*86. ábra*)*. Az áttétet adó eset kevert embryonalis/fetalis típusúnak bizonyult, és metastasisban a primer tumorhoz hasonlóan mindkét komponens tumorsejtjei pozitív reakciót mutattak.



86. ábra A Tricellulin expressziója hepatoblastoma tüdő áttétjében. A fetális/embryonális szubtípusú daganatszövet sejtjei nagymértékben kifejezik a fehérjét. A daganatszövet mellett az alveolusok is látszódnak (nyíl) (200x).

A hepatoblastoma esetek klinikai utánkövetése

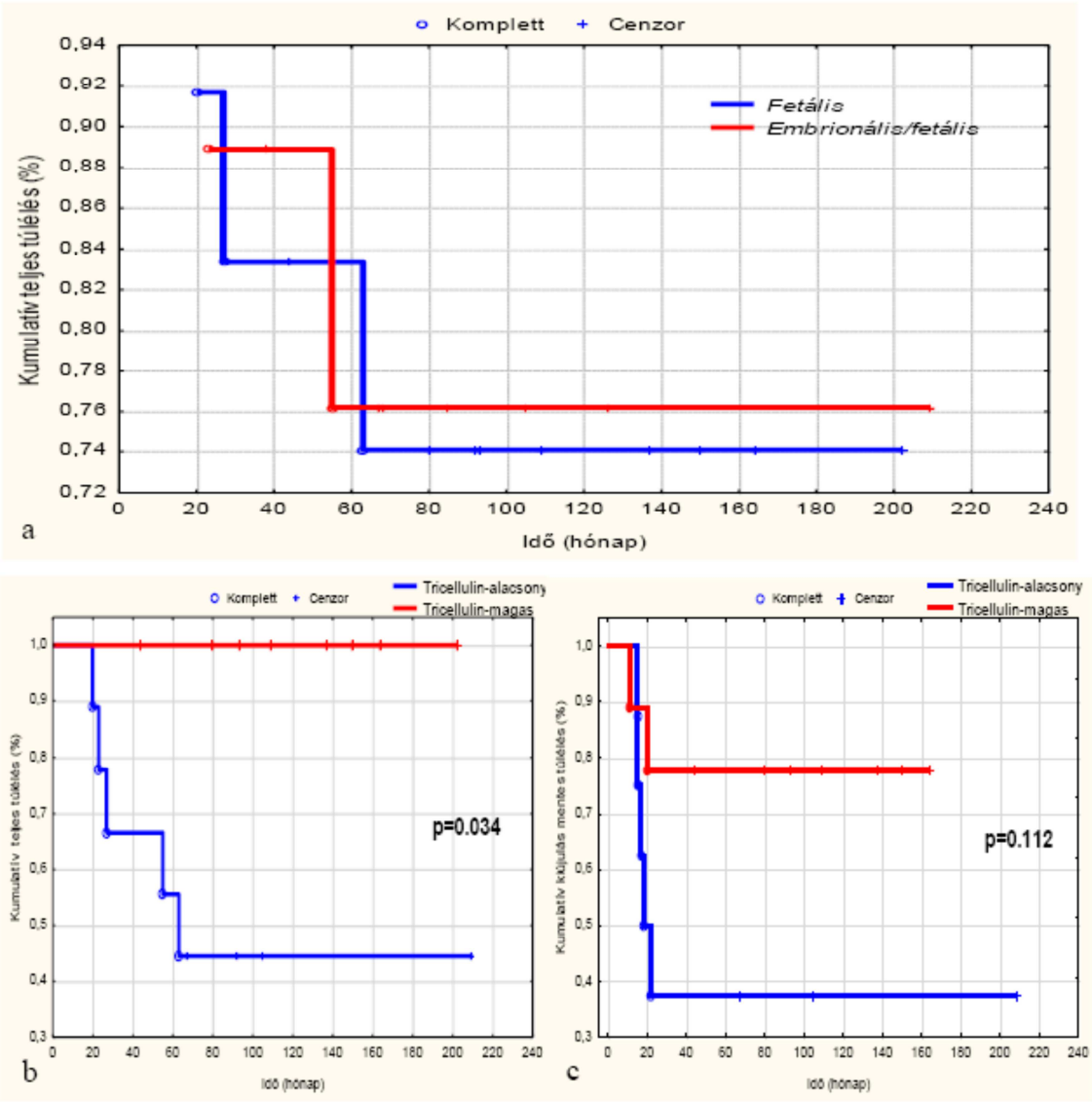
A vizsgált minták 21 betegből származtak, és vizsgálatunk lezárásáig 5 beteg (24%) halálozott el a HB progressziója következtében.

A túlélési vizsgálatba a 21 betegből 17 volt bevonható, mint egyértelműen beosztható eset, mivel 9 kevert, embryonális/fetális esetből a fetális komponens aránya 4 esetben magas, 30-50% között volt. Ez a négy eset nem került bele a túlélési vizsgálatba, mivel nem eldönthető, hogy melyik komponens eredményeit kellene figyelembe venni a kiértékelés során. Végül 12 tisztán fetalis, és 5 dominálóan embryonálisnak tartott embryonalis/fetális eseten végeztük el a kiértékelést. A szövettani típusok szerint nem találtunk szignifikáns különbséget a fetális (n=12) és az embryonális/fetális (n=5) esetek között sem a teljes túlélés (OS), sem pedig az eseménymentes túlélés (EFS) tekintetében (87. ábra *a*). Az átlag teljes túlélés 97.4 hónap (20-209 hónap), míg az EFS 76.3 hónap (11-209 hónap). Recidíva 7 esetben (33%), míg távoli metasztázis 6 esetben (28%) mutatkozott.

A Kaplan-Meier analízishez a tricellulin expresszió szerint megkülönböztettünk a tricellulint magasan, azaz a medián felett és a TRIC-t alacsonyan, azaz a medián alatt expresszáló hepatoblastoma eseteket. A TRIC-t alacsonyan expresszáló esetek szignifikánsan rövidebb OS-t mutattak a Kaplan-Meier kiértékelésben (log-rank teszt, p=0,034) a tricellulint magasan, a medián fölött expresszáló esetekhez viszonyítva (87. ábra *b*). A TRIC-t erősen termelő átlag teljes túlélés 122,4 hónap, míg a TRIC-et alacsonyan expresszáló esetekben 75.1 hónap volt. A magas TRIC expressziójú csoportban nem történt halálozás, de az EFS tekintetében nem találtunk szignifikáns különbséget a két csoport között (log-rank teszt, p=0,112). (87. ábra *c*).

Az EZH2-t magasan termelő esetekben az OS 87,1 hónap, az EFS pedig 64 hónap volt, míg az EZH2-t alacsony expresszáló csoportban az OS 98,9 hónapnak, míg az EFS 94 hónapnak mutatkozott. A két csoport között nem volt szignifikáns különbség (log-rank analízis, p=0,307).

Fisher-féle exact teszttel vizsgálva a magasabb (medián feletti) EZH2 értékek és a távoli metasztázis jelenléte között kapcsolat volt kimutatható (p= 0,013).



87. ábra A HB-s betegek túlélési analízisének eredményei. a,: Nem mutatkozott szignifikáns különbség a szövettani típusok és az OS, EFS között. b, c: A TRIC-t magasan kifejező esetekhez szignifikánsan jobb OS társult, az EFS tekintetében nem volt különbség. Komplett esemény: a páciens meghalt vagy recidíva alakult ki. Cenzorált esemény: a beteg más okból kifolyólag kikerült a vizsgálatból, vagy véget ért az utánkövetési időszak.

Összességében a hepatoblastomák jobban differenciált fetalis komponensében a claudin-1, claudin-2, valamint a tricellulin expressziója is szignifikánsan magasabb, mint a rosszabbul differenciált embryonális komponensben. A rosszabbul differenciált embryonális komponens csökkent claudin-1, -2 és tricellulin expressziója magasabb osztódási aktivitással társul. Ez a jelenség a β-catenin magi transzlokációjával nem mutatott korrelációt.

IV.2. A sejtkapcsoló struktúra alkotórészek expressziójának vizsgálata urogenitális tumorokban

IV.2.1. Claudin expresszió high grade és low grade húgyhólyag carcinomákban és nem invazív húgyhólyag tumorokban

A claudin expresszió immunhisztokémiai és RT-PCR vizsgálata normál húgyúti hámban: A vizsgált claudinok urotheliumon belüli expressziója hasonlónak bizonyult az irodalomban szereplő adatokhoz (Boireau,2007; Nakanishi,2008; Varley,2006). A claudin-1 membrán-pozitivitás főként az urothel basalis rétegeiben mutatkozott (88. ábra, 91. ábra) míg a claudin-2 perimembranózus-citoplazmatikus granuláris reakciót adott a basalis/peribasalis rétegekben (88. ábra, 92. ábra). A claudin-3 és -5 gyenge reakciót csupán néhány mintában adott a hám felső rétegeiben (88. ábra, 93. ábra). Erős claudin-5 expresszió jellemezte az erek endotheljét, ahogy más vizsgálatainkban is és ezt belső pozitív kontrollként használtuk a vizsgálataink során. Claudin-4 és -7 membrán-pozitivitás jellemzően az urothel felső rétegeiben volt kimutatható, basalis irányban csökkenő intenzitással (91. ábra, 92. ábra, 89. ábra). Néhány esetben azonban a claudin-7 pozitivitás a hám egész terjedelmében kimutatható volt. A claudin-10 nem volt detektálható a mintákban (88. ábra). Mind a normál, mind a gyulladás által érintett hámban elszórt Ki-67 pozitivitást észleltünk (93. ábra, 89. ábra). A gyulladásos minták szignifikánsan magasabb claudin-2 (morfometria: p=0,0007; scoring analízis: p=0,034) és claudin-4 (morfometria: p=0,039; scoring analízis: p=0,014) fehérje valamint claudin-7 (p=0,047) mRNS expressziót mutattak a nem gyulladásos mintákhoz viszonyítva (20. táblázat, 21. táblázat).

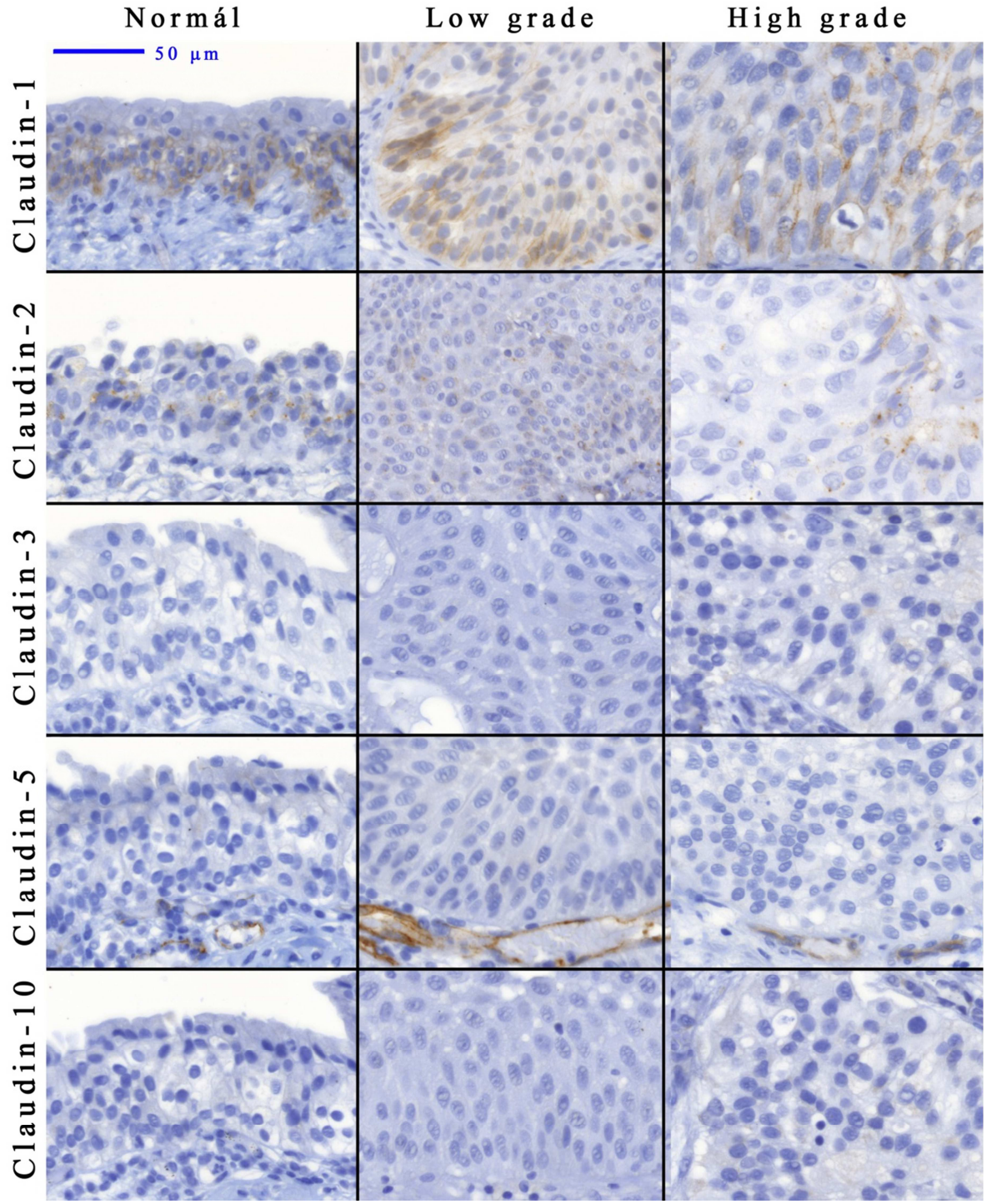
Claudin expresszió fehérje és mRNS expressziójának vizsgálata low és high grade húgyhólyag tumorokban immunhisztokémiai és RT-PCR vizsgálatokkal: A claudin-1, -2, -4 és -7 expresszió a legtöbb esetben kimutatható volt. A claudin-3 és -5 csak néhány, többségében jól differenciált urothel tumorban volt detektálható, míg a claudin-10 termelődés nem volt kimutatható. A claudin-1, -2 és -7 expresszió hámrétegek szerinti lokalizációja az UCC-ken belül hasonló volt a normál hámban találtakhoz, míg a claudin-4 döntően a tumor egész terjedelmében megjelent.

A tumoros minták csökkent claudin-1 (p=0,01) és emelkedett claudin-2, -4 és -7 valamint Ki-67 fehérje, míg emelkedett claudin-1, -2, -4 és -7 mRNS expressziót mutattak a nem-gyulladásos kontrollhoz képest (20. táblázat, 21. táblázat).

A LG és a HG csoportok összehasonlítása ugyanazt az eredményt adta, akár belevettük a T2-es stádiumú, izominvazív tumorokat az analízisbe (*), akár kihagytuk az analízisből (**) (20. táblázat). A húgyúti daganatok claudin expresszióját morfometriai módszerekkel elemezve a HG

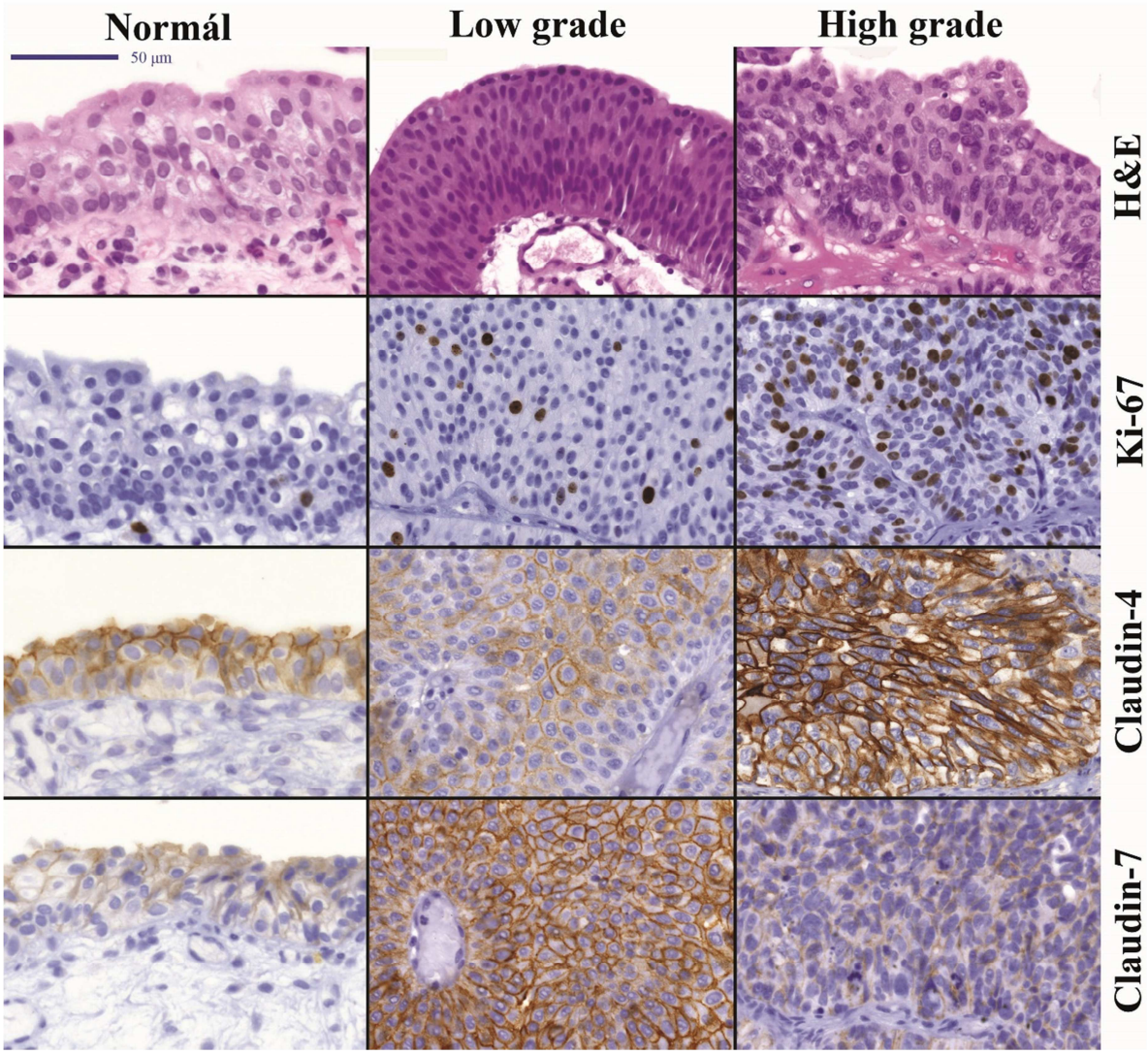
tumorok szignifikánsan magasabb claudin-4 (p*=0,037;p**=0,011; 89. ábra) és Ki-67 (p*<0,001;p**<0,001; 89. ábra) valamint szignifikánsan alacsonyabb claudin-1 (p**=0,035) és claudin-7 (p*=0,025; p**<0,001;) fehérje expressziót mutattak a LG tumorokhoz viszonyítva. Az IHK reakciók szemikvantitatív kiértékelése hasonló szignifikáns különbségeket adott (21. táblázat). Emellett csökkent claudin-1 (p*=0,025; p**=0,017) és emelkedett claudin-2 (p*=0,002; p**=0,009) és claudin-4 (p*<0,001;p**<0,001) mRNS expressziót találtunk a HG UCC-kben a LG UCC-khez képest (20. táblázat, 21. táblázat). A HG tumorokban a LG tumorokhoz viszonyítva szignifikánsan magasabb volt azoknak a tumoroknak az aránya, amelyek a claudin-4-et a tumor egész terjedelmében expresszálták, míg a LG tumorok inkább a normál urothelhez hasonló lokalizációban, azaz a hám felső rétegeiben mutattak claudin-4 fehérje pozitivitást (Chi^2 test; p*<0,001; p**<0,001).

A fluoreszcens IHK vizsgálatokkal az esetek többségében a claudin-4 és claudin-7 ko-lokalizációja volt megfigyelhető. Az immunfluoreszcens analízis is alátámasztotta a HG tumorokban talált emelkedett a claudin-4 és csökkent a claudin-7 expressziót a LG tumorokhoz képest (90. ábra).



88. ábra Claudin-1, -2, -3, -5 és -10 expresszió normál urotheliumban, valamint low és high grade UCC-ben. A fényképek azonos nagyítással és beállításokkal készültek, lépték: 50µm.

dc_1040_15



89. ábra Claudin-4, -7 és Ki-67 fehérje expresszió immunhisztokémiai kimutatása normál húgyhólyaghámban, valamint low és high grade húgyhólyagcarcinomában. A képek azonos nagyítással és beállításokkal készültek, lépték: 50µm.

A high grade tumorok szignifikánsan magasabb Ki-67 magi pozitivitást ($p<0,0001$), CLDN-4 ($p=0,037$) és szignifikánsan csökkent CLDN-7 ($p<0,0001$) fehérje termelődést mutattak a low grade tumorokhoz viszonyítva.

20. táblázat Claudin fehérje, mRNS és Ki-67 fehérje expresszió morfometriai kiértékelése és a csoportok összehasonlítása a kontroll és daganat mintákban. A T2-es stádiumú, izominvazív tumorok figyelembevételével (*) vagy kihagyásával végzett analízis (**)

	NGYK vs GYK	NGYK vs UCC	GYK vs UCC	LG vs HG*	LG vs HG**
Claudin-1 IHK	↑ (0.386)	↓**(0.014)**	↓**(0.001)**	↓(0.078)	↓**(0.035)**
Claudin-2 IHK	↑ **(0.007)**	↑(0.489)	↓**(0.001)**	↑(0.913)	↑(0.337)
Claudin-4 IHK	↑ **(0.039)**	↑(0.125)	↓(0.082)	↑**(0.037)**	↑**(0.011)**
Claudin-7 IHK	↑ (0.791)	↑(0.115)	↓(0.062)	↓**(<0.001)**	↓ **(0.001)**
Claudin-1 mRNS	↓(0.624)	↑(0.101)	↑(0.117)	↓**(0.025)**	↓**(0.0173**
Claudin-2 mRNS	↑(0.624)	↑**(0.037)**	↑(0.727)	↑**(0.002)**	↑ **(0.009)**
Claudin-4 mRNS	↓(0.624)	↑(0.092)	↑**(0.034)**	↑**(<0.001)**	↑**(<0.001)**
Claudin-7 mRNS	↑**(0.047)**	↑**(0.001)**	↑**(0.043)**	↓(0.720)	↓(0.819)
Ki-67	↓(0.245)	↑(0.076)	↑(0.196)	↑**(<0.001)**	↑**(<0.001)**

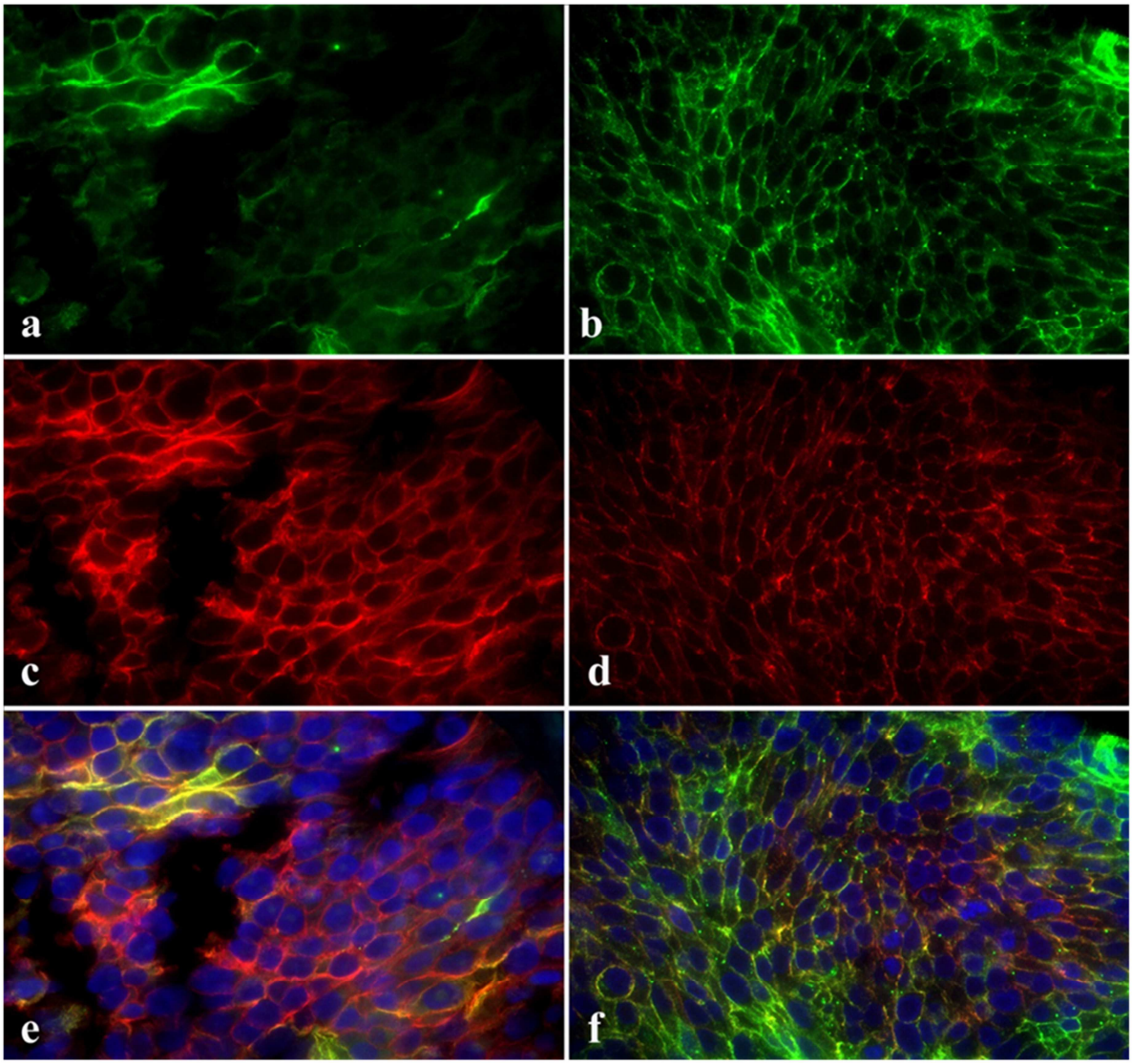
21. táblázat Claudin fehérje expresszió összehasonlítása a kontroll és tumoros mintákban szemikvantitatív analízissel.

	NGYK vs GYK	NGYK vs UCC	GYK vs UCC	LG vs HG*	LG vs HG**
Claudin-1 IHK	↑ (0.337)	↓**(0.047)**	↓**(0.003)**	↓(0.914)	↓**(0.049)**
Claudin-2 IHK	↑ **(0.034)**	↑(0.279)	↓**(<0.001)**	↑(0.810)	↑(0.337)
Claudin-4 IHK	↑ **(0.014)**	↑(0.075)	↓(0.062)	↑**(0.011)**	↑**(0.042)**
Claudin-7 IHK	↑ (0.637)	↑(0.373)	↓(0.081)	↓**(0.014)**	↓ **(0.024)**

* T2-vel ;** T2 nélkül;
IHK: immunhisztokémia; *NGYK:* kontroll minta gyulladás nélkül; *GYK:* gyulladásos kontroll minta; a szignifikáns eltérések vastagon szedve, aláhúzva; *vs*= versus; Két egymástól független csoport összehasonlítására Mann-Whitney U tesztet használtuk (Ta-T1 vs T2; LG vs HG). A fejlécben a nem aláhúzott csoportokat viszonyítottuk az aláhúzott (referencia) csoportokhoz.
↑ a nem aláhúzott vizsgálati csoportok magasabb expressziót mutatnak a referencia csoporthoz képest.
↓ a nem aláhúzott vizsgálati csoportok alacsonyabb expressziót mutatnak a referencia csoporthoz képest.
( ) p-értékek;

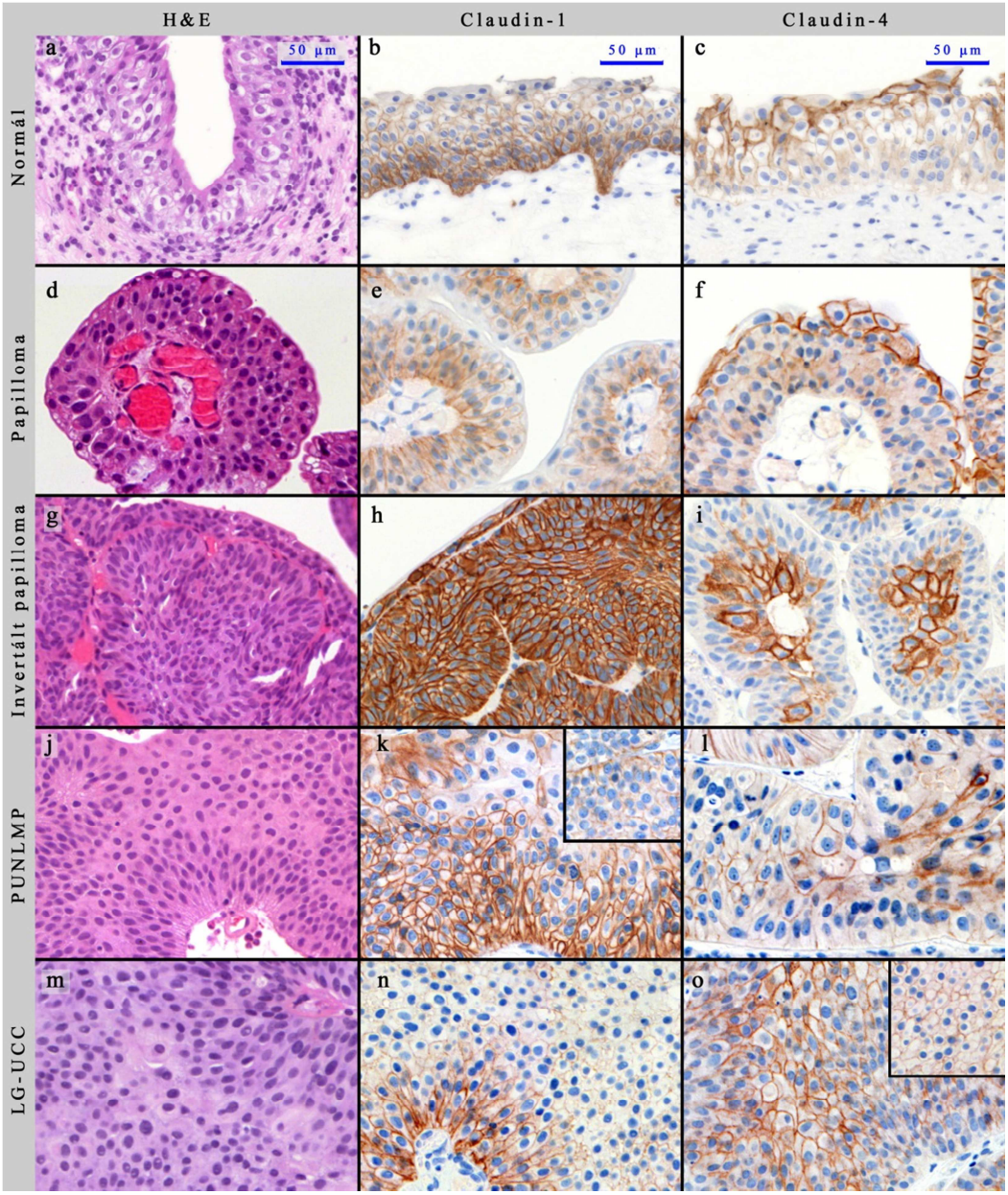
A gyulladásos mintákban az ernyősejtekben is kimutatható volt a claudin-2, míg a nem gyulladásos mintákban általában nem láttunk reakciót ezen lokalizációban.

dc_1040_15

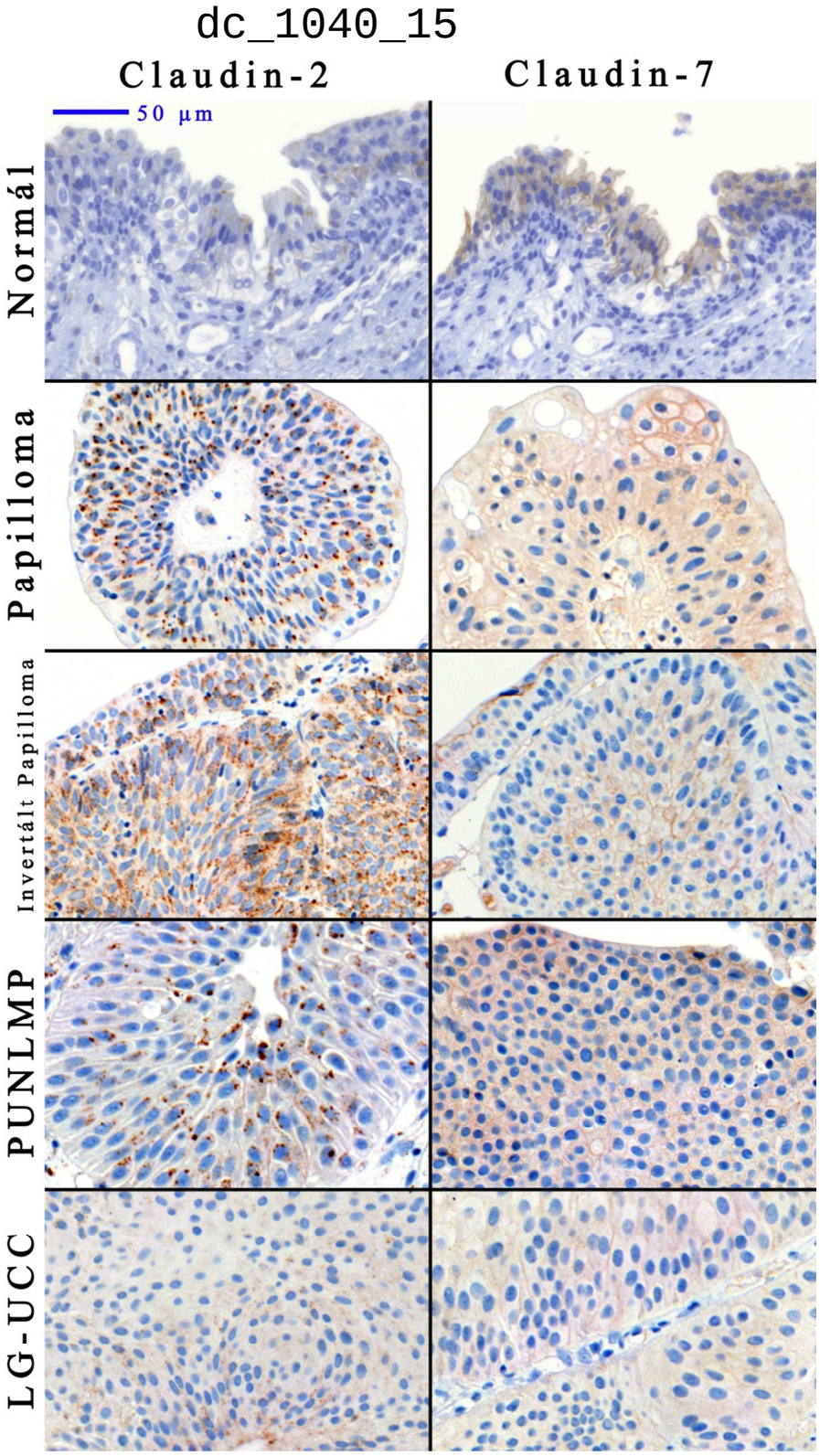


90. ábra Claudin-4 és -7 immunfluoreszcens IHK low és high grade UCC -ben; a, c., e.: claudin-4, claudin-7 és ko-lokalizációja low grade UCC-ben; b, d., f.: claudin-4, claudin-7 és ko-lokalizációja high grade UCC-ben. 600X-s nagyítás.

A PUNLMP-k és a LG-UCC-k közül egyes tumorokban a claudin-1 és -4 a tumor egész terjedelmében pozitivitást mutatott. Az invertált papillomák 73%-ban (11/15) a claudin-1 a daganat teljes terjedelmében pozitivitást mutatott (90. ábra). A claudin-1 és -2 expresszió alacsonyabb volt a LG-UCC-ben a papillomákhoz, invertált papillomákhoz és a PUNLMP-khez képest (90. ábra. 92. ábra). A claudin-4 és -7 fehérje expresszióban nem találtunk jelentős eltérést a vizsgált csoportok között (91. ábra, 92. ábra). Emelkedett claudin-3 expressziót egyik tumor sem mutatott (93. ábra). A claudin-1 esetében azonban szignifikánsan emelkedett expresszió mutatkozott az invertált papillomákban a papillomákhoz, LG-UCC-khez és a PUNLMP-khez viszonyítva, akár morfometriai, akár szemi-kvantitatív kiértékelést alkalmaztunk (22. táblázat, 23. táblázat, 91. ábra).

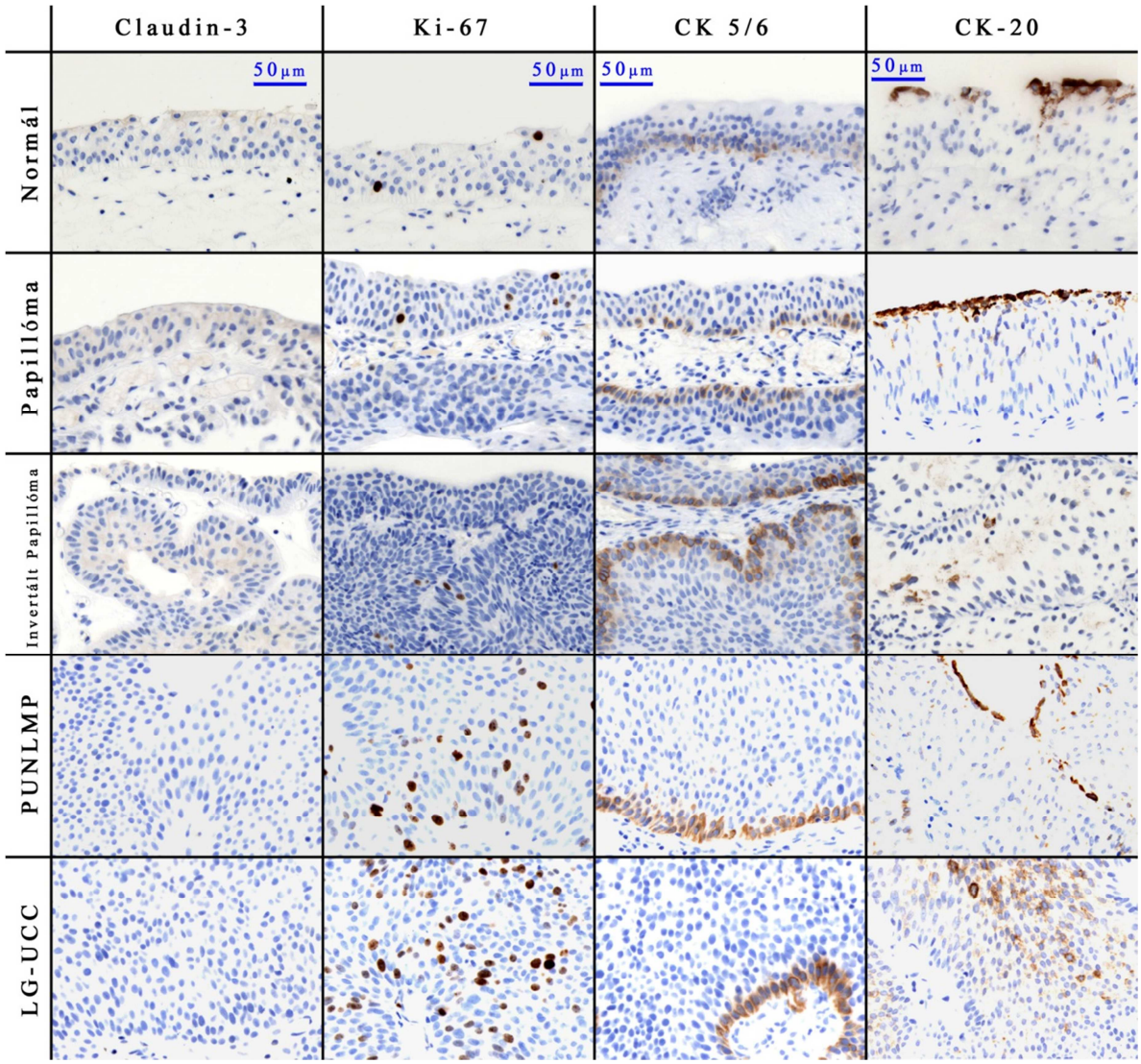


91. ábra H&E, claudin-1 és -4 fehérje expresszió normál urothelben, valamint UP-ben, IUP-ben és LG-UCC -ben. a., d., g., j., m. ábra: H&E festés: normál urothelium; UP; IUP; PUNLMP; LG-UCC b., e., h., k., n. ábra: Claudin-1 festés: normál urothelium; UP; IUP; PUNLMP; LG-UCC c., f., i., l., o. ábra: Claudin-4 festés: normál urothelium; UP; IUP; PUNLMP; LG-UCC. A claudin-4-et a medián felett (o) és a medián alatt (o inzertje) LG-UCC-k. A claudin-1-et a medián felett (k) és a medián alatt (k inzertje) PUNLMP-k. UP: urotheliális papilloma; IUP: invertált urotheliális papilloma; PUNLMP: alacsony malignus potenciálú papilláris urotheliális neoplasia, LG-UCC: low grade urothel sejtes carcinoma. Lépték: 50 µm; minden fénykép egységes beállításokkal készült (az inzerteket is beleértve).



92. **ábra Claudin-2 és -7 expresszió normál urothelben, urothel papillomában, invertált papillomában, PUNLMP-ben és LG-UCC-ben.**

dc_1040_15



93. ábra Claudin-3, Ki-67, CK-5/6 és CK-20 expresszió a normál urothelben, papillomában, invertált papillomában, PUNLMP-ben és LG-UCC-ben.

A claudin-3 fehérje nem, vagy nagyon gyengén expresszálódott. Ki-67 magi pozitivitás a normál hámban, a papillomában és az invertált papillomában kevés sejtben volt kimutatható, általában a basalis hámrétegekben, míg PUNLMP-ben és Ki-67-ben a hám egész terjedelmében expresszálódott. A CK-5/6 a hám basalis, míg a CK-20 a hám felső rétegeiben jelent meg. A CK-20 pozitivitás LG-UCC-k esetén az esetek egy részében az intermedier és basalis rétegekben is megjelent (93. ábra).

22. táblázat A caludin immunhisztokémiai reakciók morfometriai kiértékelése. Az egyes csoportok közötti fehérje expresszió összehasonlításával együtt az átlag, standard hiba (St.Hiba) és a Kruskal-Wallis test p értékei vannak feltüntetve a 10. táblázatban (normál, UP, IUP, PUNLMP and LG-UCC). A szignifikáns változások (p<0.05) vastagon szedettek és csillaggal (*) vannak megjelölve. UP: urothelialis papilloma; IUP: invertált urothelialis papilloma; PUNLMP: alacsony malignus potenciálú papilláris urotheliális neoplasia; LG-UCC: low grade urothel sejtes carcinoma; vs: versus, viszonyítva.

Festés	Csoport	Átlag	St.Hiba	Kruskal-Wallis teszt	vs UP	vs IUP	vs PUNLMP	vs LG-UCC
				P érték	p érték	p érték	p érték	p érték
claudin-1	**Normál**	13,45	1,82		1,000	**0,040***	1,000	1,000
	UP	20,21	2,09			**0,006***	1,000	1,000
	IUP	34,95	3,74	**0,001***			**0,047***	**0,002***
	PUNLMP	22,74	3,14					1,000
	LG-UCC	18,65	3,46					
claudin-2	**Normál**	0,44	0,15		1,000	1,000	1,000	1,000
	UP	1,27	0,29			1,000	1,000	0,057
	IUP	1,21	0,56	0,104			1,000	1,000
	PUNLMP	0,81	0,29					1,000
	LG-UCC	0,33	0,08					
claudin-4	**Normál**	2,56	1,20		1,000	1,000	1,000	1,000
	UP	4,77	0,77			1,000	1,000	1,000
	IUP	3,92	1,02	0,631			1,000	1,000
	PUNLMP	4,11	0,51					1,000
	LG-UCC	4,03	0,66					
claudin-7	**Normál**	0,284	0,094		1,000	1,000	1,000	0,620
	UP	0,15	0,06			1,000	1,000	1,000
	IUP	0,24	0,10	0,162			1,000	1,000
	PUNLMP	0,21	0,09					0,720
	LG-UCC	0,07	0,05					

23. táblázat A szemi-kvantitatív (score x intenzitás) vizsgálat eredményei. Az egyes csoportok közötti fehérje expresszió összehasonlításával együtt az átlag, standard hiba (St.Hiba) és a Kruskal-Wallis test p értékei vannak feltüntetve a 10. táblázatban (normál, UP, IUP, PUNLMP and LG-UCC). A szignifikáns változások (p<0.05) vastagon szedettek és csillaggal (*) vannak megjelölve. UP: urothelialis papilloma; IUP: invertált urothelialis papilloma; PUNLMP: alacsony malignus potenciálú papilláris urotheliális neoplasia; LG-UCC: low grade urothel sejtes carcinoma; vs: versus, viszonyítva.

Festés	Csoport	Átlag	St.Hiba	Kruskal-Wallis teszt P érték	vs UP p érték	vs IUP p érték	vs PUNLMP p érték	vs LG-UCC p érték
claudin-1	Normál	6,00	1,155		1,000	**0,047***	1,000	1,000
	UP	8,68	0,75			**0,039***	1,000	1,000
	IUP	11,63	0,97	**0,002***			**0,027***	**0,006***
	PUNLMP	8,82	0,85					1,000
	LG-UCC	7,50	0,98					
claudin-2	Normál	2,4	0,65		1,000	1,000	1,000	1,000
	UP	3,52	0,59			1,000	1,000	1,000
	IUP	3,36	0,76	0,567			1,000	1,000
	PUNLMP	3,83	0,73					1,000
	LG-UCC	2,79	0,52					
claudin-4	Normál	3,00	0,58		1,000	1,000	1,000	1,000
	UP	3,75	0,49			1,000	1,000	1,000
	IUP	4,27	0,73	0,459			1,000	1,000
	PUNLMP	3,62	0,47					1,000
	LG-UCC	4,89	0,62					
claudin-7	Normál	1,67	0,33		1,000	1,000	1,000	0,164
	UP	0,83	0,26			1,000	1,000	1,000
	IUP	1,33	0,66	0,096			1,000	1,000
	PUNLMP	0,59	0,17					0,651
	LG-UCC	0,37	0,15					

24. táblázat Ki-67 expresszió immunhisztokémiai reakciók kiértékelése. Az egyes csoportok közötti fehérje expresszió összehasonlításával együtt az átlag, standard hiba (St.Hiba) és a Kruskal-Wallis test p értékei vannak feltüntetve a 10. táblázatban (normál, UP, IUP, PUNLMP and LG-UCC). A szignifikáns változások (p<0.05) vastagon szedettek és csillaggal (*) vannak megjelölve. UP: urothelialis papilloma; IUP: invertált urothelialis papilloma; PUNLMP: alacsony malignus potenciálú papilláris urotheliális neoplasia; LG-UCC: low grade urothel sejtes carcinoma; vs: versus, viszonyítva.

Festés	Csoport	Átlag	St.Hiba	Kruskal-Wallis teszt p érték	vs UP p érték	vs IUP p érték	vs PUNLMP p érték	vs LG-UCC p érték
Ki-67	Normál	2,10	1,05		1,000	1,000	0,323	**<0,001***
	UP	3,27	0,41			1,000	**0,038***	**<0,001***
	IUP	5,37	1,55	**<0,001***			0,223	**<0,001***
	PUNLMP	9,27	1,87					0,621
	LG-UCC	17,88	2,87					

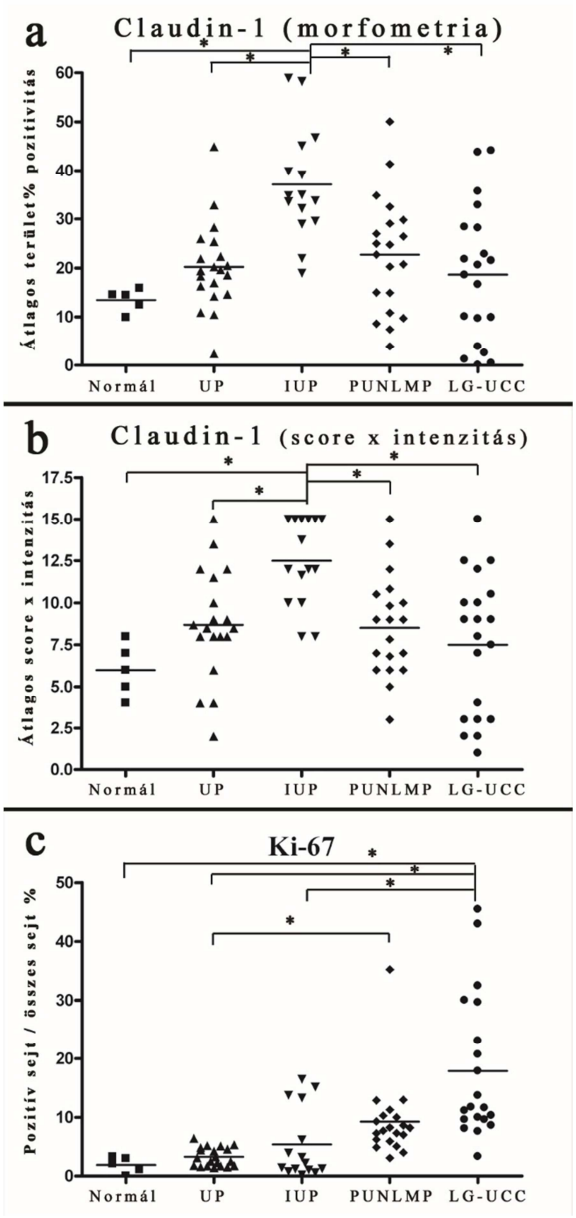
25. táblázat A CK-5/6 és CK-20 expresszió morfometria analízisének eredményei. Szignifikáns változások vastagon vannak szedve és csillaggal vannak jelölve* UP: urothelialis papilloma; IUP: invertált urothelialis papilloma; PUNLMP: alacsony malignus potenciálú papilláris urothelialis neoplasia; LG-UCC: low grade urothelsejtes carcinoma

Festés	Csoport	Átlag	St.Hiba	Kruskal-Wallis teszt p érték	vs UP p érték	vs IUP p érték	vs PUNLMP p érték	vs LG-UCC p érték
CK-5/6	Normál	1,12	0,30	0,608	1,000	1,000	1,000	1,000
	UP	1,13	0,46			1,000	1,000	1,000
	IUP	1,10	0,56				1,000	1,000
	PUNLMP	2,72	0,72					1,000
	LG-UCC	2,23	1,05					
CK-20	Normál	1,69	0,07	**0,024 ***	0,281	0,549	**0,004 ***	1,000
	UP	1,71	0,72			1,000	0,712	1,000
	IUP	0,31	0,20				1,000	1,000
	PUNLMP	0,47	0,37					**0,016 ***
	LG-UCC	4,34	2,09					

A CK-5/6 a basalis, míg az irodalmi adatoknak megfelelően a CK-20 pozitivitás megfelelően a felső rétegekben volt detektálható (93. ábra) (Castillo-Martin,2010; Eiber,2007). A kóros CK-20 pozitivitás a nem csak szuperficiális pozitivitás megjelenésében nyilvánult meg a LG-UCC-k esetében. A PUNLMP-k szignifikánsan csökkent CK-20 expressziót mutattak a normál hámhoz és a LG-UCC-khez képest (23. táblázat, 24. táblázat, 25. táblázat). Más tekintetben nem találtunk szignifikáns különbséget a csoportok között.

LG-UCC-k szignifikánsan magasabban mutattak Ki-67 magi pozitivitást a normál urothelhez, a papillomákhoz és az invertált papillomákhoz viszonyítva, valamint a PUNLMP-k az UP-khez képest (24. táblázat, 93. ábra; 94. ábra).

dc_1040_15



94. ábra Claudin-1 morfometria eredménye, score x intenzitás és Ki-67 dot-plot ábrázolás; a. ábra: claudin-1 expresszió dot-plot ábrázolása, morfometria eredmények alapján; b. ábra: claudin-1 dot-plot ábrázolása, score x intenzitás alapján; c. ábra: Ki-67 magi pizitivitás dot-plot ábrázolása. Szignifikáns eltérések: * (p<0.05).

A morfometria eredménye szignifikánsan korrelált a szemikvantitatív analízis eredményével (Spearman féle korreláció; r=0,75).

A Low grade – High grade húgyhólyagrákos (UCC) betegek utánkövetése

A LG páciensek közül egy sem (0/27), míg a HG betegek közül 19 beteg (19/57) hunyt el húgyhólyagrák miatt (p<0,01; Fisher-féle egzakt próba). Ezen 19 esetből 17 beteg izominvazív húgyhólyagrákban szenvedett, míg ketten T1 stádiumúak voltak.

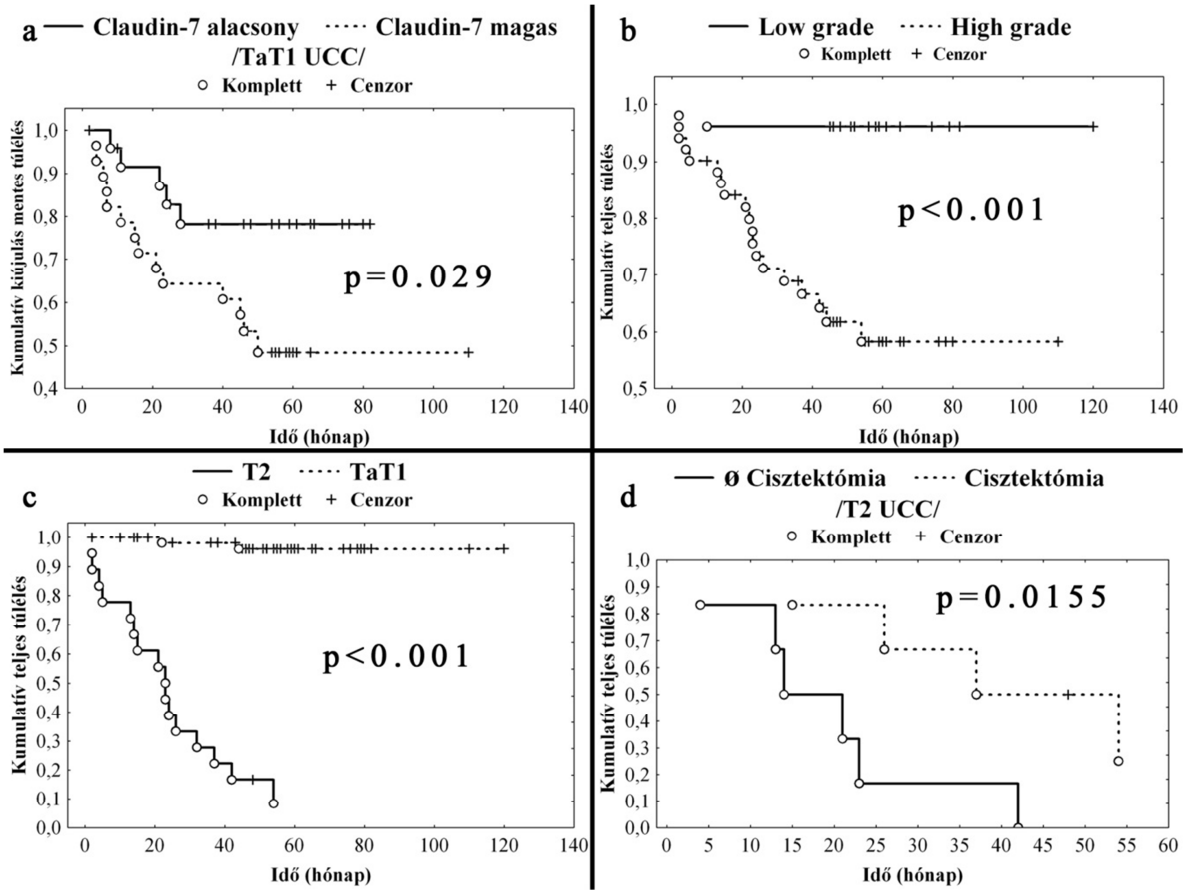
Összesen 64 Ta-T1 stádiumú tumor bizonyult alkalmasnak az utánkövetéses vizsgálatra (27 LG és 37 HG). LG esetek közül 13 (48%), míg a HG esetek közül 7 (18%) mutatott recidívát. Az átlagos KMT 38 hónap volt a LG-ben, míg 47 hónap a HG-ben. Azok a Ta-T1-es tumorok, melyek magasan, azaz a medián fölött expresszálták a claudin-7 fehérjét szignifikánsan rövidebb KMT-sel

rendelkeznek a claudin-7-et alacsonyan, a medián alatt expresszáló tumorokhoz képest (Kaplan-Meier analízis, p=0,029; 95. ábra a).

HG-ből 3 eset (ezen esetekből két beteg húgyhólyagrákban hunyt el), míg a LG-ből egy eset sem progrediált izominvazív daganattá.

A HG tumorok (T2-stádium) szignifikánsan rosszabb teljes túléléssel rendelkeztek a LG tumorokhoz viszonyítva (Kaplan-Meier analízis, p<0,01, 95. ábra b). A nemzetközi irodalomnak megfelelően az izominvazív (T2) esetek szignifikánsan rosszabb túlélést mutattak a felületes (Ta-T1) esetekhez viszonyítva (Kaplan-Meier analízis; p<0,001, 95. ábra c). A cisztektómiával kezelt izominvazív húgyhólyagrákos betegek szignifikánsan hosszabb túlélést mutattak (48 hónap viszonyítva 14 hónaphoz; Kaplan-Meier analízis, p=0,0155, 95. ábra d) az egyéb módon kezelt izominvazív daganatos betegekhez viszonyítva.

Multivariáns analízis nem volt kivitelezhető a LG-HG csoportok esetében, mivel amíg egyetlen LG UCC beteg sem, addig 19 HG UCC páciens (közülük 17-en T2-es stádiummal) hunyt el urológiai okból.



95. ábra UCC-k túlélés analízise a grade stage és a claudin-7 fehérje expresszió alapján; a ábra: A Ta-T1-es tumorokban az alacsony claudin-7 fehérje expresszió (medián alatt) szignifikánsan hosszabb KMT-el társult a magas (medián fölötti) claudin-7 fehérje expresszióhoz képest; b ábra: A high grade tumorok szignifikánsan rövidebb teljes túlélést mutattak a low grade tumorokhoz viszonyítva; c ábra: T2-es tumorok szignifikánsan rövidebb teljes túlélést mutattak a Ta-T1-es tumorokhoz kéepst; d. ábra: A cisztektómiával kezelt T2-es esetek szignifikánsan hosszabb teljes túléléssel rendelkeztek a más, nem radikális sebészeti módszerekkel kezelt T2-es betegekhez viszonyítva. Komplett esemény: a páciens meghalt vagy a daganat kiújult. Cenzorált esemény: a páciens egyéb okból elhunyt, vagy véget ért az utánkövetési időszak. UCC (urothelial cell carcinoma): urothel sejtes carcinoma.

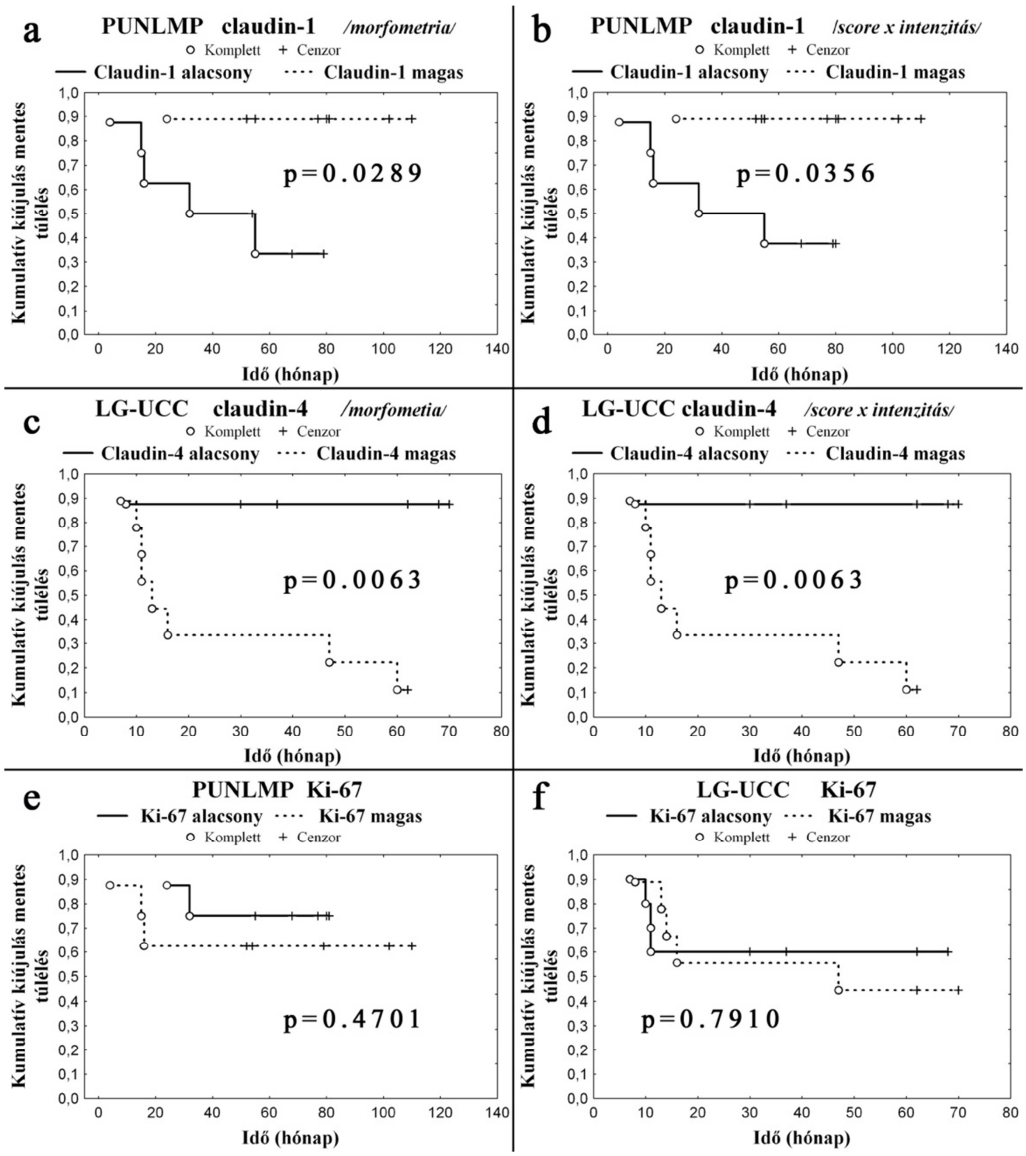
A felületes húgyhólyagdaganattal operált betegek utánkövetése

A felületes húgyhólyagdaganatok átlagos utánkövetése 59,79 (3-126) hónap volt. A vizsgálati idő alatt egy beteg hunyt el, de nem urológiai okra visszavezethetően. Két PUNLMP-től eltekintve az összes eset primer tumor volt. Összesen 20 LG-UCC, 20 PUNLMP, 18 papilloma és 15 invertált papilloma bizonyult alkalmasnak az utánkövetéses vizsgálatra. Recidiva 16 betegnél történt (10/20 LG-UCC; 6/20 PUNLMP), az átlagos KMT 21,43 (4-60) volt ezen esetekben. A papillomák és invertált papillomák nem újultak ki.

Két LG-UCC páciens kapott korai, a műtétet hat órán belül követő intravesicalis Mytomicin-C (MMC) instillációt. Tizenhárom beteg részesült 6 széria MMC (2 PUNLMP; 11 LG-UCC), míg 5 beteg kapott 6 széria Farmorubicin (2 PUNLMP; 3 LG-UCC) kezelést az első műtétet követően. Az invertált papillomák és a papillomák esetében nem volt műtétet követő kemoterápia. Nem találtunk szignifikáns összefüggést a kiújulás és a műtétet követő terápiák között, azonban azok a páciensek, akik posztoperatív instillációt kaptak, hosszabb KMT-sel rendelkeztek azokhoz a páciensekhez viszonyítva, akik nem részesültek posztoperatív kezelésben (22 hónap versus 16 hónap).

A Kaplan-Meier analízishez az egyes tumorcsoportokat kettéválasztottuk a claudin, a CK-5/6, a CK-20 és a Ki-67 expresszió (magi pozitivitás) alapján: az egyik csoport, amelyik magasan, a medián fölött expresszálja a claudinokat, a CK-5/6-ot, a CK-20-at vagy a Ki-67-et, míg a másik csoport, amelyik alacsonyan, a medián alatt expresszálja a claudinokat, a CK-5/6-ot, a CK-20-at vagy a Ki-67-et.

A claudin-1-et alacsonyan, azaz a medián alatt expresszáló PUNLMP-k szignifikánsan rövidebb KMT-t mutattak a Kaplan-Meier túlélés elemzésben (Log-Rank teszt; p=0,0289) a claudin-1-et magasan, a medián fölött expresszáló PUNLMP-khez képest (96. ábra a, b). A claudin-4-et magasan, a medián fölött termelő LG-UCC-k szignifikánsan rövidebb KMT-sel rendelkeznek (Log-Rank teszt; p=0,0063) a claudin-4-et alacsonyan, a medián alatt expresszáló LG-UCC-khez képest (96. ábra c, d). Claudin-2, -7, CK-5/6, CK-20 és a Ki-67 expresszió nem mutatott összefüggést a KMT-sel (96. ábra e, f).

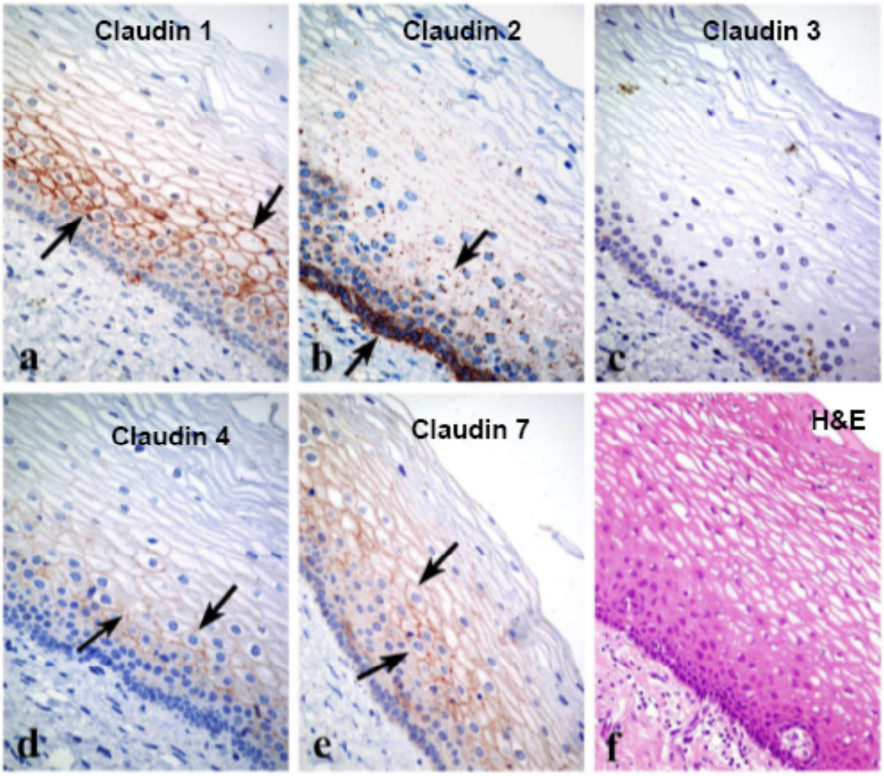


96. ábra KMT vizsgálat claudin-1, -4 és Ki-67 alapján PUNLMP-ben és LG-UCC-ben; a., b. ábra: KMT elemzés a claudin-1 fehérje expresszió alapján PUNLMP-ben; morfometria, score x intenzitás; c., d. ábra: KMT analízis claudin-4 expresszió alapján LG-UCC-ben; morfometria, score x intenzitás; e., f. ábra: KMT analízis Ki-67 magi pozitivitás alapján PUNLMP-ben és LG-UCC-ben. Komplett esemény: a daganat kiújult; Cenzorált esemény: az utánkövetés véget ért vagy a páciens halála vagy az utánkövetési időszak vége miatt; KMT: kiújulás mentes túlélés.

IV.2.2. Claudin expresszió cervix tumorokban, valamint az endometrium daganatokban

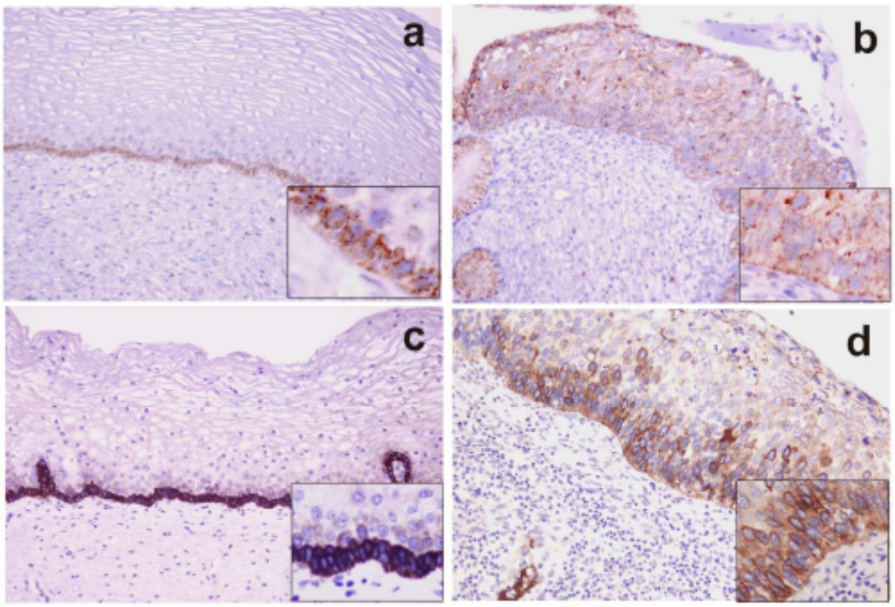
IV.2.2.1. Claudin, occludin és syndecan-1 expresszió normál cervicális hámban és cervix tumorokban

A claudin expresszió a normális cervicalis laphámban: A claudin fehérje expresszió a normál cervicalis laphámban egyedi mintázatot mutatott. A *claudin-1* IHK reakció erőteljes, „lépesmézszerű" membránpozitivitást mutatott a parabasalis és intermedier rétegekben. A felszín felé csökkent a reakció intenzitása és a szuperficiális rétegben a basalis sejtréteghez hasonlóan nem volt a festődés detektálható (97. ábra a). A *claudin-2* a basalis sejtrétegben mutatott intenzív, granularis, perimembranosus, citoplazmatikus reakciót. A parabasalis sejtrétegben már gyengébb festődés volt látható és a hám felszíne felé haladva csak elszórtan volt detektálható reakció (97. ábra b). *A claudin-3* IHK reakció minden szövetrétegben negatív volt **(**97. ábra c). A *claudin-4* és a *claudin-7* reakció lokalizációjában és intenzitásában nagyfokú hasonlóságot mutatott a claudin-1 elleni antitest esetében talált festődéshez, amennyiben membranózus, „lépesmézszerű" pozitivitás volt a szuprabasalis és az intermedier réteg alsó felében, míg a basalis sejtréteg negatívnak bizonyult. Összességében a claudin-7 IHK reakció erősebb volt, mint a claudin-4-é. A szuperficiális rétegben nem volt festődés (97. ábra d, e).



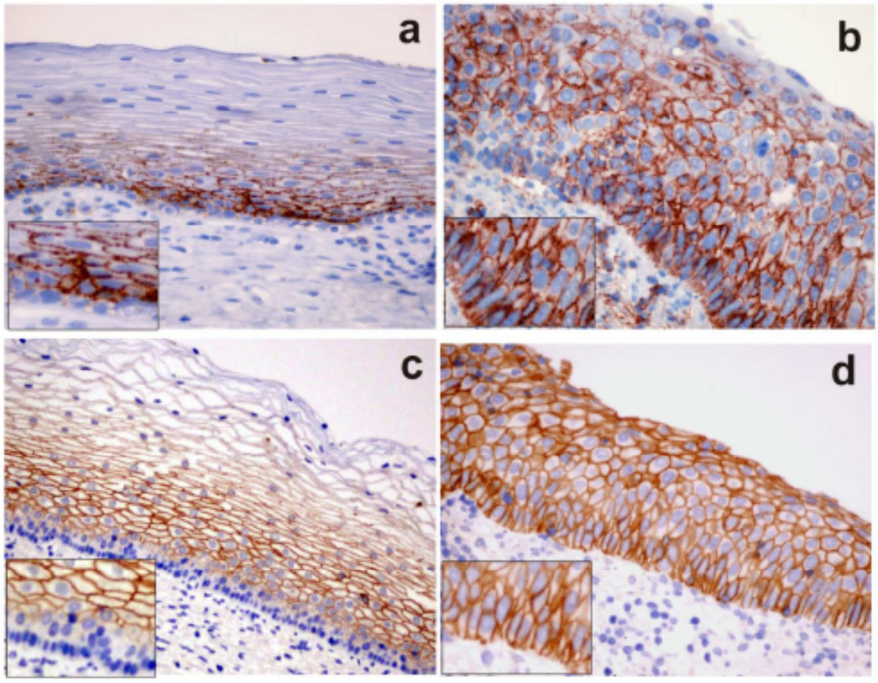
97. ábra Claudin expresszió lokalizációja normál méhnyakhámban. a:claudin-1, b:claudin-2, c:claudin-3, d:claudin-4, e:claudin-7, f: H&E festés. A claudin-1, -4, -7 elleni reakció membranózus festődést mutat a parabasalis és intermedier rétegben. A claudin-2 (b) granularis, citoplazmatikus reakciót, elsősorban a basalis rétegben. A nyilak a pozitívitást jelzik (400 x).

Occludin és syndecan expresszió a normális cervicalis laphámban



98. ábra A claudin-2 (a,b) és occludin (c,d) a normális hámban a basalis sejtrétegben detektálható (a,c). A CIN III/CIS léziókban mindkét fehérje expressziója kiterjedt a hám teljes rétegére, az occludin reakció azonban fokális jellegű (d), míg a claudin-2 diffúz (b). 200 x, betét 400 x.

Az occludin a claudin-2-vel összehasonlítva a normális hám basalis rétegében igen erős linearis membranózus reakciót adott (98. ábra a), míg a felsőbb rétegek negatívnak bizonyultak (98. ábra c). A syndecan-1 a normál cervicalis laphámban lineáris, membranosus IHK reakciót adott. A parabasalis és az intermedier sejtrétegek intenzíven festődtek, de a reakció negatív volt a basalis és a superficiális rétegben (99. ábra a).

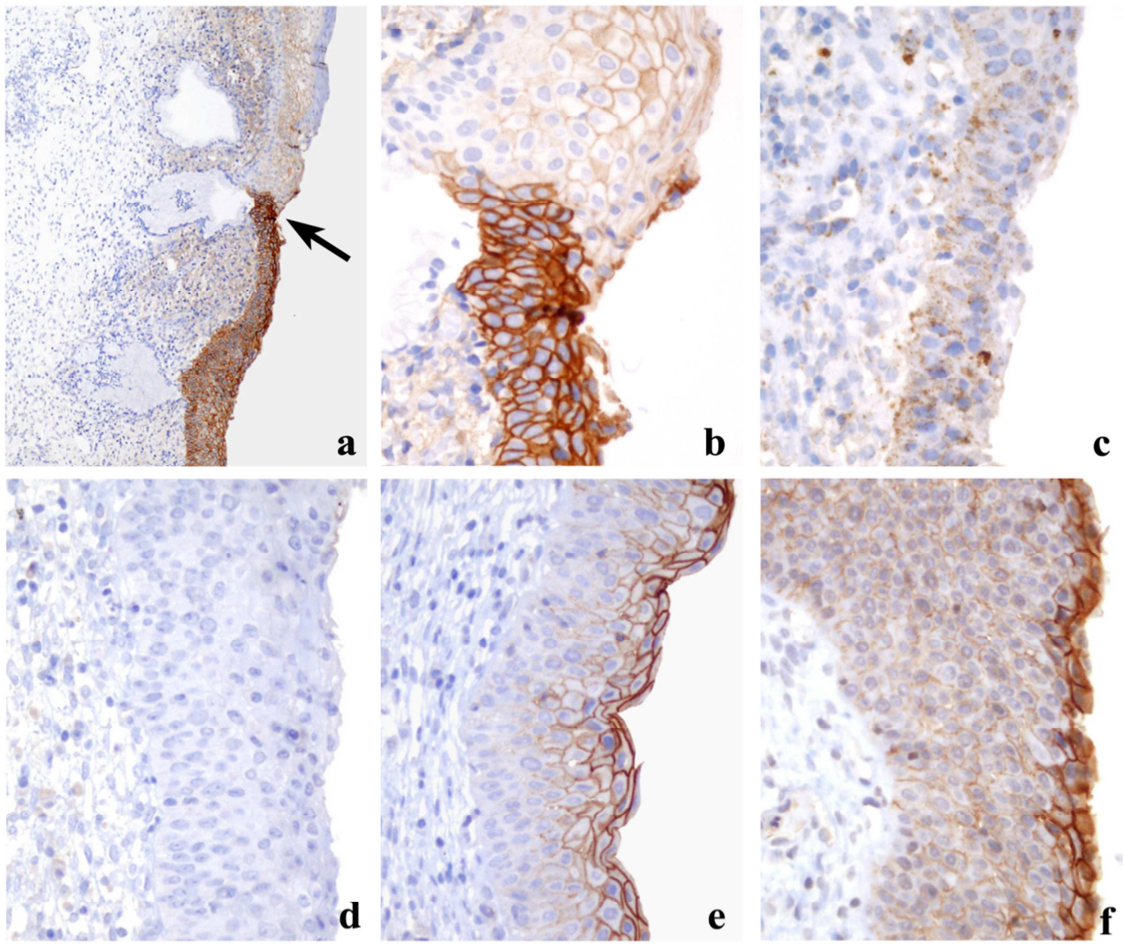


99. ábra A syndecan-1 (a,b) és claudin-1 (c,d) expressziója normális hámban (a,c) és CIN III-ban (b,d). A normális hámban a két fehérje hasonló membranózus festődést mutat, a parabasalis és intermedier rétegben lokalizálódik és nem érinti a basalis réteget. A CIN léziókban mindkét fehérje kiterjedten expresszálódik a kóros sejtek felszínén. 200 x, betét 400x.

Claudin, occludin és syndecan expresszió cervicalis intraepitheliális neoplasiában és cervix carcinomában

Claudin expresszió a cervicalis intraepithelialis neoplasiában (CIN I-III, CIS)

A CIN stádiumaiban a *claudin-1* fehérje expresszió igen kifejezett növekedése volt detektálható IHK-val. A festődés a normál hámhoz hasonlóan lineáris, membranózus volt, azonban a reakció intenzitása megnövekedett. A CIN elváltozást erős pozitívása élesen elkülönítette az ép laphámtól és a festődésre negatív cervicalis mirigyektől **(**100. ábra**).** A claudin-1 expresszió mértéke a progresszió előrehaladásával, az egyre magasabb sátdiumokban növekedett. Míg a CIN I-II-ben a hám mintegy két harmada reagált, a CIN III-ban és a CIS-ben gyakorlatilag minden hámsejt erősen pozitivitást mutatott **(**100. ábra**).** A normális hám basalis rétegének claudin-1 negativitásával szemben a CIN léziókban a hám basalis sejtrétege már a korai léziókban is intenzíven festődést mutatott.



100. ábra Claudinok fehérje expressziója CIN III/CIS-ben. A claudin-1 IHK a diszplasztikus hám teljes vastagságára kiterjedő intenzív pozitív reakciót ad, élesen elkülönül a normál hámtól (a, b, nyíl). A claudin-2 granuláris citoplazmatikus reakciója a lézió csaknem minden sejtjrétegében látható, azonban a festődés intenzitása kisebb (c). A claudin-3 negatív (d). A claudin-4 reakció is a normál hámhoz képest a CIN-ben kiterjedt, elsősorban a hám felsőbb rétegeiben látható festődés (e). A claudin-7 IHK reakció a hám teljes szélességében intenzíven pozitív (f). a:100 X, b-e: 400 X.

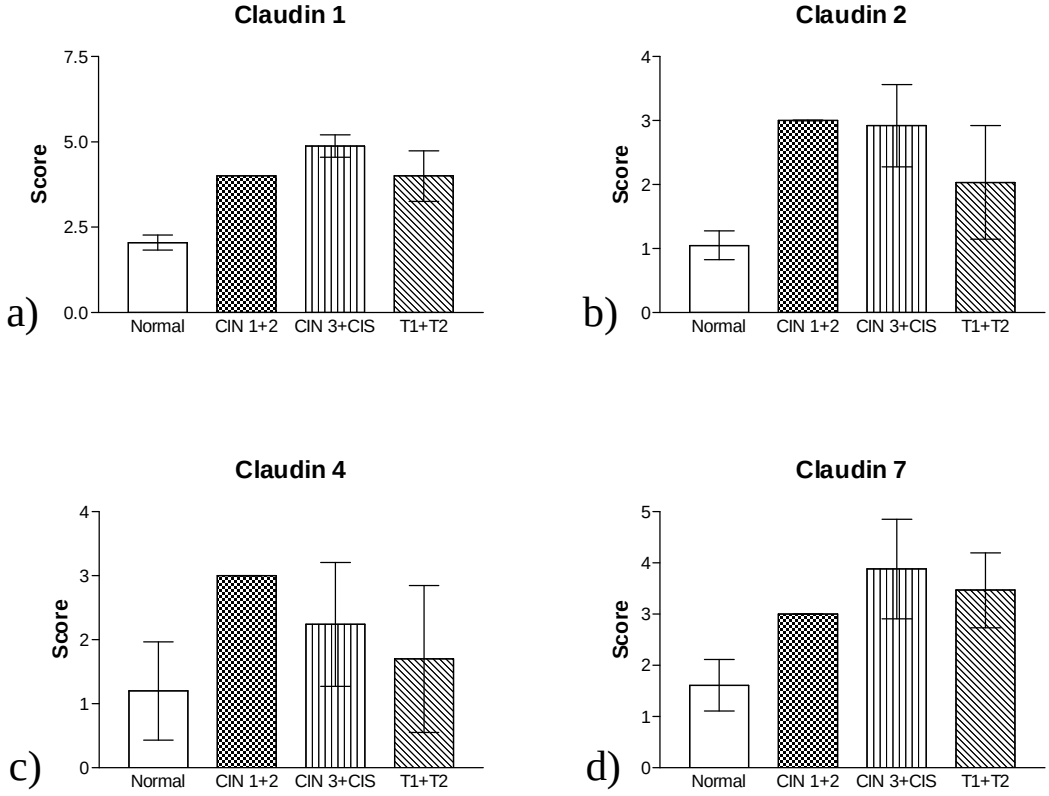
A szemikvantitatív kiértékelést elemezve a claudin-1 fehérje expresszió szignifikánsan magasabb volt a CIN I-II-ben, (átlag.4,00+/-0) és CIN III/CIS-ben (átlag 4,88+/-0,33) a normál laphámhoz képest (átlag 2,05 +/- 0,22), P<0,0001 **(** 26. táblázat**,** 101. ábra**).** A *claudin-2* expressziója szintén kiterjedt volt a különböző CIN léziókban. A normális hám basalis sejtrétegének festődéséhez képest a CIN fokozataiban a hám felsőbb rétegeire is kiterjedt a jellemzően granularis reakció. A reakció intenzitása ugyanakkor kissé csökkent **(**100. ábra c). Statisztikailag elemezve a CIN I-II, illetve CIN III/CIS léziókban szignifikánsan magasabb claudin-2 fehérje expresszió volt látható, mint a normál hámban. Érdekes módon a CIN I-II és CIN III/CIS között a különbség nem bizonyult szignifikánsnak **(**26. táblázat**,** 101. ábra**)**

26. táblázat A claudinok szemikvantitatív értékelésének eredményei.

	Cl 1	**Cl 2**	**Cl 4**	**Cl 7**
Normal - CIN 1+2	2,05-4,0 p<0,0001	1,05-3,00 p<0,0001	1,2-3,0 p<0,0001	1,61-3,0 p<0,0001
Normal - CIN 3+CIS	2,05-4,88 p<0,0001	1,05-2,92 p<0,0001	1,2-2,24 p=0,001	1,61-3,8 p<0,0001
Normal - Inv T1 + T2	2,05-4,0 p<0,0001	1,05-2,03 p<0,0001	1,2-1,7 NS	1,61-3,47 p<0,0001
CIN 1+2 - CIN 3+CIS	4,0-4,88 p<0,0001	3,01-2,92 NS	3,0-2,24 p=0,0019	3,0-3,8 p=0,0016
CIN 1+2 - Inv T1 + T2	4,0-4,0 NS	3,01-2,03 p<0,0001	3,0-1,7 p<0,0001	3,0-3,47 p=0,0121
CIN 3+CIS - Inv T1 + T2	4,88-4,0 p<0,0001	2,92-2,03 p=0,0006	2,24-1,7 NS	3,8-3,47 NS

CIN: cervicalis intraepithelialis neoplasia, inv: invazív carcinoma T1, T2, Cl: claudin, NS: nem szignifikáns

dc_1040_15



101. ábra A claudin-1, -2, -4 és -7 szemikvantitatív értékelésének összehasonlító ábrázolása. A claudinok expressziója növekszik a CIN, CIS léziókban. Az IHK reakció a CIN III/CIS léziókban a legintenzívebb. A CIN-III/CIS-hoz képest az invazív carcinomákban csökken a claudinok expressziója, azonban így is magasabb, mint a normál hámban.

A *claudin-3* a normál cervix laphámhoz hasonlóan nem volt kimutatható a CIN elváltozásokban (100. ábra d). A membranózus *claudin-4* IHK reakció intenzitása fokozatosan növekedett a szuperficiális rétegek felé (100 ábra e). A *claudin-4* expresszió a CIN I-II és a CIN III/CIS léziókban szignifikánsan magasabb volt a normál hámhoz képest. A CIN I-II-höz képest a CIN III/CIS is szignifikánsan csökkent expressziót mutatott **(**26. táblázat**,** 101. ábra). A *claudin-7* a claudin-1-hez hasonló jellegzetes membranózus reakciót adott a szöveten belüli elhelyezkedésében és intenzitásában. Jellemzően a festődés már a hám alsó rétegében is megjelent a praemalignus léziókban (100. ábra f). A normális hámhoz képest a CIN léziókban a hám egyre nagyobb százaléka mutatott pozitivitást. Szignifikánsan nagyobb volt az expresszió a CIN I-II-ben, illetve CIN III/CIS-ban. A CIN III/CIS-ben is szignifikánsan magasabb expresszió volt észlelhető IHK-val a CIN I-II-höz képest **(**26. táblázat**,** 101. ábra**).**

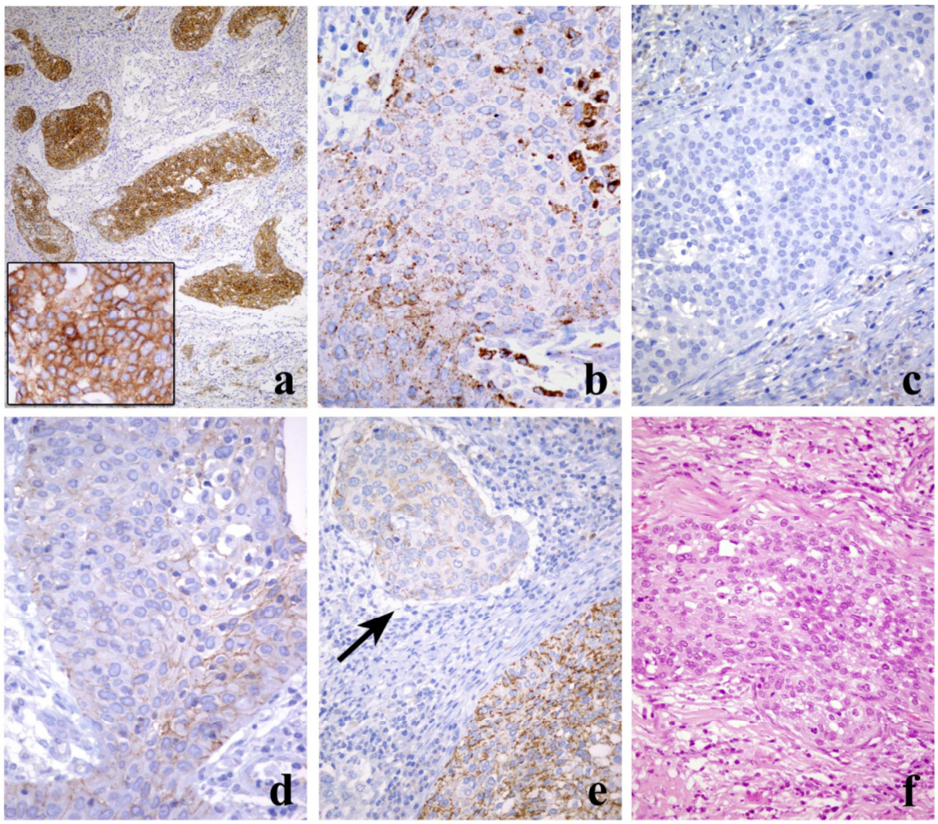
Claudin expresszió invazív cervicalis laphám carcinomában

A normál cervicalis laphámban detektált claudinok mindegyike (claudin-1, -2, -4, -7) fokozottabban expresszálódott invazív carcinomában, de a festődés jellege és szöveten belüli lokalizációja nem változott (101. ábra, 102. ábra a, b, d, e). A claudin-1, -2 és -7 esetében a különbség szignifikánsnak bizonyult (26. táblázat, 101. ábra). A claudin-4 esetében a csökkenés a CIN I-II-vel összevetve szignifikáns, de a CIN III/CIS-hez képest nem bizonyult szignifikánsnak

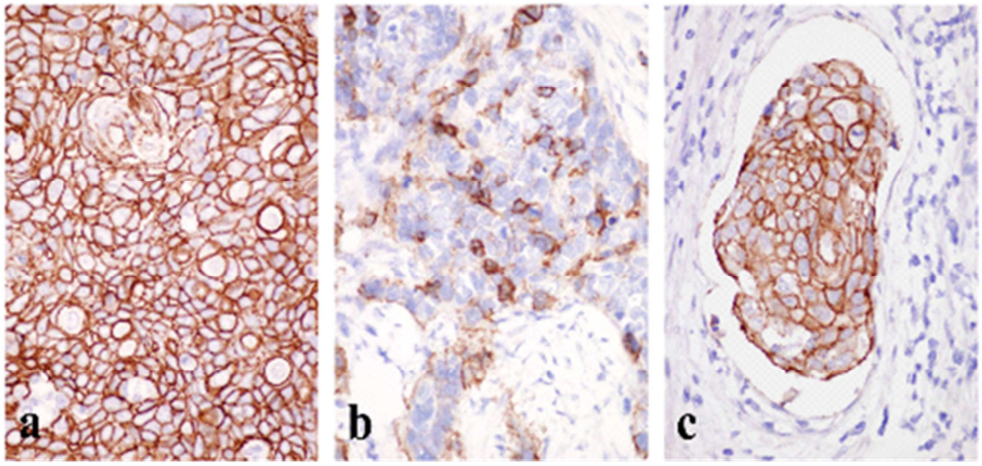
(26. táblázat). A claudin-3 a normális cervixhámhoz és a CIN/CIS léziókhoz hasonlóan a carcinomában sem expresszálódott (102. ábra c).

A claudin expresszió az egyes carcinomák különböző területein heterogénnek bizonyult. A pozitívan reagáló sejtekben intenzív reakció volt látható (102. ábra a, b, 103. ábra a), különösen a claudin-1 esetében, amely még a limfatikus invázió során sem változott (103. ábra c). Más területeken azonban csak a tumorsejteknek kisebb csoportjai termelték a claudinokat, míg egyes sejtek negatívak voltak (103. ábra b). A fokális expresszió minden esetben megfigyelhető volt és nem volt különbség sem a tumor (T) kategória, sem a szövettani típusok (keratinizáló vagy nem keratinizáló) között.

Összefoglalva elmondható, hogy a normál cervix hám jellegzetes claudin fehérje expressziós mintázattal rendelkezik és a normál hámhoz képest a claudin-1 és -7 fehérje expresszió szignifikáns növekedését észleltük a cervix praemalignus intraepitheliális (CIN) lézióiban és az invazív méhnyakrákban is. A cervix intraepitheliális neoplásiái tehát egyes claudinok megnövekedett expresszióját mutatják, mely expresszió csökkenését észleltük az invazív fenotípus kialakulásakor. A praemalignus állapotokban a claudin-1 expressziója mutatta a legerőteljesebb növekedést és a CIN diagnosztikus markereként szolgálhat.



102. ábra Inhomogén claudin expresszió az invazív carcinomákban. Egyes tumorokban a claudin-1 erős reakciója még az invázió során is megtartott (a). A claudin-2 reakciója gócos (b). A claudin-3 IHK reakció negatív (c). A claudin-4 reakciója az invazív tumorokban csökken, különösen az inváziót mutató területeken (d). A claudin-7 az ábrán látható intraepithelialis lézióban még erősen pozitív, de az inváziót mutató sejtekben jelentősen lecsökkent termelődést mutat (e, nyíl). H&E (f). a: 100 x, betét: 400x, b-d: 400 x nagyítás.

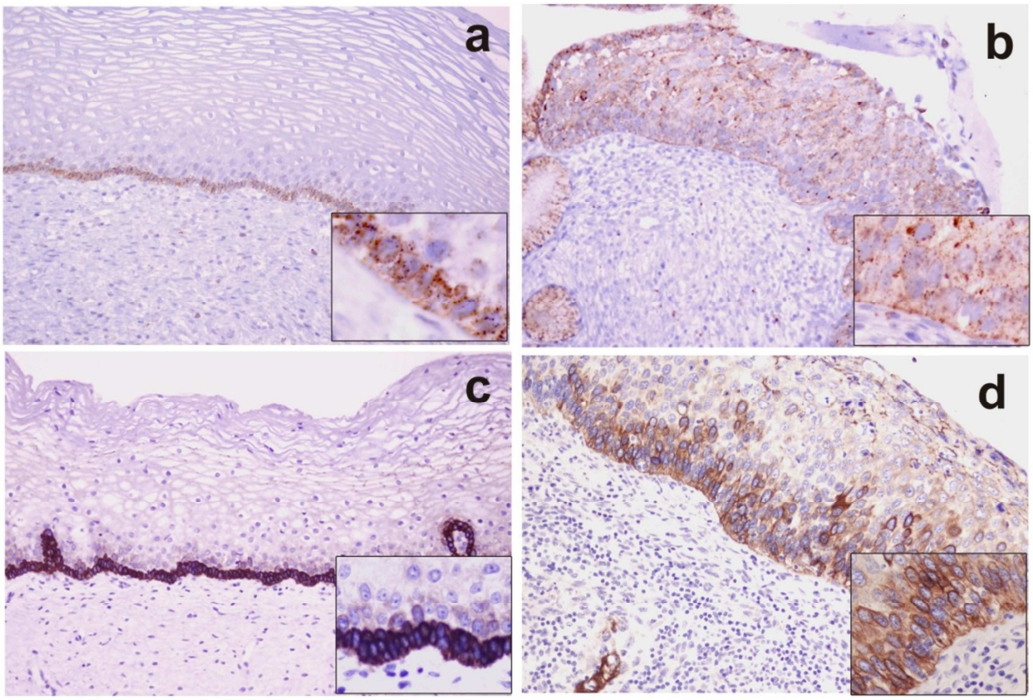


103. ábra A claudin-1 IHK reakció számos invazív tumorban intenziv festődést, „lépesmézszerű „ rajzolatot mutat (a), míg más tumorokban csak egyes sejtek expresszálják a fehérjét (b). Több helyütt az erős claudin-1 expresszió a lymphogén invázió területén is megmarad (c). 400 x.

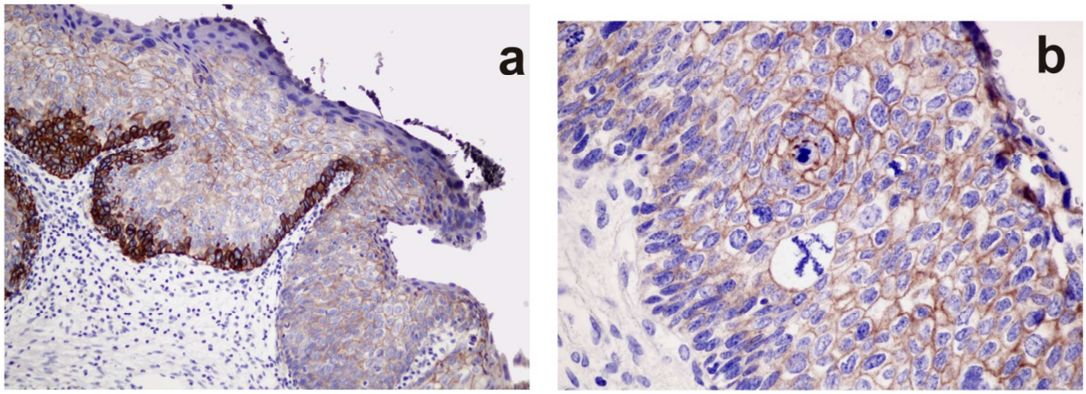
Az occludin és a syndecan-1 expresszió vizsgálata cervix tumorokban

Occludin expresszió

A normál laphámhoz képest a CIN léziókban csökkent a festődés intenzitása, de a lézió nagyobb százalékát érintette, kiterjedtebb volt, de fokális jellegűvé vált. Pozitív területek sejtcsoportjai váltakoztak negatív területekkel (104. ábra d, 105. ábra a, b). CIN III-ban a claudin-2 reakció a hám teljes szélességére kiterjedt (104. ábra b).



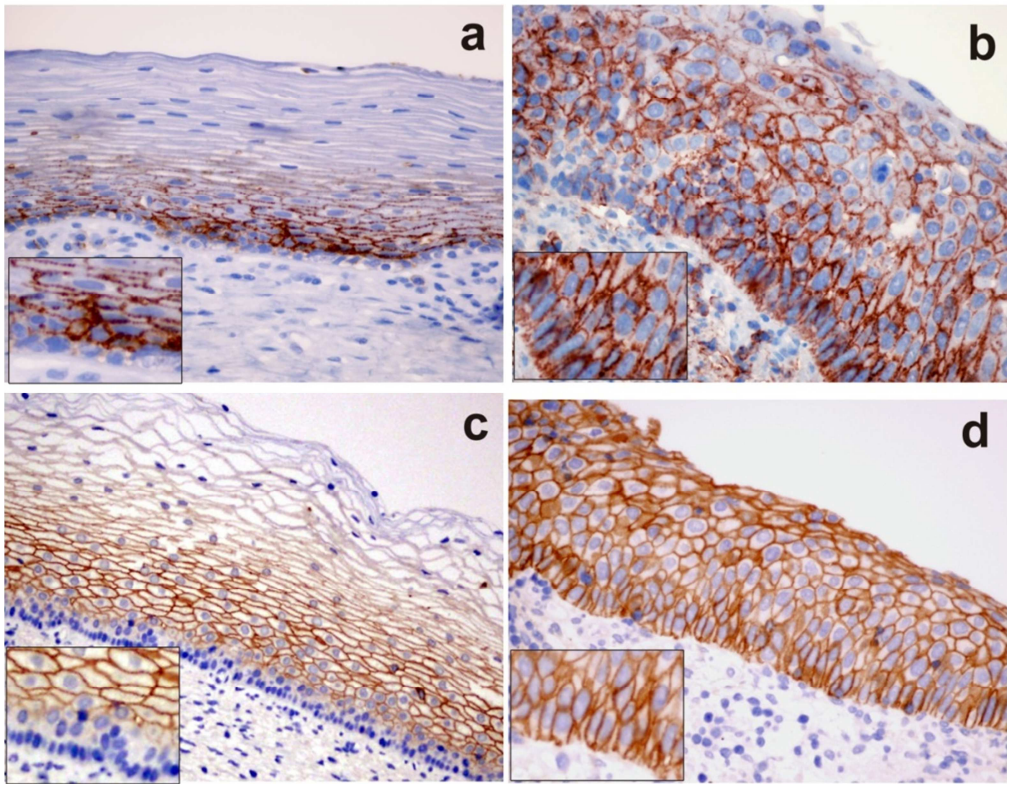
104. ábra A claudin-2 (a,b) és occludin (c,d) a normál hámban a basalis sejtrétegben mutatható ki (a,c). A CIN III/CIS léziókban a claudin-2 (a,b) és az occludin fehérje termelődése és kimutathatósága kiterjedt a hám teljes rétegére, az occludin IHK reakció azonban fokális jellegű volt (d), míg a claudin-2 reakció diffúznak bizonyult (b). 200 x, betét 400 x-s nagyítás.



105. ábra Occludin fehérje expresszió CIN II-ben (a). A basalis sejtréteg erősen pozitív, de az intermedier rétegekben is megjelenik a kisebb intenzitású reakció. A CINIII/CIS-ben (b) fokális és változó erősségű az occludin festődés. 200x, 400x.

Syndecan-1 fehérje expresszió

A CIN I-II, és CIN III/CIS léziókban a syndecan-1 a normál hámhoz hasonló, membranosus, erős reakciót adott, azonban a diszplasztikus hámon belül kiterjedtebb volt, a felsőbb rétegek is pozitivitást mutattak (106. ábra b). Negatív területek előfordultak, jellemzően az előrehaladottabb CIS elváltozásokban (106. ábra b). A reakció lokalizációja és mintázata mind a normális cervicalis hámban (106. ábra c), mind a CIN III/CIS-ben (106. ábra d) hasonlónak mutatkozott a claudin-1 reakciónál észleltekhez. Az előzőekben leírtaknak megfelelően tehát a syndecan-1 reakció jellege a claudin-4 és -7 festődéshez is hasonló volt. A claudinok festődési erőssége a syndecan-1-hez képest gyengébb volt a CIN/CIS léziókban.



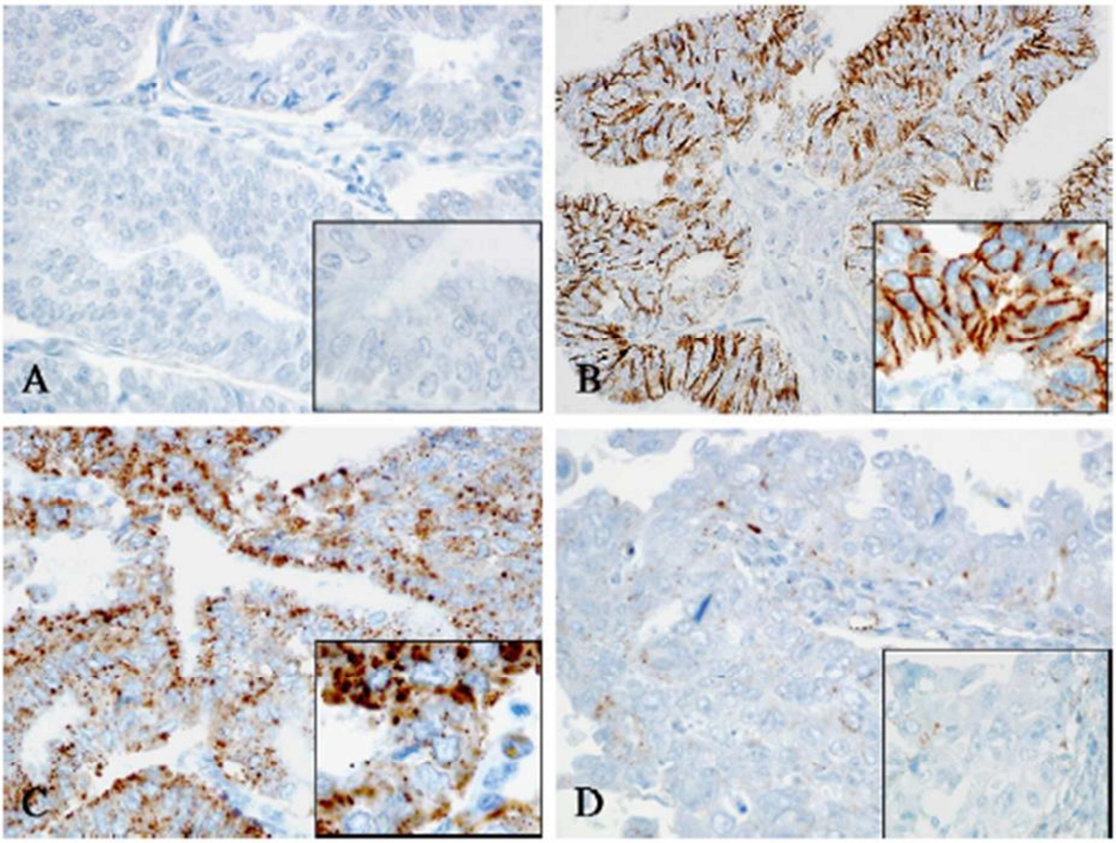
106. ábra A syndecan-1 (a,b) és claudin-1 (c,d) fehérje expressziója normál hámban (a,c) és CIN III-ban (b,d). A normál hámban a két fehérje hasonló jellegű membranózus festődést mutat, mely a parabasalis és intermedier rétegre lokalizálódik, a basalis réteg negatív. A CIN léziókban mindkét fehérje kiterjedt membranosus expressziót mutat a diszplasztikus hámban. 200 x, betét 400x.

Összefoglalva: az occludin, syndecan-1 és claudinok fehérje expresszióját összehasonlítva az következő megállapításokat tehetjük. A *normál cervicalis laphámban* az occludin és a claudin-2 fehérje egyaránt a basalis rétegben lokalizálódott, míg a syndecan-1 és a claudin-1, -4 és -7 termelődés a parabasalis és intermedier rétegben volt kimutatható. A normál cervicalis mirigyhámban nem mutatható ki IHK-val claudin-1, claudin-3 és occludin, míg egyértelmű claudin-2 és gyengébb claudin-4 és -7 pozitivitás látható. Az *occludin* IHK reakció intenzitása *ugyan összeségében csökkent a CIN/CIS léziókban*, azonban a claudinokhoz hasonlóan a festődés kiterjedt a hám felső rétegeire is, de helyenként fokális jellegűnek mutatkozott. Ezek szerint az occludin lokalizációja a CIN/CIS elváltozásokban eltér a claudin-2 expressziójától, mely a hám minden rétegében diffúzan megfigyelhető volt CIN III/CIS esetében. A *syndecan-1* expresszió, mely a normál hámban hasonló volt a claudin-1, -4 és -7 reakcióhoz, a CIN léziókban eltért attól. Míg a claudinok expressziója a CIN/CIS léziókban progresszíven nőtt, a diszplasztikus hám teljes szélességére kiterjedt, addig a syndecan-1 expresszió csökkent a CIN progressziójával. Ezen adatok összeségében azt mutatják, hogy az egyes TJ protein alkotórészek és a syndecan-1 eltérő expressziós mintázatot, illetve változásokat mutat a cervix carcinogenesis során. *Az occludin fehérje expresszió intenzitása és mértéke a syndecan-1 változásához hasonlóan csökken a CIN/CIS elváltozásokban, mely ellentétben áll a claudinoknak a méhnyak praeinvazív lézióiban észlelt progresszíven növekvő termelődésével.*

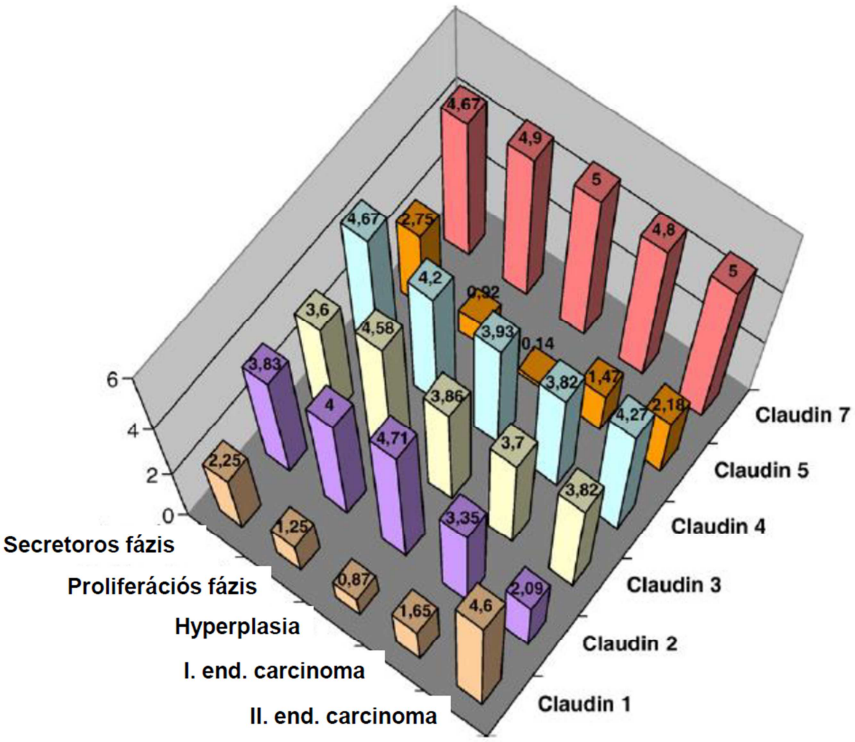
IV.2.1.2. Claudin expresszió endometrium tumorokban

Immunohisztokémia: A claudin-1, -3, -4, -5 és -7 IHK reakció lineáris memnbránpozitivitást adott (107. ábra B), A claudin-2 IHK jellemzően egy a sejt perifériás részén elhelyezkedő, granuláris jellegű, membrán asszociált citoplazmatikus reakciót eredményezett (107. ábra C). A pozitív sejtek számában azonban a vizsgált minták között szignifikáns különbség mutatkozott (107. ábra, 108. ábra, 109. ábra, 27. táblázat). Szignifikáns különbségeket detektáltunk a nem tumoros endometrium minták között is: a claudin-1 expresszió a legerősebbnek a sekretoros endometriumban mutatkozott, mind a proliferációs fázishoz, mind pedig a hyperplasiához képest (108. ábra, 27. táblázat). A legszignifikánsabb különbséget a seropapilláris és endometrioid típusú endometrium tumorok között találtuk (107. ábra A, B). A claudin-1 a legerősebb festődést egyértelműen a seropapilláris endometrium adenocarcinomában adta (II típus), melyhez képest az I. típusú endometrioid endometrium carcinoma igen kis mértékű pozitivitást vagy negativitást mutatott (107. ábra B, 108. ábra, 109. ábra, 27. táblázat). A claudin-2 immunhisztokémiai vizsgálat szintén egyértelműen szignifikáns, de fordított különbségeket talált (107. ábra C, D, 108. ábra, 109. ábra, 27. táblázat). A nem tumoros mintákhoz hasonlóan az I. típusú, azaz endometrioid endometrium carcinoma (107.

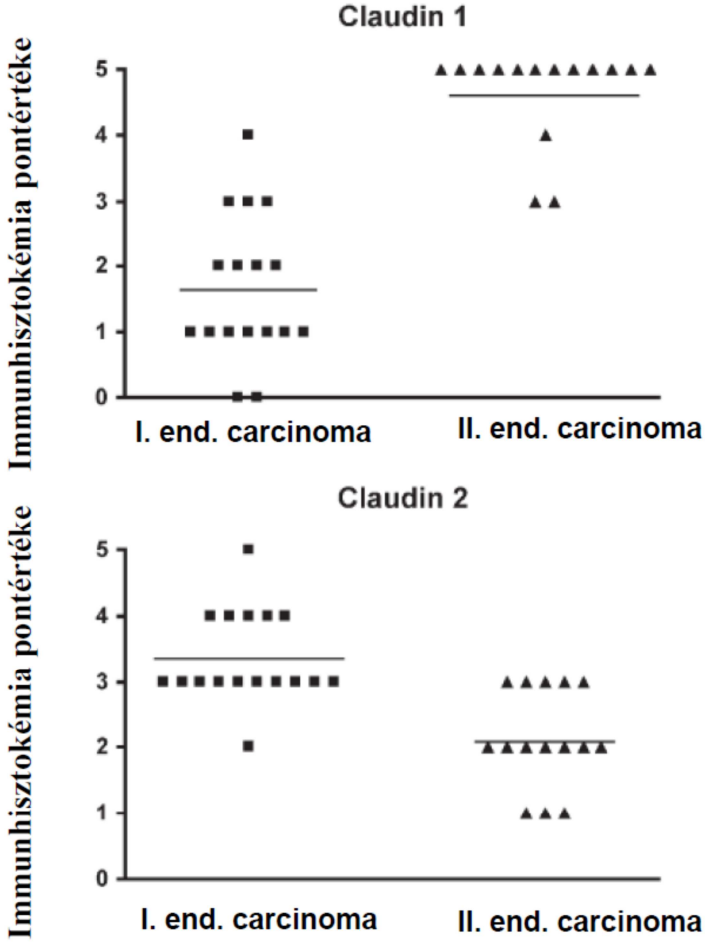
ábra C) erős claudin-2 reakciót mutatott, ellentétben a seropapilláris típus (II-es típus) igen gyenge pozitivitásához vagy negativitásához képest (107. ábra D). A claudin-3, -4, és -7 reakcióban (108. ábra, 27. táblázat) nem, vagy csak igen kis különbségek mutatkoztak, míg a nem tumoros mintákban a claudin-5 szignifikánsan magasabb expressziót adott a sekretoros fázisban, mint bármely egyéb vizsgált csoportban (108. ábra, 27. táblázat), azonban a claudin-5 expresszió tekintetében a két carcinoma típus nem mutatott eltérést. Az ösztrogén és progesteron receptorok, a p53 és a PCNA a pozitív mintákban magi lokalizációt mutattak. Az endometrioid carcinoma szignifikánsan magasabb szinten termelte az ösztrogén és progeszteron receptorokat a seropapilláris carcinomában (28. táblázat) ($P < 0,01$ és $P < 0,001$, a felsorolás sorrendjében). A seropapilláris carcinoma a p53 és PCNA magi pozitivitás szignifikáns emelkedését mutatta az endometrioid carcinomához képest (28. táblázat, $P < 0,01$ és $P < 0,001$). A β-catenin festődést mindkét endometrium carcinoma típusban membranosus formában észleltük (28. táblázat). Magi β-catenin reakciót egyik tumortípusban sem detektáltunk, pozitív kontrollként a korábbiakban leírt hepatoblastoma eseteinket használtuk. Igen erős citoplazmatikus reakciót, magi festődés nélkül azonban négy endometrioid carcinoma esetben kimutatható volt.



107. ábra A claudin-1 (A, B) és claudin-2 (C, D) immunhisztokémiai kimutatása endometrioid carcinomában (I. típus) (A, C) és seropapilláris carcinomában (II. típus) (B, D). Nagyítás: 600× és képbetétekre: 1000×



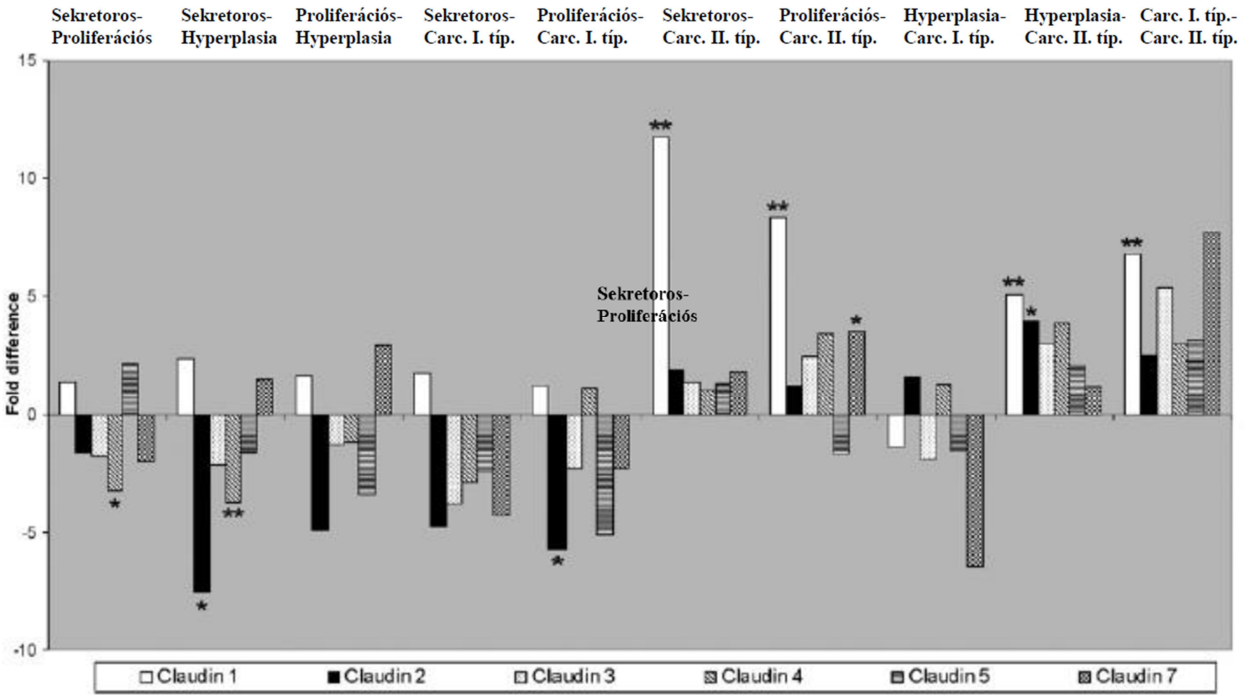
108. ábra A claudinok immunhisztokémiai pozitivitás kiértékelési pontrendszerének összehasonlítása az I. típusú endometrioid és a II. típusú seropapilláris endometrium carcinoma, valamint az endometrium hyperplasia és a proliferációs és secretoros endometrium csoportok között.



109. ábra Az I. típusú endometrioid és a II. típusú seropapilláris endometrium carcinoma esetek claudin-1 és -2 immunhisztokémiai reakció kiértékelésének egyedi pontértékei. A vízszintes vonalak a csoportok átlagértékeit jelzik.

Real-time PCR reakció az mRNS expresszió mérésére: A claudin-1 mRNS expresszió a seropapilláris carcinomában (II. típus) szignifikánsan magasabb volt az endometrioid carcinoma típushoz (I. típus), valamint a proliferációs és hyperplastikus endometriumhoz képest (110. ábra). Érdekes módon a claudin-2 expresszióban nem találtunk különbséget a két tumortípus között, csak a secretoros és hyperplastikus endometrium között mutatkozott szignifikáns eltérés a hyperplastikus endometrium javára (110. ábra). A sekretoros és a proliferációs fázisok a claudin-4 expresszióban különböztek, mely 3,2-szeresen ($P < 0,05$) magasabb volt a secretoros fázisban. A szekréciós fázishoz képest a hyperplasiában a claudin-2 és -4 expresszió szignifikáns csökkenést mutatott (7,5- és 3,7-szeres csökkenés; $P < 0,05$ és $P < 0,01$, a felsorolás sorrendjében), míg a claudin-7 mRNS expresszió 2.9-szeres emelkedést mutatott a proliferációs fázisban a II. típusú endometrium carcinomához képest.

Az endometrioid carcinoma nem különült el a claudin mRNS expresszió alapján a hyperplasiától. A seropapilláris endometrium carcinoma claudin mRNS expressziós profilja a normál és hyperplastikus endometriumtól jól elkülöníthető volt, a legjobban a tumor magas claudin-1 mRNS expresszió alapján, mely a normál endometrium hámhoz (11,8-szeres emelkedés a secretoros és 8,3-szoros emelkedés a proliferációs fázsihoz képest, $P < 0,01$) és a hyperplasiához képest is (5-szeres különbség, $P < 0,01$) szignifikánsan magasabb értéket mutatott. A seropapilláris carcinoma ezen kívűl a proliferációs fázishoz képest emelkedett claudin-7 mRNS expressziót (3,5-szoros emelkedés) és a hyperplázióhoz képest magasabb claudin-4 expressziót (3,8-szeres növekedés) is mutatott. A claudin-1 fehérje és mRNS expresszió jól korrelált egymással a két endometrium carcinoma típus esetében, azonban a claudin-2 esetében nem volt kimutatható különbség az mRNS expresszióban, bár a seropapilláris típusú endometrium carcinoma a claudin-2 fehérje termelődésének csökkenését mutatta az endometrioid carcinomához viszonyítva.



110. ábra Claudin mRNS expresszió eredményei. Az értékek a csoportok közötti expressziós arányokat mutatják, a claudinok vagy túltermelődést up(U)- vagy csökkent termelődést down(D) mutatnak a csoportokat egymáshoz viszonyítva. (Példa: a claudin-1 mRNS fokozott expressziót mutat a II. típusú carcinoma csoportban az I. típusú carcinoma csoporthoz képest: 6756-szoros különbség). A szignifikancia szintek a következőek voltak: *P < 0,05, **P < 0,01.

27. táblázat Az endometrium minták immunhisztokémiai eredményeinek összeahasonlító statisztikai kiértékelése, szignifikancia szintek.

Versus	Claudin 1	Claudin 2	Claudin 3	Claudin 4	Claudin 5	Claudin 7
Sekretoros-proliferációs fázis	*	ns	**	ns	**	ns
Sekretoros fázis-hyperplasia	**	ns	ns	*	***	ns
Sekretoros fázis - I. típusú end. cc.	ns	ns	ns	**	**	ns
Sekretoros fázis - II. típusú end. cc.	***	**	ns	ns	ns	ns
Proliferációs fázis – hyperplasia	ns	ns	ns	ns	*	ns
Proliferációs fázis - I. típusú end. cc.	ns	*	*	*	ns	ns
Proliferációs fázis - II. típusú end. cc.	***	**	*	ns	ns	ns
Hyperplasia- I. típusú end. cc.	*	***	ns	ns	***	ns
Hyperplasia- II. típusú end. cc.	***	***	ns	*	**	ns
I. típusú end. cc.- II. típusú end. cc.	***	***	ns	**	ns	ns

* P<0,05
** P<0,01
*** P<0,001

Ns=nem szignifikáns cc. =carcinoma

28. táblázat Az I. és II. típusú endometrium carcinoma csoportokban kapott immunhisztokémiai eredmények összehasonlítása.

	Ösztrogén	Progeszteron	p53	PCNA	β-catenin
I. típusú end. carcinoma	66,47 ± 5,9	69,38 ± 7,1	11,31 ± 5,7	71,76 ± 3,2	4,7 ± 0,1
II. típusú end. carcinoma	27,27 ± 9,5	9,09 ± 6,7	63,18 ± 12,1	100 ± 0	3,68 ± 0,5
I. – II. típusú end. carcinoma	**	***	**	***	Ns

Az ösztrogén és progreszteron receptorok, a p53, a PCNA (proliferating cell nuclear antigen) és a β-catenin esetében a pozitív reakciót adó sejtek százalékos arányát jelöli. A négy, intenzív β-catenin cytoplasmatikus festődést adó I. típusú endometrium carcinoma esetet statisztikailag nem értékeltük.

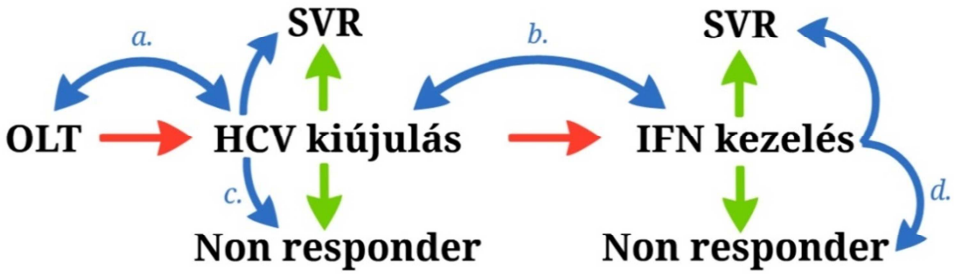
Az értékek feltüntetése: átlag ± standard hiba. Szignifikancia szintek a következőek voltak: **P < 0,01, ***P < 0,001, ns = nem szignifikáns

IV.3. MikroRNS expresszió vizsgálata HCV asszociált transzplantált májakban, steatosisban és májdaganatokban

IV.3.1. MikroRNS expresszió vizsgálata HCV asszociált májtranszplantációban

A klinikai adatok (vírustiter, HAI és Fibrózis score, szérum GOT, GPT, GGT) közül a vírustiter és a Knodell score esetében találtunk összefüggést a mikroRNS-ek expressziójával: a HCV rekurrencia idejében a medián feletti (>3,4x10^6 /ml) vírustiter esetén magasabb hepatikus miR-122 expressziót mértünk (relatív expresszió medián alatt 132.8±79 versus medián felett 2252.6±2663, p=0,025); a korrelációanalízis alapján a miR-221 expresszió negatívan korrelált a Knodell értékkel (r=-0,313, p=0,036).

A 111. ábra szerinti betegcsoportokban hasonlítottuk össze a mikroRNS mintázatokat.



111. ábra A mikroRNS expressziós mintázat összehasonlító vizsgálata a HCV cirrhosis által szükségessé vált májátültetések követése során tanulmányozott betegcsoportokban

Először (111. ábra a) a normál májszövetben mérhető miR expressziót vetettük össze a HCV rekurrenciakor vett minták miR expressziós mintázatával. A HCV kiújulásakor szignifikánsan magasabb miR-99a* és miR-224 expressziót, míg csökkent miR-21 és miR-194 termelődést találtunk a normál májszövethez képest (29. táblázat, 112 ábra a).

Ezt követően megvizsgáltuk, hogy az egy évig tartó antivirális terápiát (IFN/RBV) követően hogyan változik a miR expressziós mintázat a kezelés előtti, tehát a rekurrenciakor vett biopsziás mintában található profilhoz viszonyítva (111. ábra b). Ebben az összehasonlításban a kezelés után emelkedett miR-221, miR-224 és miR-217 expressziót találtunk (31. táblázat, 112. ábra b). Amennyiben ezt az összehasonlítást szűkítettük az SVR-t mutató betegekre, akkor az antivirális kezelés előtti profilhoz képest a kezelés után a miR-221 (0,664±0,82 kezelés előtt vs 6,728±10 kezelés után, p=0,017), és a miR-122 (1557,6±3005 kezelés előtt vs 11103,8±16666 kezelés után, p= 0,038) expressziója szignifikáns növekedést mutatott.

A terápiára jól (SVR) és rosszul (NR) reagáló betegcsoportok miR expressziós mintázatát is összehasonlítottuk. A kezelés előtti májbiopsziák vizsgált miR-jei közül **(**111. ábra c) egyiknek az expressziója sem mutatott szignifikáns összefüggést azzal, hogy a beteg a kezelés után a későbbi SVR vagy NR csoportba fog-e tartozni, tehát a a **HCV rekurrencia során vizsgált miR-ek közül egyik sem bizonyult prediktív értékűnek az antivirális kezelésre adandó klinikai válasz (SVR versus non-responder) tekintetében.** Az antivirális kezelés után azonban számos vizsgált miR expresszióját (miR-96, miR-99a*, miR-122, miR-181a-2*, miR-217 and miR-221) szignifikánsan emelkedettnek találtuk a tartós választ mutató SVR csoportban a non-responder (NR) csoporthoz képest (111. ábra d), (31. táblázat, 112/C. ábra).

29. táblázat MikroRNS-ek relatív expressziója a májszövetben a HCV kiújuláskor és donor máj „0" biopsziás normál májszövetében.

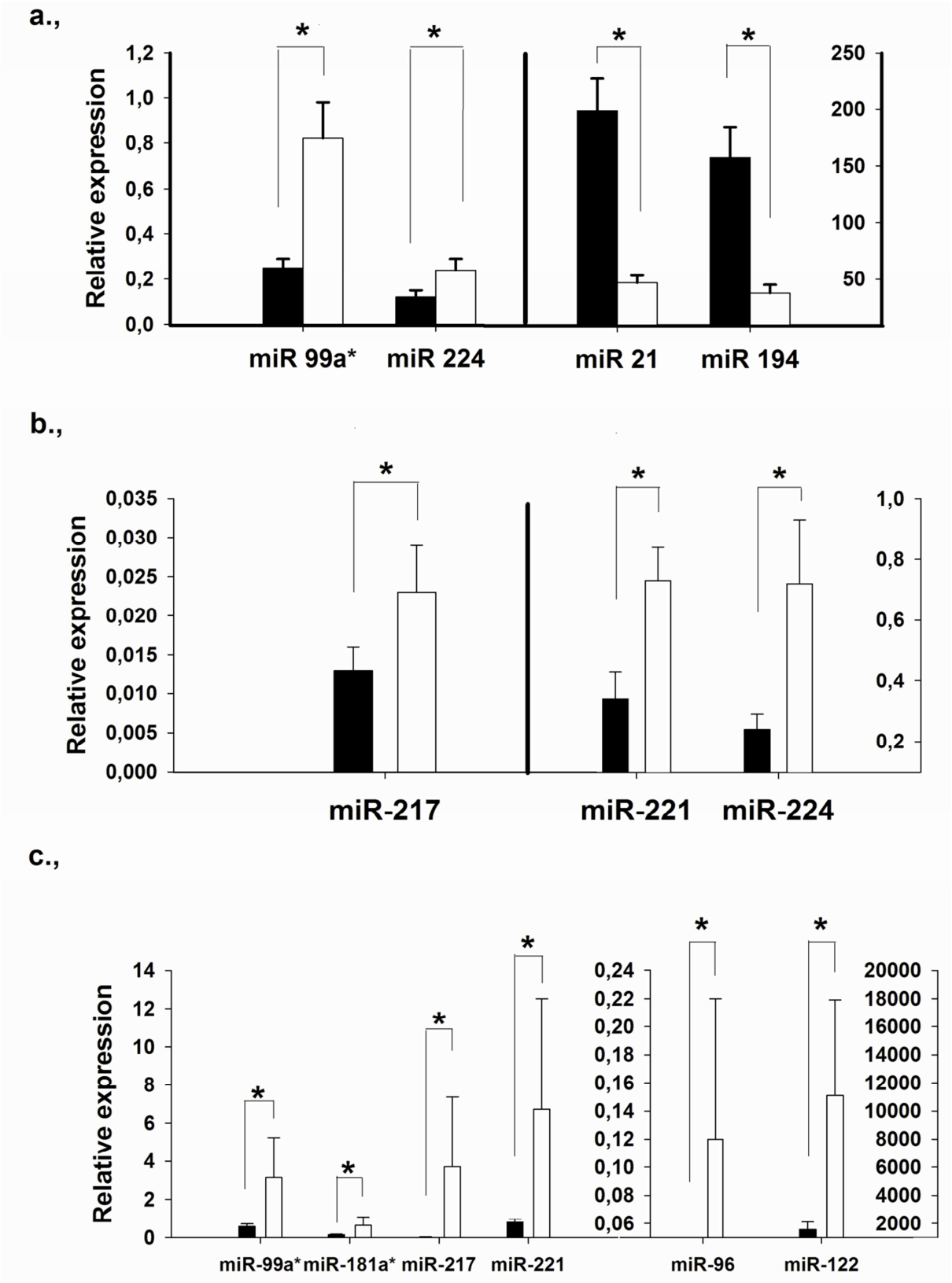
mikroRNS	Relatív expresszió		Átlag aránya (kiújulás/donor)	p érték
	HCV kiújulás	**Donor máj**		
miR-21	46,8±30,6	198,7±89,6	0,23	**<0,001**
miR-96	0,0018±0,0016	0,0045±0,0044	0,4	NS
miR-99a*	0,82±0,74	0,25±0,13	3,28	**0,002**
miR-122	1280±1910	2005±1586	0,63	NS
miR-125b	35,5±35,3	28,7±13,7	1,18	NS
miR-181a-2*	0,19±0,16	0,15±0,15	1,2	NS
miR-194	37,6±35,2	157,3±89,8	0,24	**<0,001**
miR-195	11,2±10,8	15±8	0,74	NS
miR-217	0,013±0,02	0,018±0,01	0,72	NS
miR-221	0,34±0,35	0,64±0,48	0,53	NS
miR-224	0,24±0,23	0,12±0,1	2,18	**0,039**

30. táblázat miR az antivirális kezelés előtt (HCV rekurrencia) és a kezelés után.

mikroRNS	Relatív expresszió		Átlag aránya (a/b)	p érték
	Kezelés után	**Kezelés előtt**		
miR-21	32,17±37,3	46,8±25,6	0,68	NS
miR-96	0,008±0,007	0,0018±0,0018	4,4	NS
miR-99a*	1,1±1,3	0,8±0,64	1,3	NS
miR-122	1219±1914	1280±1717	0,9	NS
miR-125b	43,8±42,3	35,5±36,8	1,2	NS
miR-181a-2*	0,26±0,27	0,19±0,18	1,3	NS
miR-194	46±38,2	37,6±36,4	1,2	NS
miR-195	7,86±9,9	11,2±11	0,7	NS
miR-217	0,023±0,02	0,013±0,1	1,77	0,042
miR-221	0,73±0,43	0,34±0,36	2,1	0,006
miR-224	0,72±0,88	0,24±0,2	3	0,022

31. táblázat MikroRNS expresszió összehasonlítása az antivirális kezelést követően SVR-t mutató és nem reagáló (NR) betegekben.

mikroRNS	Relatív expresszió		Mean ratio (SVR/NR)	p érték
	SVR	**NR**		
miR-21	70,1±110	30,8±36	2,3	NS
miR-96	0,12±0,18	0,006±0,005	20	**0,01**
miR-99a*	3,14±4,7	0,57±0,57	5,5	**0,034**
miR-122	11103,8±16666	1565,3±2039	7	**0,014**
miR-125b	14,4±12,4	39,2±43,4	0,36	NS
miR-181a-2*	0,63±0,76	0,14±0,19	4,5	**0,017**
miR-194	50,8±57,2	35,7±27,4	1,4	NS
miR-195	22,9±49,5	6,4±7,2	3,6	NS
miR-217	3,7±7,3	0,024±0,025	185	**0,045**
miR-221	6,72±10	0,8±0,6	8,4	**0,003**
miR-224	0,51±0,3	0,72±0,8	0,7	NS



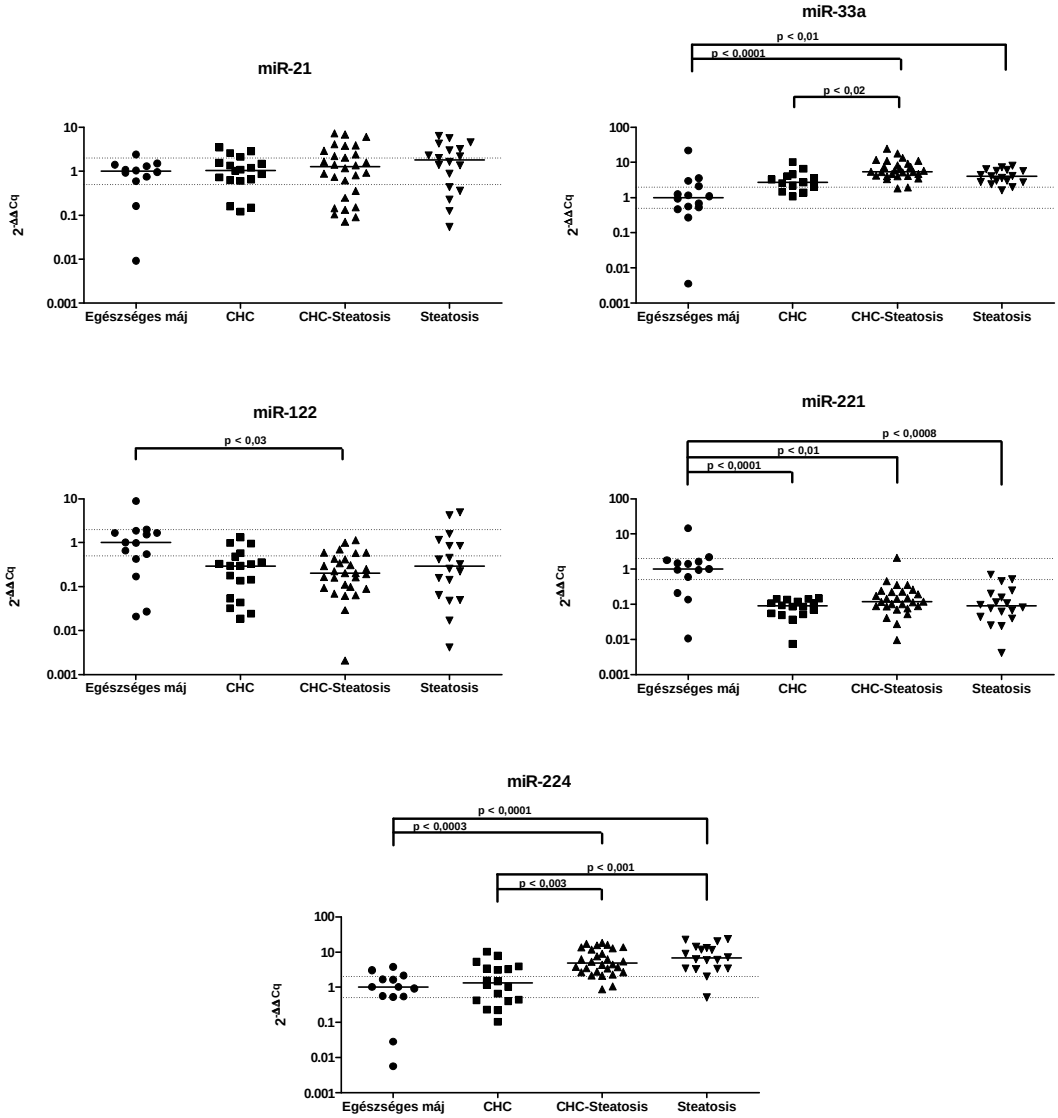
112. ábra mikroRNS-k expressziója normál májszövetben, a HCV kiújulás (recidíva) idején és az egy éves antivirális kezelést követően májátültetésen átesett betegek esetében. 1a. MikroRNS expresszió normál májszövetben és a HCV kiújulásakor vett májbiopsziában. A fekete oszlopok a donormájakat, a fehér oszlopok a HCV rekurrencia idején vett májbiopsziákban detektált expressziót mutatják. 1b. MikroRNS expresszió az antivirális kezelés előtt és után. A fekete oszlopok a kezelés előtti, a fehér oszlopok a kezelés után mért miR expressziót jelzik. 1c. MikroRNS expresszió az antivirális kezelés után az SVR-t mutató és a nem reagáló (NR) betegcsoportban. A fekete oszlopok az NR csoportban, a fehér oszlopok az SVR csoportban mért expressziót mutatják.

IV.3.2. A mikro-RNS expresszió vizsgálata HCV pozitív krónikus hepatitis asszociált és metabolikus eredetű steatosisban

Vizsgálatunkban krónikus hepatitis C-ben szenvedő betegek steatosist mutató vagy steatosis mentes, valamint NAFLD talaján kialakult steatosisos betegek májbiopsziás mintáit hasonlítottuk össze hepatitis vírus fertőzésmentes, normál májmintákkal, hogy egy olyan válogatott mikroRNS-ekből álló profilt tudjunk megvizsgálni, melyekről már rendelkezésre állt irodalmi adat, hogy a fibrosissal (miR-21, miR-221), zsír metabolizmussal (miR-33a, miR-122) és a hepatocarcinogenesissel (miR-21, miR-122, miR-221, miR-224) összefüggésben állnak (Davalos,2011; Karakatsanis,2013; Marquez,2010; Ogawa,2012). Arra kerestünk választ, hogy van-e különbség a mikroRNS mintázatban a különböző eredetű máj steatosisokban, így a HCV pozitív vagy negatív krónikus hepatitis asszociált steatosisban, a metabolikus eredetű steatosisban, valamint hogy hogyan viszonyulnak az egyes csoportok expressziói egymáshoz, illetve a normál májban talált expresszióhoz viszonyítva? A pathologiás elváltozást mutató májmintákban a normál májhoz képest eltérő mikroRNS expressziót találtunk.

A mir-221 csökkent szintjét találtuk krónikus hepatitis C-ben (CHC), HCV pozitív krónikus hepatitis asszociált steatosisban (CHC-Steatosis) és metabolikus erredetű steatosisban (Steatosis): (1/11-szeres csökkenés, $P < 0,0001$; 1/8-szoros csökkenés, $P < 0,01$ és 1/11-szeres csökkenés, $P < 0,0008$; a felsorolás sorrendjében). Emellett a miR-122 csökkent termelődése volt kimutatható a normál májhoz képest a CHC-Steatosis mintákban (1/5-szeres csökkenés, $P < 0,03$) (113. ábra). Ezzel ellentétben a normál májhoz képest a miR-33a és miR-224 emelkedett expressziója volt azonosítható CHC-Steatosis-ban (5-szörös emelkedés, $P<0,0001$ és 5-szörös emelkedés, $P<0,0003$; a felsorolás sorrendjében) és a Steatosis mintákban (4-szeres emelkedés, $P < 0,01$ és 7-szeres emelkedés, $P<0,0001$; a felsorolás sorendjében). A miR-21 expressziójában nem mutatkozott statisztikailag értékelhető különbség a pathologiás elváltozást mutató májbiopsziák és a normál májak között. Érdekes módon a CHC-mintákhoz viszonyítva miR-33a és miR-224 emelkedett expressziós szinteket mutattunk ki a CHC-Steatosis csoportban (2-szeres emelkedés, $P<0,02$ és 4-szeres emelkedés, $P<0,003$; a felsorolás sorrendjében). Ezen felül a miR-224 emelkedett expresszióját detektáltuk a Steatosis csoportban a CHC csoporthoz viszonyítva (5-szörös emelkedés, $P<0,001$) (113. ábra). A mikroRNS expresszió klinikopathologiai paraméterek, illetve szövettani besorolás közti összefüggését non-parametrikus Spearman rank korrelációval vizsgálva azt találtuk, hogy a miR-33expressziója negatív korrelációt mutat a steatosis csoportban az alkalikus foszfatáz és az AST enzimértékekkel és a CHC csoportban a szövettani grade-del. Ezzel ellentétben a miR-21 expresszió pozitivan korrelált a Steatosis csoportban az AST értékekkel, de a CHC-Steatosis csoportban negatív korrelációt mutatott a triglycerid értékekkel. A vizsgált mikroRNS-ek

nem mutattak korrelációt az ALT, GGT, koleszterin értékekkel, valamint a fibrosis stádiumával sem. Érdekes módon a mikroRNS expresszió és a steatosis foka között sem találtunk összefüggést, sem a CHC-Steatosis sem a Steatosis csoportban.



113. ábra A májmintákban mért mikroRNS expresszió normalizált értékei. A vízszintes vonalak jelzik az adatok medián értékeit. A p értékek a Kruskal-Wallis ANOVA teszt kiértékelése során kapott értékek. A felső szaggatott vonal kétszeres expresszióbeli emelkedést jelez, míg az alsó szaggatott vonal az expresszió feleződését mutatja. CHC: krónikus hepatitis C; CHC-steatosis: Steatotikus krónikus hepatitis C.

IV.3.3. MikroRNS expresszió vizsgálata hepatocelluláris carcinomában és Sorafenib kezelt hepatocelluláris carcinomában

Mindegyik FNAB mintából kellő minőségű és mennyiségű teljes RNS-t tudtunk izolálni. Az RNS izoláció medián ±SD-ja 10.8 ± 9.3 μg (0,2–32,2 μg) volt, míg az optikai denzitása (OD: 260/280 arány) 2,0 ± 0,1. A miR-ek normalizált relatív expresszióit a 32. táblázat mutatja be.

32. táblázat A vizsgált miR-ek relatív expressziói a hepatocelluláris carcinomák vékonytű aspirációs biopsziáiban, referencia miR: miR-140

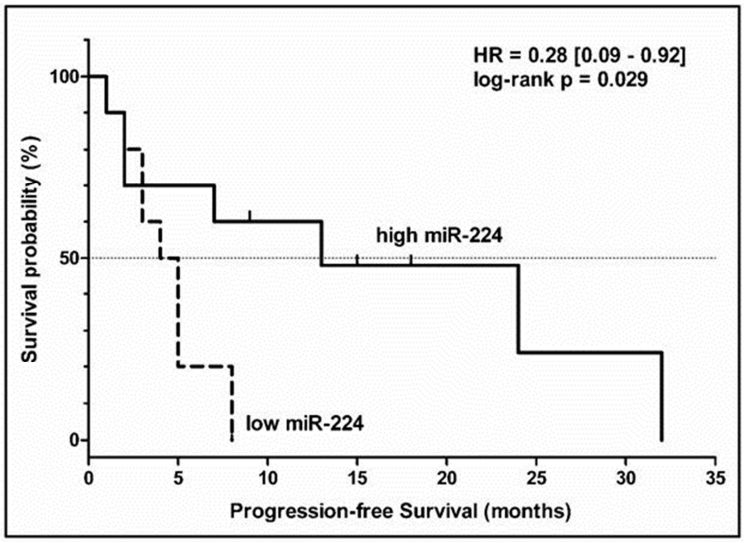
	Normalizált miR expressziók (medián és tartomány)
miR-17-5p	1.91 [0.16 - 10.20]
miR-18a	1.25 [0.07 - 4.89]
miR-21	85.94 [5.13 - 352.95]
miR-34a	3.88 [0.62 - 11.25]
miR-122	173.46 [18.94 - 407.31]
miR-195	2.00 [0.43 - 10.15]
miR-210	1.16 [0.01 - 32.75]
miR-214	0.23 [0.07 - 165.61]
miR-221	0.92 [0.21 - 11.08]
miR-222	2.69 [0.21 - 17.96]
miR-223	4.34 [1.21 - 20.39]
miR-224	1.06 [0.06 - 23.67]
miR-328	0.12 [0.01 - 3.20]
U6	51.71 [0.01 - 1568.32]

A miR expresszió és a kllinikopathologiai adatok összefüggése

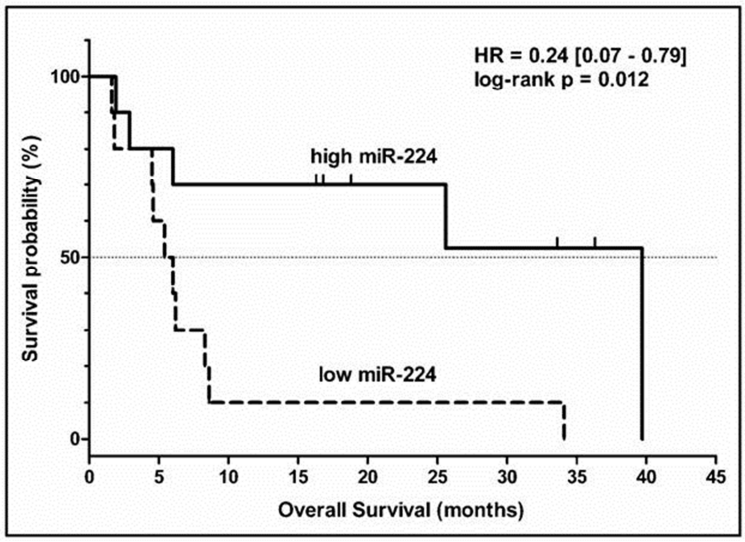
A kiértékelés keretében a miR expresszió és az életkor (<68 év versus ≥68 év), nem (férfi/nő), etiologia (virális versus más eredetű), tumor szám (soliter versus multinodularis), tumor méret (≤5cm / versus >5cm), Child-Pugh státusz (A versus B), ECOG státusz (0 versus 1) és AFP szint (<10 ng/ml versus ≥10 ng/ml) közti összefüggését vizsgáltuk. A miR expresszió medián értékei mentén osztottuk fel a betegeket egy adott miR-t alacsonyan, illetve magasan expresszáló csoportokra. A miR-214 magas expressziója a kisebb tumorokkal (≤5 cm) bíró betegeknél volt gyakoribb a nagyobb tumorokkal (>5 cm) szemben: (80% versus 20%, p=0,019). A magas miR-17-5p termelődés gyakoribb volt a jobb teljesítmény státusszal rendelkező betegeknél, mint az 1-es ECOG státuszú betegeknél: (77% versus 0%, p=0,003). A többi vizsgált pareméter nem mutatott statisztikailag szignifikáns összefüggést a miR expresszióval.

A Sorafenib kezelés előtti miR expresszió és a klinikai kimenetel közti kapcsolat

A sorafenib kezelés kimenetele és a kezelés miR expressziós mintázat közötti összefüggés vizsgálatára Kaplan-Meier analízist és log-rank teszteket végeztünk az egyes miR-eket magasan és alacsonyan expresszáló betegcsoportok összehasonlításakor. Mind a progresszió mentes túlélés (PFS), mind pedig a teljes túlélés (OS) szignifikánsan hosszabb volt a mir-224-et magasan expresszáló betegek csoportjában, a miR-224-et alacsonyan termelő betegek csoportjához képest (PFS, p=0,029; OS, p=0,012) (114. ábra, 115. ábra).



114. ábra A Kaplan-Meier görbe a sorafenib kezelt HCC betegek progresszió mentes túlélését ábrázolja az FNAB tumormintákban a kezelés előtti magas (high), illetve alacsony (low) miR-224 expresszió szerint.



115. ábra A Kaplan-Meier görbe a sorafenib kezelt HCC betegek teljes túlélését ábrázolja az FNAB tumormintákban a kezelés előtti magas (high), illetve alacsony (low) miR-224 expresszió szerint.

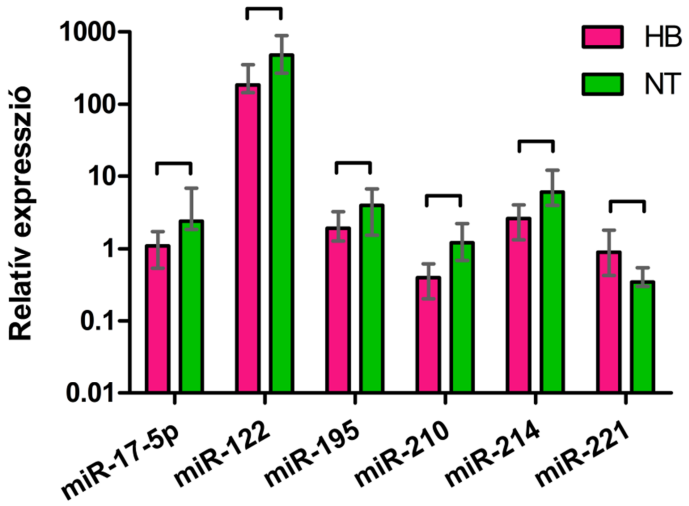
A többi vizsgált mikroRNS HCC-ben mért, sorafenib kezelés előtti szintje nem mutatott szignifikáns összefüggést sem a PFS-el, sem pedig az OS-el. A fenti klinikopathologia paramétereknek a statisztikai kiértékelése sem mutatott összefüggést a teljes túléléssel, csupán a

tumorméret adott marginális korrelációt a PFS-el (log-rank *p*=0.08). Bár a klinikopathologiai paraméterekkel nem adódott szignifikáns összefüggés, mégis az általános klinikai tapasztalat alapján, mint a betegség kimenetelét meghatározó tényezőket Cox multivariáns analízisnek vetettük alá, annak tisztázására, hogy a miR-224 szint független prediktora-e a túlélésnek. A vizsgálat alapján a miR-224 expresszió független prognosztikai faktornak bizonyult mind az OS, mind pedig a PFS tekintetében (magas versus alacsony miR-224 szintek: OS HR=0,11 [95% CI 0,013–0,913] *p*=0,04; PFS HR=0,125 [95% CI 0.015–1.034] *p*=0,05).

IV.3.4. MikroRNS expresszió vizsgálata hepatoblastomában

IV.3.4.1. A hepatoblastoma minták mikroRNS expressziója

A hepatoblastoma mintákat szubtípustól függetlenül összehasonlítva (n=23) a környező májszövettel (n=15), 6 miRNS mutatott szignifikáns eltérést. A miR-17-5p, miR-122, miR-195, miR-210 és miR-214 relatív expressziója csökkent, míg a miR-221 termelődés növekedett a tumorokban a környező tumormentes májszövethez képest (116. ábra, 33. táblázat). A fetális (n=15) altípust összevetve a környező májjal (n=15) a fetális komponensben csökkent miR-17-5p, miR-195, miR-210 és miR-214 expressziót, míg emelkedett miR-221 szintet találtunk. A tumormentes májjal összevetve az embryonális szubtípus (n=8) viszont csökkent miR-122 expressziót mutatott. A jobban differenciált fetális szubtípusban az embryonális mintákhoz viszonyítva szignifikánsan csökkent miR-18a expressziót detektáltunk (117. ábra). A vizsgált szubtípusok és a normál máj mikroRNS expresszióját a 34. táblázat mutatja be.

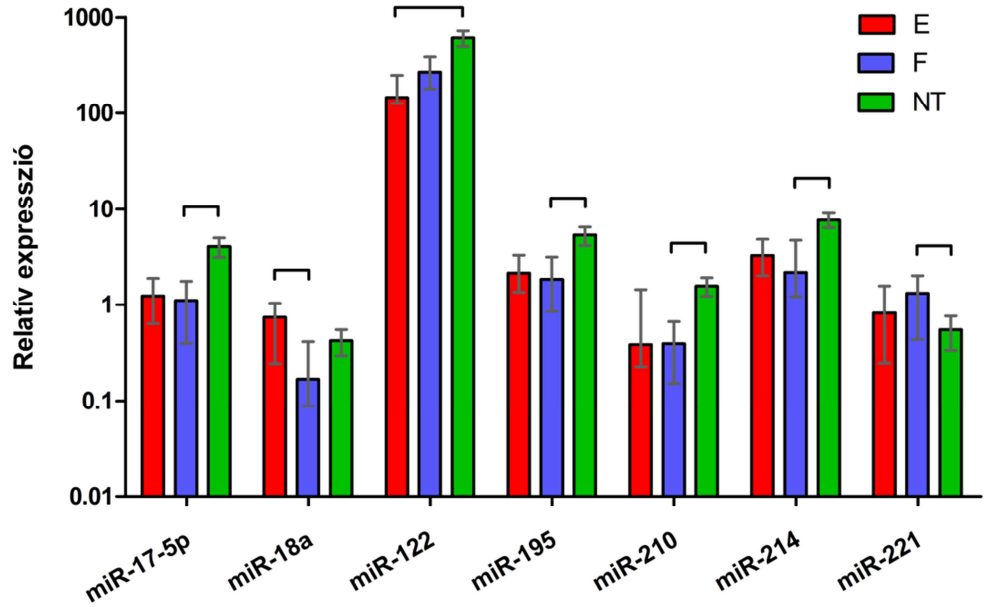


116. ábra: A vizsgált mikroRNS-ek relatív expressziója a hepatoblastomákban (HB) és a tumormentes környező májban (NT). Az oszlopok a medián értékeket mutatják, a hibahatárok pedig az interkvartilis tartományt demonstrálják. A kapcsok a szignifikáns eltérést mutató csoportokat jelzik.

33. táblázat: A medián relatív expressziók aránya hepatoblastoma/tumormentes máj (HB/NT) összevetésben és a Mann-Whitney U teszt p-értékei.

mikroRNS	p-érték	arány	mikroRNS	p-érték	arány
miR-17-5p	**0,0041**	**0,46**	**miR-195**	**0,0013**	**0,42**
miR-18a	NS	1,11	**miR-210**	**0,0013**	**0,32**
miR-21	NS	0,80	**miR-214**	**0,0026**	**0,43**
miR-34a	NS	1,37	**miR-221**	**0,0060**	**3,24**
miR-96	NS	0,82	**miR-222**	NS	1,68
miR-122	**0,0023**	**0,43**	**miR-223**	NS	1,89
miR-181a	NS	0,80	**miR-224**	NS	1,13

NS: nem szignifikáns



117. ábra: A mikroRNS expresszió az embryonális (E) és a fetális (F) szubtípusban és a tumormentes környező májban (NT). Az oszlopok a relatív expresszió medián értékeit ábrázolják, míg a hibahatárok az interkvartilis tartományt mutatják. A statisztikailag szignifikáns csoportok közti különbségeket a kapcsok jelzik.

34. táblázat Az epitheliális szubtípusokban mért mikroRNS expressziók medián értékeinek relatív aránya és a Kruskal-Wallis teszttel végzett statisztikai elemzés vizsgálat p-értékei.

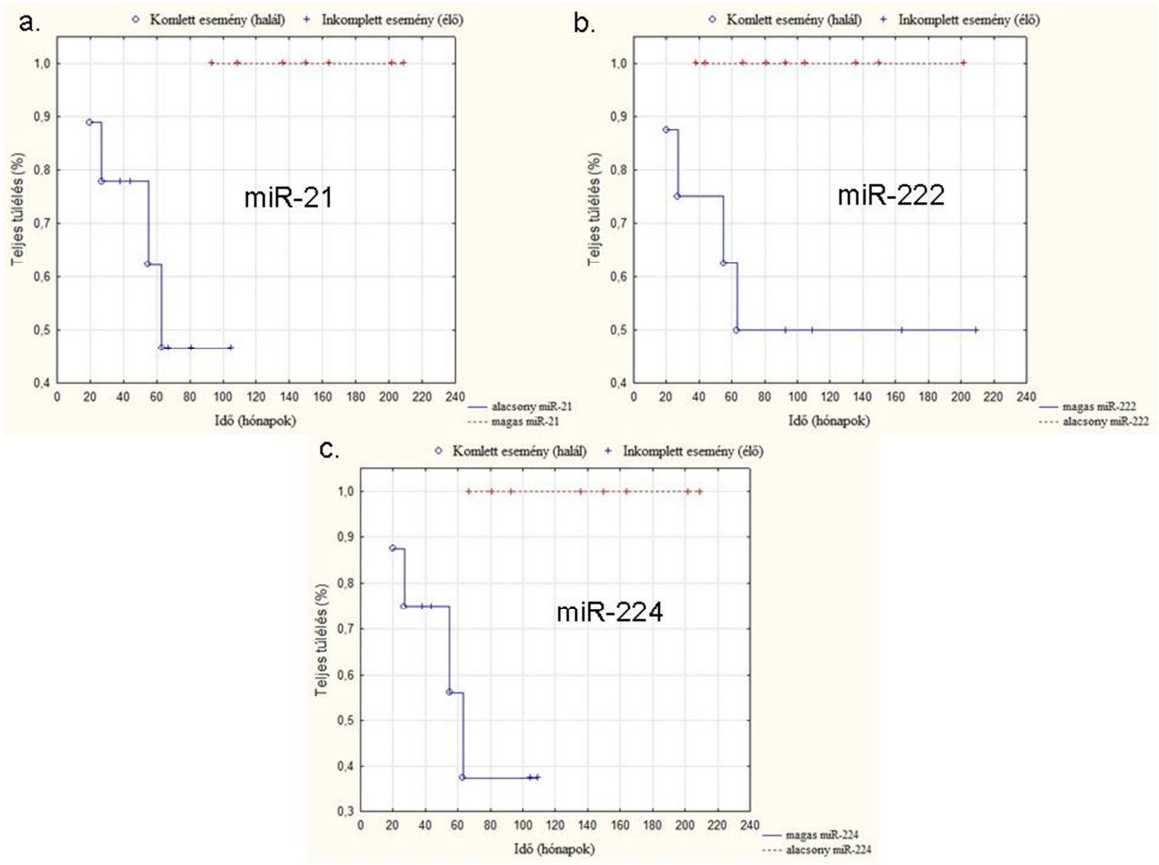
	Embryonális / fetális arány		embryonális / NT arány		Fetális / NT arány	
mikroRNS	**p-érték**	**arány**	**p-érték**	**arány**	**p-érték**	**arány**
miR-17-5p	NS	1,12	NS	0,52	**0,0222**	**0,46**
miR-18a	**0,0134**	**4,39**	NS	3,47	NS	0,79
miR-21	NS	0,66	NS	0,67	NS	1,01
miR-34a	NS	0,57	NS	0,90	NS	1,57
miR-96	NS	5,08	NS	2,85	NS	0,56
miR-122	NS	0,54	**0,0026**	**0,30**	NS	0,56
miR-181a	NS	1,08	NS	0,87	NS	0,80
miR-195	NS	1,16	NS	0,49	**0,0048**	**0,42**
miR-210	NS	0,98	NS	0,32	**0,0040**	**0,32**
miR-214	NS	1,50	NS	0,54	**0,0048**	**0,36**
miR-221	NS	0,62	NS	2,51	**0,0084**	**4,06**
miR-222	NS	0,91	NS	1,53	NS	1,68
miR-223	NS	3,11	NS	2,26	NS	0,73
miR-224	NS	3,69	NS	1,78	NS	0,48

NS: nem szignifikáns

IV.3.4.2. A HB betegek túlélése és a mikroRNS expresszió összefüggése

Három beteg mintáit (6. táblázat) - akiknek kevert komponensű tumoraikban a fetális komponens elérte a 30-50%-ot - a túlélés statisztikai vizsgálatánál nem vettük figyelembe, mivel nem lehetett a mintákat makrodisszekálni, így a miR értékek sem az embryonális, sem pedig a fetális komponensre nem lettek volna reprezentatívak. Érdekes módon a tisztán embryonális (n=5) és a tisztán fetális (n=12) csoportok között nem találtunk szignifikáns különbséget sem az eseménymentes túlélésben (event free survival: EFS), sem a teljes túlélésben (overall survival: OS). Ha a szövettani altípust nem vettük figyelembe és kevert fenotípusú mintákat nem elemezve vizsgáltuk a hepatoblastoma eseteket, akkor a miR expresszió és a EFS között szintén nem találtunk különbséget. A teljes túlélés vizsgálatánál azonban szignifikánsan eltérő értékeket találtunk a magas és alacsony miR-21 ($p<0,02$), miR222 ($p<0,03$), valamint a miR-224 ($p<0,01$) expresszióval rendelkező csoportok között (118. ábra). Az alacsony miR222 és miR-224 expresszió hosszabb teljes túléléssel társult a magas expresszióhoz képest: 101,8 hónap versus 92,5 hónap és 132,8

hónap versus 57,6 hónap. A magas miR21 expresszió pedig szintén hosszabb OS-sel társult az alacsony expressziójú miR-21 csoporthoz képes: 144,5 hónap versus 55,6 hónap. Halálozás a magas miR-222 és -224 és az alacsony miR-21 expresszióval rendelkező csoportban történt. Ebbe a csoportba három tisztán fetális és egy embryonális eset tartozott. A miR-222 és -224 esetében vagy recidíva vagy metasztázis fordult elő, míg a miR21 esetében mind recidíva, mind metasztázis is előfordult. Az EFS sem a recidívák sem a metasztázisokkal nem mutatott szignifikáns különbséget.



118. ábra: A hepatoblastoma páciensek teljes túlélésének (OS) összefüggése a mikroRNS expresszióval. A miR-21 (a), miR-222 (b) és miR-224 (c) expressziók összefüggése a teljes túléléssel (OS), Kaplan-Meyer görbék.

V. Megbeszélés

V.1. A krónikus hepatitis, cirrhosis és hepato-pancreato-biliáris daganatok TJ expressziós mintázatának prognosztikai és prediktív jelentősége, valamint az eltérő mintázatok értelmezése ezen betegségek pathomechanizmusában

A krónikus hepatitis és ezen belül a HCV okozta májgyulladás által indukált szövetkárosodások és a következményes regenerációs mechanizmusok kiemelkedően fontosak a cirrhosis kialakulásában. A fellépő genomikai károsodások és a következményes szabályozási zavarok felhalmozódása fontos szerepet játszik a hepatocarcinogenesis felgyorsulásában. Ennek ellenére, a cirrhosisban fellépő eltérések pontos szerepe a malignus transzformáció mechanizmusában számos területen feltáratlan. A cirrhotikus máj lényegesen megváltozott strukúrális felépítése következtében fellépő megváltozott intercelluláris kapcsolatok és ezen belül a TJ összetételében fellépő változások és azok jelentősége számos tekintetben feltáratlanok. Korábbi munkák igazolták, hogy a a hepatotróp növekedési faktorok hatására dinamikus változások következnek be a TJ alkotórészek expressziójában és összetételében májregeneráció során (Grotegut,2006), (Kojima,2008), (Takaki,2001).

A TJ „gerincét” képező claudinok közül az utóbbi években felismerést nyert, hogy a ***claudin-1*** a HCV hepatocytákba történő internalizációjának késői szakaszában ko-receptorként funkcionál (Evans,2007; Liu,2009), sőt a claudin-6 és -9-nek is hasonló szerepet tulajdonítanak (Meertens,2008; Zheng,2007). A claudin-1 ezen mechanizmusban más belépési faktorokkal együtt vesz részt, többek között a CD-81-el nemcsak ko-lokalizációt mutat a májsejtek sinusoidális felszínén (Harris,2008; Reynolds,2008), hanem funkcionálisan is közösen határozzák meg a HCV sejtbe jutását (Harris,2010). A claudin-1 elleni antitestekkel gátolni lehet a HCV fertőzést (Fofana,2010; Krieger,2010). Nem sokkal később, az occludin hasonló funkciója is felismerésre került (Ploss,2009). A HCV fertőzés krónicitása feltételezi a vírus hepatocytákba való folyamatos bejutását és a megújuló hepatocyták fertőződését. Saját eredményeink alapján a claudin-1 és -7 expresszió megemelkedett a HCC körüli cirrhosisban, a nem-cirrhotikus és a normál májhoz képest. Ez összhangban áll Reynolds és munkatársai eredményeivel, akik szintén megnövekedett claudin-1 termelődést észleltek cirrhosisban (Holczbauer,2014; Reynolds,2008). Saját immunhisztokémiai eredményeink azt mutattták, hogy a claudin fehérje mind a cirrhosis hepatocytáiban, mind pedig a HCC sejtjeiben basolateralisan is kimutatható. A laphámban is hasonló képet kaptak a kutatók, ahol

a claudinok nem csak a TJ-ban, hanem az úgynevezett patentszerű „kissing point”-ban is megjelennek (Schluter,2004). Reynolds és munkatársai HCV fertőzött Huh-7.5 sejteken kapott *in vitro*, valamint Mensa és munkatársainak humán klinikai eredményei a claudin-1 expresszió HCV direkt hatásra történő indukciójára utalnak (Mensa,2011; Reynolds,2008). Vizsgálatunkban nem találtunk szignifikánsan emelkedett claudin-1 expressziót a HCV fertőzött mintákban a HCV negatív csoporthoz képest. A morfometriai kiertékeléskor ugyanakkor látható volt a tendencia, hogy a HCV fertőzött esetekben a claudin-1 fehérje termelődése magasabb. Saját vizsgálatunkban a szignifikáns különbség hiánya adódhatott a minták összetételéből és a vizsgálati algoritmusból is. Amennyiben elfogadjuk az irodalomban közölt eredményt, hogy a claudin-1 a HCV hepatocelluláris internalizációját elősegíti, akkor a hepatitis C aktivitását és súlyosságát, valamint krónicitását is befolyásolhatja a claudin-1 expresszió mértéke. Másfelől a claudin-7 is szignifikánsan emelkedettebb volt a HCV fertőzött nem-cirrhotikus májakban a HCV fertőzött nem-cirrhotikus májakhoz képest. A claudin-7 expresszióról nem áll rendelkezésre adat, hogy a HCV fertőzéssel közvetlen kapcsolatban állna, mint receptor, azonban más faktorok, így a fibrosis asszociálódhat vele.

A HCC-k szintén eltéréseket mutattak a claudin expresszióban. A cirrhosis talaján fejlődő májrákok a normál májhoz képest, de a nem-cirrhosis talaján kialakuló HCC-hez viszonyítva is szignifikánsan emelkedett claudin-1 és -7 expressziót mutattak. Ez arra utal, hogy a claudin-1 és -7 expressziót a HCC „megtartja” a kiindulási cirrhosisból, azaz egyes tumorokat is jellemző molekuláris történések a TJ-ban még a malignus transzformáció előtt kialakulnak. A HCC-kben ugyanakkor mind a környező tumormentes májszövethez, mind pedig a normál májhoz képest is csökkent claudin-2 expressziót találtunk, mely egyben előrevetítheti a malignus transzformációt, hiszen ez a cirrhosisban nincs még jelen. Egyes szerzők szerint a rosszul differenciált HCC-k, valamint a vena betörés a claudin-1 expresszió elvesztésével asszociált, míg a magas claudin-1 expresszió megőrzöttsége a jól differenciált HCC-k sajátja (Higashi,2007). Suh és munkatársai szerint a claudin-1 a tumorok kialakulásában lényeges jelátviteli utakra direkt hatással van (Suh,2012).

Több kutatási adat támasztja alá, hogy az adhéziós molekulák szerepet játszanak számos tumortípus progressziójában, így többek között emlőcarcinomában (Kominsky,2003; Tokes,2005), pancreas (Korompay,2012; Michl,2003), cervix (Sobel,2005) rákokban. A májrák esetében felvetődött, hogy a claudin-3 és -7, mint a humán máj őssejtek specifikus markere, szerepet játszhat a májregeneráció indukálta tumoros átalakulásban (Schmelzer,2006; Schmelzer,2007; Yovchev,2007). A sejtek adhéziós rendszeréről ismert, hogy a jelátviteli útvonalakkal kapcsolatban áll és ezáltal a sejtkapcsoló struktúrák a sejtproliferáció és differenciáció szabályozásában is részt vehetnek (Gonzalez-Mariscal,2007; Hirohashi,2003; Lal-Nag,2009; Suh,2012).

Munkacsoportunk a korábban általunk leírt, biliáris tumorokban talált kifejezett, erős claudin-4 fehérje pozitivitást a HCC-ben nem detektálta (Lodi,2006). Nagyobb számú minta analízise felfedte, hogy a mintáink között szereplő néhány HCC-ben a tumorsejtek által alkotott acináris struktúrákban gyenge és fokális luminalis claudin-4 festődés volt tapasztalható. Az a tény, hogy a claudin-4 a cirrhosisban jelentősen emelkedettebb volt mRNS szinten a nem-cirrhotikus és a normál májszövet mintákhoz képest, azzal magyarázható, hogy cirrhosisban az epeutak száma jelentősen megnő.

Összességében eredményeink alapján cirrhosisban mind a májszövetben, mind a talaján kialakuló HCC-kben a claudin-1 és -7 expresszió emelkedett. A cirrhosisban emelkedett claudin-7 termelődés biológiai jelentősége jelenleg nem ismert. A HCV fertőzés, a nem fertőzött esetekhez képest emelkedett, de nem szignifikánsan különböző claudin-1 és -7 termelődést eredményezett a HCV pozitív cirrhosisban. Ez arra utal, hogy a HCV fertőzés önmagában kisebb szerepet játszik ezen emelkedett claudin-1 expresszióban, inkább a krónikus hepatitis okozta szerkezeti átalakulás állhat a jelenség mögött. Mindazonáltal a cirrhosisban észlelt emelkedett claudin-1 expresszió indirekt biológiai hatást jelenthet, mely segítheti a HCV hepatocytákba való belépését, ezáltal támogatva a HCV fertőzés fennmaradását, krónikussá válását. A claudin-1 elleni monoklonális antitest terápia hepatocyta sejtkultúrákban kapott eredményei alapján képes lehet megakadályozni a HCV fertőzést, adott esetben májtranszplantáció után, illetve gátolhatja a vírus terjedését a krónikusan fertőzött egyénekben (Fofana,2010). A claudin-1 extracelluláris doménje ellen termeltetett antitestekkel hatékonyan lehetett gátolni a HCV fertőzést *in vitro* és *in vivo* egérmodellben is (Fukasawa,2015).

Az egyes claudinok megváltozott expressziója, a TJ károsodott funkcióját eredményezve, hatást gyakorolhat a tumor progresszió során a jelátviteli útvonalakra. Ezen túlmenően az egyedi claudin expressziós mintázat detektálása diagnosztikus, prognosztikus és terápiás lehetőségeket is jelent (Soini,2012; Wang,2011). A primer HCC, a colorectális és pancreas carcinomák a daganatos halálozás sorrendjében az első ötben szerepelnek és az utóbbi kettő gyakran ad májmetasztázist is (Centeno,2006). Ha ehhez hozzávesszük, hogy a daganatos halálozások majd 90%-a a metasztázisok miatt következik be (Christofori,2006), melyek tekintélyes hányadát a májmetasztázisok teszik ki, akkor nyilvánvaló, hogy a metasztázisok molekuláris mintázatának felderítése legalább olyan fontos, mint a primer daganatoké. Ezáltal a primer és secunder májdaganatok molekuláris profiljának alaposabb megismerése nemcsak diagnosztikus, hanem terápiás lehetőségeket is rejt.

A világon elsőként végeztük a HCC, colorectális carcinoma májáttétjeinek (CRLM), a pancreas ductalis carcinoma májáttétjeinek (PLM) összehasonlító jellegű claudin expressziós vizsgálatát és azonosítottuk ezen tumorok jellegzetes mintázatát. A HCC mérsékelten expresszálja a claudin-1 fehérjét, míg a claudin-2, -3, és -7 alacsony szinten termelődik és jellegzetes módon a claudin-4 fehérje nem termelődik. A colorectális carcinomák májmetasztázisa erős claudin-1, -3, -4, és -7 immunhisztokémiai festődést mutat, míg a claudin-2 pozitivitás mérsékelt fokú. Ezzel ellentétben a pancreas ductalis carcinomák májmetasztázisa erős claudin-4 fehérje expressziót mutat, míg a claudin-2 pozitivitás közepes fokú, emellett a claudin-1, -3, és -7 IHC festődés gyenge.

A claudinok szerepe a tumorok kialakulásában és a tumor progresszióban, különösen a metasztázisok keletkezésében nem definiált, sok ellentmondás van az irodalomban. Nem világos, hogy egyes claudinok kimutatott túltermelődése a megváltozott TJ funkció celluláris kompenzálása (Cheung,2012; Hadj-Rabia,2004), vagy része a jelátviteli útvonalak megváltozott aktivitásának. Egyes claudinok túltermelődése mellett a TJ átrendeződése, a struktúra megbomlása és a paracelluláris diffúzió növekedése a colorectális tumorokban leírásra került (de Oliveira,2005), ezáltal aláhúzva azt a véleményt, hogy a TJ alkotórészek túltermelődése nem feltétlenül tudja fenntartani a TJ funkcióját és emellett más hatásai is lehetnek a sejtek homeosztázisára.

A claudin-1 az egyik legjobban jellemzett tagja a claudin géncsaládnak és aktív résztvétele a tumor progresszióban és a metasztázis képződésben általánosan elfogadott. Colorectális carcinomában a claudin-1 túltermelésével és kiütésével kapcsolatos vizsgálatok a claudin-1 inváziót és metasztázist erősítő szerepére utalnak és pozitív korreláció mutatkozott a claudin-1 expresszió és a tumor progresszió, valamint a metasztázisok kialakulása között (Dhawan,2005). Ezt erősíti, hogy a claudin-1 fehérje túltermelődését több tanulmány is kimutatta humán colorectális tumorokban (de Oliveira,2005), (Gröne,2007; Kinugasa,2007; Oshima,2008), (Huo,2009). Másfelől viszont az alacsony claudin-1 expresszió a tumorok alacsony differenciáltságával és rossz prognózissal járt (Resnick,2005), valamint a nyirokcsomó metasztázisok megjelenésével társult (Ersoz,2011). Ezzel ellentétben a tüdő adenocarcinomában a claudin-1 túltermelése a daganatos inváziót és a metasztázisok kialakulását fékezte (Chao,2009). Érdekes módon hasonló ellentmondás mutatkozik a HCC esetében is, amennyiben a claudin-1 expresszió csökkenése szoros korrelációt mutat ezen tumor dedifferenciációjával és rossz prognózisával (Higashi,2007). Másfelől a HCC sejtvonalakon végzett *in vitro* viszgálatok a claudin-1 tumorsejt inváziót serkentő szerepére utaltak (Yoon,2010).

Vizsgálatainkban azt találtuk, hogy a *claudin-1* pozitivitás mind a primer HCC-ben, mind pedig a metasztatikus colorectális és pancreas adenocarcinomákban jelen volt, mely a claudin-1-nek a hepatocarcinogenesisben és a májmetasztázisok kialakulásában betöltött szerepére utal.

A *claudin-2* a primer emlőrák progressziója során csökkenő expressziót mutat a primer daganatban (Kim,2008), de ezen expresszió ismét erőssé válik az emlőrák májmetasztázisaiban és

egyben a claudin-2-nek a májmetasztázisok kialakulásában betöltött szerepére utal (Tabaries,2011). Az általunk vizsgált metasztatikus májdaganatokat gyenge vagy közepesen erős claudin-2 pozitivitás jellemezte. A colorectális carcinomák mintegy 25%-ában (Aung,2006), míg a pancreas adenocarcinomák 45%-ában jól detektálható claudin-2 expresszió azonosítható (Borka,2007). Ez arra utal, hogy a claudin-2 nemcsak ezen daganatok kifejlődésében, hanem a metasztatikus fenotípus kialakításában is részt vehet. Érdekes módon a HCC-ben mind a claudin-2 mRNS, mind pedig a fehérje termelődés csökkentnek mutatkozott, a tumor körüli tumormentes májszövethez valamint a normál májhoz képest. Sakaguchi és munkatársai kimutatták, hogy a claudin-2-t a hepatocyta nucleáris faktor-1α (HNF-1α) pozitívan szabályozza (Sakaguchi,2002). HCC-ben a HNF-1α csökkent termelődését találták (Zeng,2011) és ez egybevág a csökkent claudin-2 expresszióval. A HNF-1α a májszövet megfelelő polarizáltságához is szükséges (Son,2009), mely a tumorokban gyakran elveszik.

A claudin isoformák jelentőségére azóta irányul különös figyelem mióta ismertté vált, hogy a *claudin-3 és -4* a C*lostridium perfringens* enterotoxinjának receptoraiként is szolgál (Sonoda,1999). A claudin-4 hamarosan a claudinokra alapozott tumorellenes terápiák fontos jelöltje lett (Suzuki,2009) és egyben a célzott terápiák egyik molekuláris célpontja (Neesse,2012). A claudin-4 expressziót többen az adenocarcinomák egyik típusos tulajdonságának tartják (Michl,2003). Fokozott termelődését számos tumorban leírták, többek között colorectális carcinomában (Oshima,2008), ovarium carcinomában (Rangel,2003), valamint saját vizsgálataink alapján is igazolódott pancreas exocrin ductalis adenocarcinomában (Borka,2007), epeúti tumorokban (Lodi,2006), (Nemeth,2009). Ezen túlmenően a megzavart, csökkent claudin-4 expresszió több tumor esetében a kevésbé differenciált, invazív fenotípussal asszociálódott, mely felveti negatív szabályozó szerepét az invázió és metasztázis képződés folyamatában mind a pancreas, mint pedig a colorectális carcinomák esetében (Ueda,2007). Ezen tumorok metasztázisainak vizsgálatánál a colorectális carcinomák májmetasztázisai esetében Ueda és mtsai csökkent claudin-4 expressziót találtak (Ueda,2007); (Georges,2012), de a pancreas exocrin tumorok esetében a claudin-4 pozitivitás megtartott volt (Nichols,2004). Saját vizsgálataink során mind a pancreas, mind pedig a colorectális carcinomák májmetasztázisai erősen expresszálták a claudin-4-t, mely inkább a metasztázis képzésben játszott szerepe mellett szól (Holczbauer,2014). A claudin-3 fehérje expreszió az általunk vizsgált HCC mintákban csekély volt, ellentétben a colorectális carcinomák májmetasztázisainak erős claudin-3 expressziójával. A colorectális carcinomák tehát megtartották erős claudin-3 festődésüket, melyet előzőleg több munkacsoport is megfigyelt (Meng,2010; Oshima,2008). Saját vizsgálatunk eredményeképp elmondhatjuk, hogy a pancreas exocrin carcinomák májmetasztázisaiban is megtartott claudin-3 pozitivitást találtunk (Holczbauer,2013). Ez annál is inkább érdekes, mivel korábbi vizsgálatunkban a primer exocrin

pancreas carcinomákban nem mutattunk ki claudin-3 fehérje expressziót (Borka,2007), azonban munkacsoportunk az intrahepatikus epeúti tumorokban vagy gyenge vagy hiányzó claudin-3 IHC festődést észlelt (Nemeth,2009). A fentiek alapján a claudin-3 expresszió hozzájárulhat a pancreas ductalis carcinomák májmetasztázisainak progressziójához és egyben a claudin-3 expresszió vizsgálata elkülönítheti a primer intrahepatikus epeúti carcinomákat a pancreas carcinoma májmetasztázisaitól.

A *claudin-7* szerepét a colorectalis carcinomában közölték már az irodalomban (Darido,2008) és egyes adatok szerint más fehérjékkel együtt, komplexben funkcionál (Kuhn,2007). Ezen túlmenően a claudin-7 és asszociált molekuláinak gyakori expresszióját mind colorectális carcinomákban, mind pedig ezen tumorok májmetasztázisaiban is kimutatták. Ezzel összhangban a colorectális tumorok májmetasztázisaiban saját vizsgálataink is megerősítették a claudin-7 erős pozitivitását (Holczbauer,2013). A colorectális rákok vizsgálatánál a tumorok kialakulásánál a carcinogenesis korai folyamatában először csökkent claudin-7 mRNS szinteket mértek (Bornholdt,2011), majd ezen molekulának az újbóli, gyakori expresszióját találták a a tumorok nyirokcsomó metasztázisaiban (Nakayama,2008), mely a munkacsoportunk által vizsgált májmetasztázisok claudin-7 termelődését is magyarázhatja. A HCC csak gyenge claudin-7 fehérje pozitivitást mutatott, mely nem különbözött szignifikánsan a tumor körüli tumormentes májszövettől. Ez összhangban van azzal a HCC transzgén modelljében leírt megfigyeléssel, mely szerint csak kis méretű tumorokban találtak emelkedett claudin-7 szinteket (Borlak,2005).

Az *intra- és extrahepatikus cholangiocarcinomákban* az általunk elsőként feltárt erős, claudin-4 expresszió élesen elkülöníti ezen daganatokat a claudin-4-et nem (vagy minimális mértékben) expresszáló hepatocelluláris carcinomától. A normál májban a hepatocyták negatívak voltak, míg az intra- és extrahepatikus epeúti hám kifejezte ezen fehérjét, de a tumorokhoz képest általában kisebb intenzitással, különösen az extrahepatikus cholangiocarcinomák esetében. A claudin-4 mRNS szintek erős korrelációt mutattak a fehérje expresszióval. A claudin-4 pontos élettani szerepe nem ismert, de részt vesz a hámban töltés szelektív pórusok létrehozásában és a nátrium kilépését gátolja a paracelluláris térbe (Van Itallie,2001). Több daganatban is megnövekedett claudin-4 termelődést észleltek, így pancreas rákban (Nichols,2004), (Tsukahara,2005), prostata rákban (Long,2001), méhnyakrákban (Sobel,2005) és ovárium tumorokban (Hibbs,2004). Az általunk, a cholangiocarcinomában detektált erős claudin-4 mRNS és fehérje termelődéshez hasonlóan a normál epeúti hámban is megtalálható ezen sejtkapcsoló struktúra fehérje kifejeződése és ez a hisztogenezis tekintetében megerősíti a daganatok eredetét, mellyel ellentétben a claudin-4-et sem a májsejtek, sem a HCC-k nem expresszálják. Eszerint a máj primer daganataiban, a tumoros proliferáció során a claudin-4 expresszió nem változik, stabil marad

a TJ összetevőinek expressziós profilja. A claudin-4 expresszió elvesztése másfelől pedig, a CK-7 expresszió elvesztéséhez hasonlóan a hepatocyta irányú differenciáció markere.

A máj metasztatikus adenocarcinomái eredetének megállapítása, a primer májtumoroktól való elkülönítése, néha komoly klinikai dilemmát jelent és a helyes diagnózis felállításának terápiás jelentősége van. A cholangiocarcinomák claudin-4 expressziója segítséget jelenthet az anaplasztikus HCC-től való elkülönítésben, de a metasztatikus adenocarcinomák esetében önmagában nem jelent segítséget, mivel a pancreas ductalis carcinoma és a colorectalis carcinomák is erős claudin-4 expressziót mutatnak (Holczbauer,2013), ezért az expressziós mintázat a maga komplexitásában értékelendő.

Az irodalmi adatok szerint a hepatocyták pótlása történhet epeúti sejtekből vagy máj őssejtekből (Evarts,1987; Lenzi,1992). Ebből a szempontból nem várt eredmény volt, hogy hepatocyták és a belőlük kialakuló hepatocelluláris carcinomák nem expresszálnak claudin-4-et. Az epeúti hámban és a cholangiocarcinomákban talált claudin-4 expresszió stabilitás nem általában jellemzi a claudinokat. Több más claudin a normál hámokhoz képest változást mutat a daganatokban, így a claudin-1 emlőrákban (Kramer,2000), vastagbélrákban (Miwa,2001), (Resnick,2005), a claudin-3 emlőrákban (Kominsky,2004), prostata rákban (Long,2001) és ovarium tumorokban (Heinzelmann-Schwarz,2004), a claudin-7 emlőrákban (Kominsky,2003). A CLDN-3, -4 és -7 mRNS magas szintű termelődését találták normál pancreasban és exocrin pancreas ductalis adenocarcinomákban (Hewitt,2006), míg mások a CLDN-3 és -4 mRNS fokozott expresszióját mutatták ki (Missiaglia,2004). mRNS szinten is több különböző claudinnak, így claudin-1, -3, -4 and -7-nek emelkedett szintjét találták különböző eredetű carcinoma sejtvonalakban (Offner,2005). Számos vizsgált daganatban a tumoros progresszió során a claudinok csökkenő expresszióját írták le, jellegzetesen az emlőrákban (Kominsky,2003), méhnyakrákban (Sobel,2005) és vastagbélrákban (Resnick,2005). Érdekes módon a claudin-4 esetében a cholangiocarcinomákhoz hasonlóan több más daganatban is nem expresszióbeli csökkenést, hanem ellenkezőleg, a normál szövethez képest az megnövekedett expresszió észleltek, így az invazív pancreas és ovarium carcinomákban is. Eredményeink alapján a cholangiocarcinomák és ezen belül az extrahepatikus cholangiocarcinomák is hasonlóan viselkednek. Az intermedier filamentumok, a citokeratinok expressziója jellemzi az epitheliális sejteket, több mint húsz eltérő tagját azonosították ennek a polypeptided családnak különböző sejtvonalakban és tumorokban (Moll,1982). A CK7, CK19 és a CK20 a biliáris epithel és a cholangiocarcinomák hasznos diagnosztikus markerei. Eredményeink szerint a cholangiocarcinomák túlnyomó többsége expresszálja a CK7-t és a CK19-t, mely egybevág az irodalmi adatokkal (Lau,2002; Porcell,2000). Azonban esetenként a HCC-kben is megjelenik a CK7 expresszió. A CK20 pozitivitást alacsony százalékban, de mind a epeúti carcinomákban, mind pedig HCC-ben kimutatták. Vizsgálataink alapján a claudin expressziós mintázat, de különösen a claudin-

4 expresszió, jobban vagy legalább olyan jól elkülöníti az epeúti tumorokat a hepatocelluláris daganatoktól mint a citokeratinok. A claudin-4 reakció a hepatocyta specifikus antigén (HSA) „inverz” képét adja, tehát HCC-ben negatív és erős pozitivitást mutat az epeúti eredetű tumorokban, melynek alapján az expresszió meghatározásának helye van a hepatocyta és biliáris eredetű tumorok differenciáldiagnosztikai paneljében.

A claudin expresszió komplex mintázatát vizsgálva már látszik, hogy eredményeink szerint a cholangiocarcinomák expressziós profilja több eltérés is mutat a normál biliáris hámhoz képest és ennek topográfiához köthető vonásai is vannak. A claudin-1, -3, -7, -8 és -10 közül egyes claudinok immunhisztokémiai reakciójának pozitivitása, mind a reakciók intenzitásában, mind a pozitiív sejtek arányában a legtöbb carcinomában csökkent a normál hámhoz képest. A claudin-2 az epehólyag carcinomában mutatott szignifikáns csökkenést, míg a claudin-4 pozitivitás szignifikáns növekedése a normál hámhoz képest az extrahepatikus cholangiocarcinomában volt detektálható. Több claudin esetében (claudin-1, -4, -8 és -10) az apikális lokalizáció aberráns bazális pozitivitás mutatkozott, mely lehet a megzavart szöveti polarizáció jele vagy más, a carcinogenesissel összefüggő folyamatot is tükrözhet. A biliáris epithel különböző lokalizációjú tumorainak mintázatát egymással összevetve megállapítható, hogy mindegyik szakasz rendelkezik jellegzetes expressziós profillal. A claudin-1 és -10 erős pozitivitása látható IBDC-ben az EBDC, ill. GBC tumorokhoz viszonyítva, míg a claudin-2 erősebb immunhisztokémiai reakciót ad a GBC-ben az IBDC és EBDC csoportokhoz képest. A claudin-4 reakció intenzitása az EBDC-ben volt a legerősebb.

Ezen leírt claudin expressziós tulajdonságok egy komplex és jól szabályozott folyamatra utalnak, mely mind a primer, mind pedig az áttéti daganatokban jellegzetes claudin expressziós mintázatot jelent. Bár korábban egyes claudinok csökkent expresszióját közölték előrehaladott CRC-ben, ennek ellenére munkacsoportunk erős claudin termelődést észlelt ezen tumorok májmetasztázisaiban. Ebben a folyamatban több lépés is szerepet játszhat, így a tumorsejtek clonális biológiai szelekciója a tumor progresszió során, másfelől a mikrokörnyezet is befolyásolhatja az expressziót (Georges,2012). Kimutatták azt is, hogy a dedifferenciálódott colorectális adenocarcinomák a májmetasztázisaikban redifferenciálódhatnak (Kaihara,2003), melynek része lehet a differenciáltabb állapotokban a claudin expressziós mintázat főbb vonásainak helyreállítása, melyet saját eredményeink is alátámasztanak (Holczbauer,2013). Eszerint jó korrelációt találtunk a claudin mRNS és fehérje szintű expressziója között, de a HCC esetében két érdekes eltérés adódott: a HCC a CRC-hez képest csökkent claudin-1 és -7 fehérje expressziót mutatott, míg a claudinok mRNS expressziós szintjei emelkedettebbek vagy hasonlóak voltak ugyenezen tumorcsoportok között. Ez felveti a claudinok posttranszkripcionális szabályozásának lehetőségét, mely többek között történhet a mikroRNS-eken keresztül is (Kwak,2010). Az eltérés oka másfelől lehet egy

kérdéses fehérjékre vonatkozó felgyorsult protein termelődés/lecserélődési ciklus is. A vizsgálataink összességében alátámasztják a megváltozott claudin expressziós mintázat jelentőségét nemcsak a hepatocarcinogenesisben, hanem a colorectalis és a pancreas exocrin carcinomák májáttétjeinek kialakulásában is. A konkrét mintázaton túlmutatóan a claudinokat célzó vagy a claudinokat, mintegy kihorgonyzó helyeket felhasználó célzott kezelések nemcsak a primer tumorok ellen tervezhetőek, hanem ezen tumorok májmetasztázisai esetében is a betegek hasznára lehetnek. A claudin fehérje expressziós panel vizsgálataink szerint fontos információkat jelenthet a tumorok vizsgálatában, mely pathologiai differenciál diagnosztikai jelentőséggel bírhat és ezen TJ alkotórészek jövőbeni célzott terápiák kialakításában mint horgonyzóhelyek vehetnek részt.

Összességében a cirrhotikus máj hepatocytái szignifikánsan erősebb claudin-1 és -7 immunhisztokémiai reakciót mutattak, mint a normál májban lévők. A cirrhotikus májban kialakult HCC-ben a claudin-1 festődés még a cirrhosisban tapasztalthoz képest is szignifikánsan emelkedett, azonban a tumorsejtek claudin-7 expressziója a cirrhotikus nodulusok hepatocytáinál kisebb mértékűnek bizonyult. *Eredményeink alapján tehát cirrhosisban mind a májszövetben, mind a talaján kialakuló HCC-kben a claudin-1 és -7 expresszió emelkedett volt a normál májhoz viszonyítva. A HCV fertőzés nem mutatott összefüggést az emelkedett claudin expresszióval*. Mindazonáltal a cirrhosisban észlelt emelkedett claudin-1 expresszió, mint a HCV egyik belépési receptora, segítheti a HCV hepatocytákba való belépését, ezáltal támogatva a HCV fertőzés fennmaradását, krónikussá válását. Ezen túlmenően a jelenség a hepatocarcinogenesisben is szerepet játszhat és a claudin-1 elleni antitest terápia várható hatásmechanizmusához további adatokat szolgáltat. A primer HCC és a vizsgált májáttétek jellegzetes claudin mintázattal rendelkeztek. A claudin-1 fehérje erős immunhisztokémiai pozitivitást adott a *colorectális carcinoma májáttétjeiben* (CRLM), míg a *pancreas ductalis carcinoma májáttétei* (PLM) és a HCC alacsonyabb expressziót mutatott. A CRLM és PLM csoportok egyaránt erős claudin-4 pozitivitást mutattak, szemben a negatív HCC-vel. A CRLM mintákban erős claudin-3 és -7 immunohisztokémiai pozitivitást észleltünk, mely a HCC és PLM csoportokhoz képest szignifikánsan magasabbnak bizonyult. A HCC tumorsejtjei nem mutattak immunpozitivitást a ZO-1-re és az occludinra, ellenben a colorectális carcinoma májmetasztázisaiban e két fehérje erős festődési reakciója volt detektálható. Eredményein tehát az egyes vizsgált tumorok közötti eltérő claudin mintázatot igazolják, mely tükrözi a kiindulási szövet TJ mintázatát is és utal a daganat hisztogenezisére.

A *biliáris epithel* különböző lokalizációjú tumorainak komplex claudin expressziós mintázatát egymással összevetve megállapítható volt, hogy az egyes szakaszokat eltérő, jellegzetes expressziós profil jellemezte. A claudin-4 reakció intenzitása az extrahepatikus cholangiocarcinomában volt a legerősebb. A cholangiocarcinomák mindegyike pozitív

immunhisztokémiai reakciót adott a claudin-4 elleni antitesttel, a tumorsejtek 75-100 %-a membrán pozitivitást mutatott. A differenciáció mértéke nem befolyásolta szignifikánsan a claudin-4 IHC reakciót, mind a rosszul, mind pedig a jól differenciált carcinomák kifejezett festődést adtak. Ezzel ellentétben a HCC minták egyike sem mutatott claudin-4 festődést. A cholangiocarcinomák claudin-4 expressziója segítséget jelenthet az anaplastikus HCC-től való elkülönítésben és vizsgálataink alapján a claudin expressziós mintázat, de különösen a claudin-4 expresszió, jobban vagy legalább olyan jól elkülöníti az epeúti tumorokat a hepatocelluláris daganatoktól mint a citokeratinok.

A claudin-1 és a claudin-2, valamint a tricellulin fehérje expresszió intenzitása és festődő sejtek aránya is szignifikánsan magasabb volt a *hepatoblastoma* mintákban a tumor körüli, tumormentes májszövethez viszonyítva. A fetális szubtípusban a tricellulin immunreakció szemikvantitatív kiértékelése szignifikánsan magasabb értéket mutatott mind a környező májhoz, mind pedig az embryonális altípushoz képest . A hepatoblastomák jobban differenciált *fetalis komponensében a claudin-1, claudin-2 fehérje és mRNS expresszió, valamint a tricellulin termelődése is szignifikánsan magasabb, mint a rosszabbul differenciált embryonális komponensben*. A rosszabbul differenciált embryonális komponens csökkent claudin-1, -2 és tricellulin expressziója magasabb osztódási aktivitással társul. Ez a jelenség a β-catenin magi transzlokációjával nem mutatott korrelációt. A claudin-1, -2 és tricellulin expresszió tehát a hepatoblastoma sejtek differenciációs markerének tekinthető. A tricellulint alacsonyan expresszáló esetek szignifikánsan rövidebb teljes túlélést mutattak a Kaplan-Meier kiértékelésben a tricellulint magasan, a medián fölött expresszáló esetekhez viszonyítva, mely fontos prognosztikus jelnek tekinthető.

A pancreasban a sejtadhéziós molekulák, a tight junction és más sejtkapcsoló struktúrák és alkotórészeiknek expressziós mintázata fontos feladatot tölt be szövetek integritásának fenntartásában, a sejtek és szövetek polaritásának kialakításában és a sejtkapcsolatok fellazulása révén a daganatok kialakulásában és a tumor progresszióban (van Grevenstein,2006). Az irodalomban korábban közölt, állatok hasnyálmirigyén végzett vizsgálatok a CLDN-2 fehérjét a pancreas ductalis sejteken, míg a CLDN-3 és -4 fehérjét a ductalis és acináris sejteken is detektálták (Rahner,2001). Humán pancreasben erős CLDN-1 és -4 immunhisztokémiai reakciót észleltek a fő és terminalis ductusokban, valamint az acinus sejtekben is, de az endocrin szigetek sejtjei negatívak voltak (Tsukahara,2005). Saját vizsgálatunk eredményei részben egyeztek ezzel, részben pedig további részleteket tártak fel: az emberi ép hasnyálmirigyben a CLDN-1, -3, -4 és -7 a fő-, mellék- és terminális ductusokban, valamint az acinus sejtekben egyaránt termelődik, míg a CLDN-2 csak a ductalis sejtekben expresszálódik.

Elektronmikroszkópos vizsgálatokkal a Langerhans szigetsejtekben Orci és munkatársai TJ jelenlétét detektálták (Orci,1975). Saját kutatásunkban az addig még nem vizsgált, a tight junction felépítésének alapvető elemeinek a CLDN-3-nak és a CLDN-7-nek az expresszióját tudtuk kimutatni. A normál pancreasban tehát a három eltérő hisztogenezisű struktúra jellegzetes claudin expressziós mintázattal rendelkezik: a ductus hámsejtek claudin-1, -2, -3, -4 és -7 expressziót, az acinus sejtek claudin-1, -3, -4 és -7 termelődést mutattak, míg az endocrin szigetek sejtjeiben csak claudin-3 és -7 fehérje expresszió volt észlelhető.

A hasnyálmirigy rákelőző elváltozásaiban, a pancreaticus intraepithelialis lesiókban (PanIN) jellemzően kimutatható a CLDN-4 expresszió (Nichols,2004), míg mások ezekben a lesiókban a claudin-1 jelenlétét detektálták (Tsukahara,2005). Nichols és munkatársai a primer pancreas adenocarcinomában (99%) és ezen tumorok metasztázisaiban csaknem az összes esetben erős, diffúz CLDN-4 fehérje expressziót találtak immunhisztokémiai vizsgálattal, azonban a normál ductalis sejtek és a PanIN léziók jellemzően gyenge pozitivitást adtak (Nichols,2004). Michl és munkatársai az alacsony metasztatikus potenciállal rendelkező, kevésbé invazív pancreas ductalis carcinomákban a metasztatizáló pancreas tumorokhoz képest emelkedett claudin-4 fehérje expressziót mutattak ki (Michl,2003). Ezt erősítette az a megfigyelés is, miszerint a TGF-β megnövekedett expressziója és egyben a K-ras onkogén gátlása *in vitro* csökkenti a CLDN-4 termelődését (Michl,2003). Az *in vitro,* adenocarcinoma sejtvonalakon kapott eredmények alapján a CLDN-4 fehérje expresszió a daganatos mirigyek sejtjeiben apikálisan a legkifejezettebb (Michl,2003). Saját vizsgálataink szerint minden vizsgált pancreas ductalis adenocarcinomában a claudin-4 fehérje kimutatható volt.

A claudin-4 immunhisztokémiai reakció az irodalmi adatokkal egybecsengően az összes vizsgált pancreas ductalis adenocarcinomában pozitív volt, mely pozitivitás hasonló módon az általunk vizsgált cholangiocarcinomákat is jellemezte (Lodi,2006). A csökkenő differenciáltságot mutató pancreas ductalis carcinomákban a claudin-4 fehérje expresszió nem mutatott szignifikáns különbséget. A ductalis carcinomák a CLDN-1, -2 és -7 fehérjéket szintén expresszálták, a CLDN-3 nem volt detektálható, azonban az endokrin pancreas daganatokban erős claudin-3 expressziót tapasztaltunk.

Elsőként írtuk le a claudinok expresszióját a Langerhans szigetekben és a pancreas eredetű endocrin daganatokban. A ductalis adenocarcinomákkal szemben erős, diffúz CLDN-3 és -7 expressziót észleltünk a vizsgált endocrin daganatokban, a CLDN-7 expressziót magasabbnak találtuk, mint a CLDN-3 termelődést és az endocrin tumorok az exocrin ductalis tumorokhoz képest emelkedettebb claudin-7 expressziót mutattak. Ezzel ellentétben az endocrin tumorok negatívak voltak claudin-1-re és -4-re és egy eset kivételével a CLDN-2 immunhisztokémiai reakció is negatív volt. A CLDN-3 és a CLDN-4 a clostridium perfringens (CPE) receptora és a toxin kötődése a

receptoraihoz *in vitro* a pancreas tumorsejtek lízisét váltja ki (Sonoda,1999). A CLDN-3 és -7 pozitív endocrin setjekben kiinduló daganatok szignifikánsan magasabb mértékben termelték ezen fehérjéket, míg a normál ductusokban meglevő CLDN-1, -2, -3, -4 és -7 pozitivitást a tumorsejtek a daganatos átalakulás során nagyrészt megtartották, azonban a CLDN-3 fehérje termelés elveszett és a CLDN-7 fehérjét is kisebb mértékben expresszálják az endocrin tumorokhoz képest. A CPE potenciális targetjei közül tehát szemben a ductalis adenocarcinomákkal az endocrin tumorokban a claudin-3 jön szóba. Offner és munkatársai pancreas carcinoma sejtvonalakon magas CLDN-1, -3, -4 és 7 mRNS expressziót detektáltak (Offner,2005). A CLDN-1, -2 és -4 fehérje vizsgálatunkban szignifikánsan magasabb expressziót mutatott a ductalis adenocarcinomákban az endocrin tumorokhoz képest. Összességében a claudin-3 expresszió megtartottsága a normál endocrin sejtekben és a daganatsejtek endocrin irányú differenciáciálódásában is fontos és jellemző, tehát a claudin-3 fehérje expresszió hiánya a tumorsejtek ductalis eredete mellett szól, melyet a claudin-4 expresszió pozitivitása is támogathat. A claudin expresszió mértéke a tricellulin expresszióval ellentétben nem mutat szignifikáns különbséget a különböző grade-ű, differenciáltságú adenocarcinomák csoportjai között és nem találunk lényeges eltérést a benignus, bizonytalan természetű és malignus endocrin tumorok között sem. A sejtadhézió a daganatos progresszió során csökken. Az endocrin daganatokban a tumorok dedifferenciálódásával csökkenő CLDN-3 és -7 expresszió tendenciája volt látható. Ez nem jelenti önmagában a sejtkapcsolatok fellazulását, mivel számos invazív daganatban a normál hámhoz képest magasabb claudin expressziót lehet megfigyelni, így cervix tumorok esetén például magas CLDN-1 termelődést láttunk (Sobel,2005), epeúti tumorokban kifejezett claudin-4 expresssziót találtunk (Lodi,2006) és colon tumorok esetében is magas claudin-1 termelődést találtak (Dhawan,2005). Általában egyenlőre nem ismert, hogy a komplex mintázaton belül egyes TJ alkotórészek megnövekedett vagy csökkent expressziójának mi a biológiai vagy a carcinogenesisben betöltött szerepe (Heinzelmann-Schwarz,2004).

Összesszegezve: a normál *pancreasban* a három eltérő hisztogenezisű struktúra jellegzetes claudin expressziós mintázattal rendelkezik: a ductus hámsejtek claudin-1, -2, -3, -4 és -7 expressziót, az acinus sejtek claudin-1, -3, -4 és -7 termelődést mutattak, míg az endocrin szigetek sejtjeiben csak claudin-3 és -7 fehérje expresszió volt észlelhető. A pancreas tumorokban észlelt claudin expressziós mintázatot elemezve megállapítottuk, hogy az lényegileg megegyezik a kiindulási szövetek, sejtek expressziós mintázatával. A claudin-1, -2 és -4 fehérje azonban szignifikánsan magasabb expressziót mutat a ductalis adenocarcinomákban az endocrin tumorokhoz képest. Az exocrin ductalis pancreas carcinomák erőteljes claudin-1 és claudin-4 immunhisztokémiai pozitivitást mutatnak és negatívak claudin-3-ra, míg az endocrin daganatok claudin-3 fehérje expressziója erőteljes, de nem detektálható bennük claudin-1 és claudin-4. Az

endocrin tumorok a claudin-7 fehérjét jelentősen erősebb mértékben termelik az exocrin tumorokhoz képest. Az exocrin és endocrin tumorok expressziós profiljában a legjellemzőbb eltérések tehát a claudin-1, -3 és -4 fehérjék esetében voltak megfigyelhetőek, melyek differenciáldiagnosztikai értékkel bírhatnak. A claudin-3 expresszió megtartottsága a normál endocrin sejtekben és a daganatsejtek endocrin irányú differenciálódásában is fontos és jellemző, tehát a claudin-3 fehérje expresszió hiánya a tumorsejtek ductalis eredete mellett szól, melyet a claudin-4 expresszió pozitivitása viszont támogathat. Az epeúti carcinomák és a pancreas exocrin ductalis carcinomák claudin expressziós profiljának hasonlósága ismét megerősíti a TJ alkotórészek expressziós mintázatának fejlődésbiológiai jellegzetességét, mivel e két tumortípus normál anatómiai struktúrái egy telepből fejlődnek, ezért hasonlóságot mutatnak az említett mintázatokban és ezekből egyes lényeges expressziók a carcinogenesis és progresszió során is megtartottak, így a claudin-4 pozitivitás is.

A tricellulinnal kapcsolatos vizsgálataink során kimutattuk, hogy a *tricellulin* jelenléte mind a normál exocrin pancreasban, mind a normál hepatocytákon és epeúti sejtekben jelen volt. A TRIC fehérje pozitivitás pontokban vagy lineáris formában volt tapasztalható a ductusokban, ductulusokban és az acinusokban a sejtek apikális pólusánál. A Langerhans sziget sejtek, csakúgy mint az endocrin tumorok, differenciáltsági foktól függetlenül TRIC negatívnak bizonyultak. Ezzel szemben eredményeink azt mutatták, hogy a jól differenciált pancreas ductális adenocarcinomáiban a TRIC a normál ductusokhoz hasonló pontszerű pozitivitás mutatott. A grade-2 tumorokban azonban már szignifikáns csökkenés volt tapasztalható, mely tovább csökkent az igen rosszult differenciált grade-3-as daganatokban. A TRIC occludinnal való ko-lokalizációja megerősített a TRIC TJ-ban való jelenlétét. A pancreas ductális carcinomák dedifferenciálódás során csökkenő TRIC expressziója a TJ érintettségét mutatja a folyamatban, melyhez hasonló folyamatot gyomorrákban és több más humán daganatban is kimutattak (Masuda,2010; Sanada,2006).

Vizsgálatainkban a HCC-k a normál májakhoz hasonlóan nagy heterogenitást mutattak a tricellulin fehérje expresszióban és nem volt szignifikáns különbség a két csoport között. Hatból párból öt HCC esetében a tumor a környező tumormentes májszövethez képest emelkedett tricellulin expressziót mutatott, tehát a hepatocarcinogenesis során egyes esetekben a tricellulin expresszió nőhet, de összességében a tricellulin expresszió és a grade, tumorméret, etiologia vagy kor között nem találtunk összefüggést. Mivel a közelmúltban leírt HCV ko-receptorként funkcionáló occludinnal és claudinnal a tricellulin szintén ko-lokalizációt mutat, felmerül szerepe a HCV sejtbe jutásának elősegítésében.

A tricellulin magi jelenléte eltérő biológiai szabályozásra utalhat, melyet eredményezhet genetikai eltérés vagy poszt-transzlációs módosítás. Melanoma sejtekben például a claudin-1 magi loklizációja PKA-indukálta foszforiláció eredménye (French,2009). Másfelől a tight junction

fehérjéknek szerepe lehet a jelátvitelben (Terry,2010). Az általunk vizsgált HCC-k közel ötödében tudtunk magi tricellulin pozitivitást kimutatni és az esetek többségében ez gyenge membránfestődéssel társult, mely jelezheti a tricellulin sejten belüli transzportjának zavarát. *A cholangiocarcinoma dedifferenciálódása során kimutatott csökkent tricellulin expresszió hasonló volt a korábbi vizsgálatunkban a pancreas ductális carcinomában észlelt jelenséghez (Korompay,2012). A közös vonás magyarázata lehet a két tumor közös hisztogenezise.* Az adenocarcinomákban a szöveti, illetve cytológiai szinten észlelt dedifferenciációja tetten érhető az abortív mirigyképződésben, de akár egy egysejtes invázió során is. Ezen folyamatokban a sejtkapcsolatok elvesztése, illetve változása a sejtkapcsoló struktúrák alkotórészeinek csökkent vagy növekedett termelődésének vagy sejten belül megváltozott eloszlásának is lehet a következménye. A carcinogenesisben és tumor progresszióban tehát egyes alkotórészek túltermelődése vagy csökkent expressziója egymás mellett létezik és végső soron az expressziós mintázat megváltozása jellemez egy állapotot (Gonzalez-Mariscal,2008; Lal-Nag,2009). Összességében a változások eredményezhetik a sejtközötti kapcsolatok leépülését és a paracelluláris permeabilitás és transzport kóros megváltozását (de Oliveira,2005). A cholangiocarcinomában a normál epeúti hámhoz viszonyítva a claudin-4 túltermelése függetlennek bizonyult a tumor grade-hez képest. A tumorok biológiai viselkedésében a megváltozott expressziójú TJ alkotórészek hatása igen eltérő lehet. A daganat típusától függhet, hogy egy adott fehérje szintű változás a daganat jobb vagy rosszabb prognózisával jár együtt (Shin,2011; Yoshida,2011). Másfelől egyes TJ fehérjék ugyanabban a daganatban tumor szupresszor tulajdonságokkal bírhatnak, míg más TJ alkotórészek pedig tumor promoterként viselkedhetnek (Cheung,2005). A cholangiocarcinomákban, mint klasszikus adenocarcinomában azonban a pancreas ductális carcinomákhoz hasonlóan a megőrzött tricellulin expresszió a tricellulint alacsonyan termelő tumorokhoz képest szignifikánsan hosszabb teljes túléléssel járt együtt. A tricellulin expresszió csökkenése a tumorsejtek dedifferenciációjával és magasabb grade-el járt együtt.

Az FLC a HCC egy variánsa, melynek nem ismert az etiológiája és pathogenesise. A klinikai jellegzetességek mellett több fehérje marker expressziójának immunhisztokémiai vizsgálatával el lehet különíteni az FLC-t, a HCC-t, a CCC-t és a hepatoblastomákat. A markerek expressziós mintázata megkülönbözteti az egyes entitásokat (Ishak,2001). Az FLC-k citokeratin profilja egyaránt mutat hepatocyta eredetű (CK8, 18) és epeúti eredetű (CK7) vonásokat, melyet saját vizsgálatunk és mások eredményei is megerősítettek (Abdul-Al,2010; Ward,2010). Elsőként mutatta ki munkacsoportunk, hogy az FLC megváltozott claudin expressziós mintázatot mutat, mely inkább hasonló a HCC-hez, mint a cholangiocarcinomák claudin expressziós profiljához. Mindazonáltal az FLC-k mind kvantitatív, mind pedig kvalitatív értelemben jellegzetesen eltérő claudin expressziós mintázattal rendelkeznek, mely elkülöníti őket mind a HCC-től, mind pedig a

CCC-től. Nemrég írták le az irodalomban azt a genetikai eltérést (Honeyman, 2014), mely az eddig vizsgálatok alapján az FLC-ket jellemzi, így a jövőben várhatóan több információ fog rendelkezésre állni ezen daganatok molekuláris pathogeneziséről. Az FLC eredményeink szerint a HCC-hez és a CCC-hez viszonyítva alacsonyabb CLDN-1 és emelkedett CLDN-2 fehérje expressziót mutat és a normál májhoz képest mindkét fehérje termelődése megnövekedett az FLC-ben. A claudin-1 általában magas expressziót mutat a hámokban és a barrier funkció és a polaritás fenntartásában kiemelkedő szerepe van. A transzgén egér kísérletek tanúsága szerint is kritikus szerepe van, mivel a claudin-1 K.O. egér bár megszületik, de pár nap alatt dehidrációban és a következményes exsiccosisban elpusztul, mivel a hámok nem képesek a víz és elektrolit szeparációt megoldani (Furuse,2002) (Tamura,2014). A claudin-1 kóros expressziója a molekuláris jelátviteli utak érintettsége folytán is hozzájárulhat a laphámrákok kialakulásához és egyes tumorok agresszív kórlefolyásához (Bello,2008; Dos Reis,2008; Paschoud,2007; Sobel,2006). Az ismert adatok CLDN-1 szerepéről a hepatocarcinogenesisben ellentmondásosak. A CLDN-1 expresszió erőssége egyfelől a HCC malignitásával jól korrelált (Higashi,2007), azonban *in vitro* eredmények szerint a CLDN-1 fontos szerepet játszik a HCC sejtek inváziójában (Yoon,2010). Saját eredményeink azt mutatták, hogy a normál májhoz képest mind a HCC, mind pedig a CCC szignifikánsan túltermelte a CLDN-1-t, mely a tumorsejtek inváziós képességéhez való hozzájárulást támogatja. A claudin-2 ezzel ellentétben magasabb volt FLC-ben, mint HCC-ben és CCC-ben, és az irodalmi adatok alapján magasabb paracelluláris permeabilitással, pórusképződéssel és csökkent transepitheliális elektromos ellenállással jár együtt (Van Itallie,2009). CLDN-4 fehérje expressziót a HCC-hez hasonlóan az FLC sejtekben sem lehetett immunhisztokémiai módszerekkel kimutatni. Az, hogy az FLC sejtek a claudin-4-t nem termelik még az acinális jellegű struktúrákban sem, tovább erősíti azt a vélekedést, hogy az FLC inkább hepatocyta irányú differenciálódást mutat, annak ellenére, hogy CK-7-t expresszál, AFP-t pedig nem. Az egyik legérdekesebb eredmény az FLC-k CLDN-5 expressziója volt, melyet általánosan endothel specifikus TJ fehérjének tartanak. Mégis több munkacsoport mutatta már ki a CLDN-5-et normál hámsejtekben (Amasheh,2005), a fejlődő retinában (Kojima,2002) és a normál tüdő hengerhámsejtekben és a pneumocytákban (Paschoud,2007). A CLDN-5 expressziója tumorokban is azonosítható volt (Soini,2005), így az emlő Paget betegségében (Soini,2004) és tüdő adenocarcinomában is (Paschoud,2007). Sőt, a CLDN-5-et kutyák hepatoid mirigyeiben, adenomákban és rosszul differenciált carcinomákban is kimutatták (Jakab,2010). Az általunk vizsgált HCC és CCC esetek egyike sem expresszálta a claudin-5-et, bár az immunhisztokémiai reakció belső pozitív kontrolljaként a tumorok neovasculáris endotheljében a CLDN-5 reakció pozitív volt. A CD34, mint vasculáris marker szintén pozitív volt az erekben, de a tumorsejtek negatívak voltak és a HCC-k és a FLC-k sem mutattak különbséget, mely megfigyelést korábbi irodalmi adatok már alátámasztottak (Abdul-

Al,2010). A CLDN-5 expresszió funkcionális magyarázatát még nem ismerjük, mindenesetre jelzi, hogy az FLC-k molekuláris mechanizmusai jellegzetesen különböznek a többi májtumorétól. Nemrég leírták, hogy a CLDN-5 az ösztrogén egy újonnan felismert célpontja az erek endotheljében, ennélfogva a pathogenesisben is szerepet játszhat és a jövőben terápiás felhasználhatóságára is mód nyílhat (Burek,2010). Vizsgálatainkban összességében számos különbséget tártunk fel az FLC és a HCC TJ komponenseinek expressziós mintázatában, bár az FLC claudin expressziós mintázata inkább a HCC-re hasonlít, mint a CCC-re. Az FLC claudin-5 pozitivitása egyedi vonás a primer májtumorokon belül és ezért differenciáldiagnosztikai markerként használható és fontos lenne megérteni szerepét az FLC pathogenezisében.

Munkacsoportunk mutatta kis először a tricellulin jelenlétét humán májtumorokban. A *tricellulin*-pozitivitás detektálható a hepato- és cholangiocytákban. A *fibrosis* súlyossága nem mutatott összefüggést a tricellulin festődés mértékével. A makro- és mikronoduláris *cirrhotikus májszövet* tricellulin-expressziós mintázata hasonlónak bizonyult a normál májszövethez. A tricellulin IH reakció a vizsgált *HCC-ben* igen heterogén volt és nem mutatott összefüggést a tumorok differenciáltságával. A *intrahepatikus cholangiocarcinomákban (iCCC),* a pancreas ductalis carcinomákhoz hasonlóan, a daganatok szövettani fokozatának növekedésével, a dedifferenciálódással párhuzamosan a tricellulin fehérje expressziójának szignifikáns csökkenését észleltük. A rosszul differenciált (grade 3-as) tumorok tricellulin fehérje expressziója kifejezetten csökkent a jól differenciált tumorokhoz képest. A *fibrolamelláris HCC-ben (FLC)* a klasszikus HCC-csoporthoz hasonlóan az acináris struktúrákban döntően a tumorsejtek apikális pólusán volt látható lineáris membránpozitivitás.

A cholangiocarcinoma esetében a tricellulin fehérjét magasan expresszáló ’tricellulin high’-csoportjának túlélését szignifikánsan hosszabbnak találtuk az alacsonyan expresszáló ’tricellulin low’ csoporthoz képest. A tricellulin fehérjét magasan expresszáló HCC-k esetében azonban a betegek teljes túlélési ideje szignifikánsan rövidebb volt.

Összegzésül tehát elmondhatjuk, hogy elsőként írtuk le a tricellulin expressziós mintázatát humán endocrin és exocrin pancreasban, valamint endocrin és exocrin pancreas daganatokban. A *normál exocrin pancreasban* mind az acinussejtek, mind pedig a ductulusok és ductusok expresszálták a tricellulin fehérjét. A *pancreas ductalis adenocarcinomában,* a normál hasnyálmirigy ductus hámsejtjeihez hasonlóan a tricellulin immunhisztokémiai reakciója a daganatsejtek luminális pólusán mutatott pontszerű pozitivitást. A normál endocrin sejtek és a belőlük kialakuló daganatok azonban nem termelnek tricellulint. A tricellulin termelődése a pancreas ductalis carcinomák dedifferenciálódásával összhangban csökkent. A Kaplan-Meier analízis szignifikáns összefüggést mutatott ki a ductalis adenocarcinomák differenciáltsága és a betegek túlélése között. Másfelől a tricellulin expresszió és a tumor differenciáltsága között

tapasztalt szignifikáns összefüggések alapján a vizsgált fehérje expressziója és a túlélés mértéke között indirekt pozitív korreláció volt kimutatható. A claudin expresszió mértéke azonban, a tricellulin expresszióval ellentétben nem mutatott szignifikáns különbséget a különböző fokozatú pancreas ductalis adenocarcinomák csoportjai között és nem találtunk lényeges eltérést a benignus, bizonytalan természetű és malignus endocrin tumorok között sem. A pancreas exocrin ductalis adenocarcinomák és a cholangiocarcinomák tricellulin expressziója a dedifferenciáció során szignifikánsan csökken, mely egyfelől megerősíti ezen daganatok közös hisztogenezisét, másfelől az intercellularis kapcsolatok fellazulását is jelezheti, ezáltal növelve a tumorsejtek inváziós és metasztatizáló képességét. Ezen eredmények is felhívják a figyelmet arra, hogy az egyes sejtkapcsoló struktúra alkotórészek expressziós változásának lehet differenciáldiagnosztikai, prognosztikai jelentősége, de ebből a TJ egészének stabilitására, erősségére, funkcionalitására nézve nehéz következtetéseket levonni.

A *hepatoblastoma* a gyermekkor leggyakoribb primer májdaganata gyermekekben és a HCC-vel ellentétben jól reagál a kemoterápiás kezelésre. A fetális epitheliális altípus esetében (döntően vagy kizárólag fetális komponenst tartalmazó tumor) jobbak a közölt túlélései adatok, különösen akkor ha a tumor rezekció épben történt és kicsi a tumorsejtek osztódási aktivitása (Lopez-Terrada,2012). A távoli áttétek jelenléte vagy lokális recidíva kedvezőtlen prognosztikai jel (Ismail,2012). A fetális altípus jól differenciált sejtekből áll, melyek fetális hepatocytákra emlékeztetnek. Több proliferációs marker expressziója eltérést mutat HB epitheliális altípusaiban: a fetalis sejteket magas TGF-α és alacsony PCNA és cyclin A expresszió jellemzi, míg az embryonális sejtek szignifikánsan magasabb osztódási aktivitást mutatnak (Kiss,1998), (Halasz,2006; Schlachter,2014). A fetális szubtípus sejtkapcsoló struktúra alkotórészként fokozottan termeli az E-cadherint (von Schweinitz,1996). A klinikai stádium mellett jelenleg a HB szövettani tipizálásának van meghatározó prognosztikus és prediktív szerepe. A HB differenciáltságának mértékét az epitheliális komponensek aránya határozza meg, a hepatoblastomák közel 7%-a mutatja a jól differenciált fetális epitheliális fenotípust, mely esetben az elfogadott nemzetközi terápiás protokollok alkalmazásával gyakorlatilag minden beteg túléli betegségét (Malogolowkin,2011). A tisztán fetális altípusban nincs szükség kemoterápiás kezelésre, a daganat teljes eltávolítása elégséges. Másfelől viszont a fetális altípus az esetek többségében a kevésbé differenciált epitheliális szubtípussal, az embryonális komponenssel együtt észlelhető. A rosszabbul differenciált, magasabb osztódási aktivitással rendelkező embryonális komponens várható klinikai lefolyása rosszabb. Ugyanakkor a két eltérő epitheliális komponens morfológiai elkülönítése nem mindig egyértelmű és kevés megbízható markerek áll rendelkezésre. Emellett a prognózis, illetve predikció számára is kevés a felhasználható indikátor. A Sal-like protein 4

(SALL4) transzkripciós faktor expresszióját leírták embryonális szubtípusban, de a fetális és mezenchymális komponensek negatívnak bizonyultak (Gnemmi,2013). A HepPar 1 erős immunhisztokémiai festődést mutat a fetális altípusban, azonban az embryonális és a mezenchymális komponens szintén negatívnak bizonyult. A CEA és glutamin szintetáz is szintén nagyobb mértékben expresszálódik a fetális altípusban az embryonálishoz képest (Armengol,2011). A claudin-1 és a claudin-2, valamint a tricellulin fehérje expresszió intenzitása és festődő sejtek aránya is szignifikánsan magasabb volt a *hepatoblastoma* mintákban a tumor körüli, tumormentes májszövethez viszonyítva. A fetális szubtípusban a tricellulin immunreakció szemikvantitatív kiértékelése szignifikánsan magasabb értéket mutatott mind a környező májhoz, mind pedig az embryonális altípushoz képest . A hepatoblastomák jobban differenciált *fetális komponensében a claudin-1, claudin-2 fehérje és mRNS expresszió, valamint a tricellulin termelődése is szignifikánsan magasabb, mint a rosszabbul differenciált embryonális komponensben*. A rosszabbul differenciált embryonális komponens csökkent claudin-1, -2 és tricellulin expressziója magasabb osztódási aktivitással társul. Ez a jelenség a β-catenin magi transzlokációjával nem mutatott korrelációt. A claudin-1, -2 és tricellulin expresszió tehát a hepatoblastoma sejtek differenciációs markerének tekinthető. A tricellulint alacsonyan expresszáló esetek szignifikánsan rövidebb teljes túlélést mutattak a Kaplan-Meier kiértékelésben a tricellulint magasan, a medián fölött expresszáló esetekhez viszonyítva, mely fontos prognosztikus jelnek tekinthető.

V.2. TJ expressziós mintázatának prognosztikai és prediktív jelentősége, valamint az eltérő mintázatok értelmezése a daganatok hisztogenezisében és pathobiológiájában urogenitális tumorokban

A korábbi irodalmi megfigyelésekhez hasonlóan a különböző claudinok urothelen belüli eloszlása jellegzetes a húgyúti hámra (Nakanishi,2008). A claudin-1 expresszió típusosan a basális és intermedier rétegekre jellemző, míg a claudin-3, -4, és -7 jelenléte főleg az urothel felsőbb rétegeiben volt megfigyelhető. A claudin-4 és -7 ezen expressziós mintázata különösen kifejezett volt UP-ban, PUNLMP-ben és LG-UCC-ben. A claudin-3 expresszió viszont gyenge és elszórt volt a vizsgált tumorentitásokban.

Annak ellenére, hogy a vizsgált urotheliális LG-UCC-k nem voltak invazívak, a LG-UCC-k szignifikánsan csökkent claudin-1 expressziót és emelkedett Ki-67 indexet mutattak az IUP-khez képest. Ez segítséget adhat a pathologusoknak az orientáció szempontjából nehezen megítélhető esetekben. A pontos diagnózisnak jelentősége van a klinikum szempontjából, mivel az IUP eseteket a sebészi rezekció után nem kezelik, míg a LG-UCC betegek postoperatív kezelésben részesülnek. Ezen túlmenően a jövőben még fontosabbá fog válni, hogy a valóban agresszívabb onkológiai kezelést igénylő betegeket jól be lehessen azonosítani és ezáltal hatékonyabb legyen az orvosi beavatkozás és következményesen növekedjen a túlélés ideje. Eiber és munkatársai szintén leírták az invertált növekedési mintázatot mutató urotheliális carcinoma esetekhez képest szignifikánsan csökkent Ki-67 festődést IUP-ban, ugyanakkor a CK-20 expresszióban nem mutatkozott különbség a két csoport között (Eiber,2007). Vizsgálatunkban a UP-hez, IUP-hez és PUNLMP-hez képest a LG-UCC-kben észlelt csökkent claudin-1 and -2 expresszió tovább erősíti azt a nézetet, mely szerint a megváltozott TJ összetétel a carcinogenesis és a tumor progresszió egyes lépéseit jól jellemzi. Ugyanakkor csak az LG-UCC-k IUP-hez viszonyított csökkent claudin-1 expressziója bizonyult statisztikailag szignifikánsnak. Ennélfogva egyértelmű és általános érvényű következtetést a LG-UCC-k csökkent claudin expressziójáról nem lehet levonni. Másfelől viszont Nakanishi és munkatársai megnövekedett claudin-1, -3, és -4 expressziót figyeltek meg a felső húgyútak előrehaladott stádiumú UCC-jében, mely jelenség rövid túléléssel asszociálódott (Nakanishi,2008). A munkacsoportunk a rossz prognózissal szövődött, rövidebb RFS-el rendelkező low-grade, nem-invazív UCC-kben magas claudin-4 expressziót írt le, mely egybecseng a claudin-4 expresszió és az előrehaladottabb húgyúti carcinogenesis és progresszió között feltételezett összefüggéssel. Ezen adatok összességében arra utalnak, hogy a claudin expressziós profilt az UCC-k klinikai viselkedésének predikciójára is fel lehetne használni. Saját vizsgálatunkban nem találtunk

szignifikáns összefüggést a claudin-1, claudin-7, CK-5/6, CK-20 és Ki-67 expresszió és vizsgált urotheliális tumorcsoportok között, sem pedig az RFS között. Lechpammer és munkatársai érdekes megfigyelést tettek: a világos sejtes veserák közepes vagy erős claudin-3 és -4 expressziója korrelált a teljes túléléssel (Lechpammer,2008). Hasonló módon a claudin-4 expresszió jól korrelált az előrehaladott stádiumú prostata rákkal, míg a csökkent claudin-1 expresszió a multivariáns analízisben a betegség rekurrenciájának független prediktorának bizonyult (Sheehan,2007). Ezzel ellentétben, Boireau és munkatársai invazív és high-grade UCC-ben csökkent claudin-4 expressziót írtak le mind fehérje (IHC), mind pedig mRNS szinten, míg a felszínes, low-grade UCC-k nem mutatták ezt a jelenséget (Boireau,2007). Ezen szerzők ugyanakkor a tumorok eltérő claudin expresszióját a környező, tumormentes uroepithelhez képest adták meg. Ezt a vizsgálati metodikát és eredményeit azonban a „field carcinogenesis" és a húgyhólyag normál húgyúti hámjával való összehasonlítás hiánya alapvetően befolyásolhatja (Jones,2005).

Összességében a magas claudin-1 fehérje expresszió segíthet elkülöníteni az IUP eseteket az UP-tól, a PUNLMP-től és a LG-UCC-től. A low-grade papilláris urothelialis rák magas claudin-4 expressziója és a PUNLMP-ben észlelt alacsony claudin-1 expresszió rossz klinikai prognózist jelezhet és ezen eltérések rövidebb recidiva mentes túléléssel társulnak. Ezzel ellentétben a PUNLMP-k magas claudin-1 expressziója és az alacsony claudin-4 expresszió a LG-UCC-kben jelentősen jobb klinikai prognózissal társul. Ezen tulajdonságok alapján a jövőben segíthetnek azon betegek kiválasztásában, akik szorosabb utánkövetést, illetve adott esetben agresszívebb terápiát igényelnek.

Az urothelen és a húgyhólyag tumorokon a claudin expressziós mintázatának feltérképezésében végzett kutatásainkkal alapvetően a sejtkapcsoló struktúrák molekuláris felépítésének változásait, ezen belül elsősorban a claudinok szerepét kívántuk feltárni a pathologiás folyamatokban, így a húgyhólyagrák kialakulásában és progressziójában. Ezen felül a claudin expressziós mintázatban rejlő differenciál diagnosztikai lehetőségeket és prognosztikus erőt kívántuk vizsgálni. Klinikailag ugyanakkor fontos a helyes diagnózis és az ehhez szükséges markerek megtalálása, mivel az újonnan diagnosztizált urothelialis carcinomák (UCC) mintegy fele recidiválni fog és 10%-20%-uk pedig magasabb grade-ű, illetve stádiumú daganatba fog progrediálni. A claudinok pathologiás állapotokban eltérő expressziós mintázata nemcsak a differenciál diagnosztikában, hanem egyes tumorokban prognosztikus, illetve prediktív jelentőséggel is bírhat. Az emlőrákok esetében a „claudin low „ csoport az elmúlt években önálló entitássá lépett elő és jellegzetes, sajnos rossz prognózissal társul (Szasz, 2011). A húgyhólyag tumorokon végzett vizsgálataink a high grade UCC-kben szignifikánsan magasabb CLDN-4 és csökkent CLDN-7 fehérje expressziót találtak a low grade UCC-khez képest. A tumoros és nem tumoros szövetek aránya mintánként változó lehet és ez nem az izominvázió jelenségének

köszönhető, mert a LG és HG csoportok közti összehasonlítást mind a T2 stádiumú daganatok HG csoportba történő kizárásával, mind pedig bevételével elvégeztük és hasonló végeredményre jutottunk. A claudin mintázat önálló felhasználhatóságára mutat az az eredményünk, hogy a magas claudin-7 expresszió rövidebb rekurrencia mentes túléléssel asszociált TaT1 UCC-kben, azonban a magasabb Ki-67 expresszió nem mutat ezzel összefüggést. Érdekes módon a claudin-7-et alacsonyan vagy magasan expresszáló csoportok között nem mutatkozott szignifikáns túlélésbeli különbség annak függvényében, hogy kaptak-e a betegek postoperatív BCG kezelést vagy intravesicalis kemoterápiát ($\chi 2$ teszt). Így tehát a claudin-7 expresszió volt az egyedüli variábilis tényező mely befolyással volt vizsgálatunkban az eltérő rekurrencia-mentes túlélésre (RFS) nem izom-invazív húgyhólyag rákban.

Vizsgálatunkban különös módon a RFS hosszabb volt a HG csoportban a LG-hez képest, mely megfigyelést mások vizsgálatai is megerősítettek. Egy hosszú távú követéssel a low-grade UCC betgegekben a tumor rekurrenciája több mint 50 % lett (Miyamoto,2010), de alacsonyabb, mindössze 35% volt a T1 stádiumú, high-grade urothelialis tumorokban intravesicális BCG terápiát követően (Kakiashvili,2011). May és munkatársai ugyanakkor rövidebb RFS-t és magasabb rekurrencia rátát észleltek HG papilláris UCC-ben a LG tumorokkal összevetve (May,2010). A mi vizsgálatunkban a low-grade tumorokat 48% rekurrencia jellemezte, míg a high grade daganatoknál 17% recidivát észleltünk. A magasabb frekvenciájú recidiva az RFS-re is hatással lehet. A hosszabb RFS a high grade csoportban valószínűleg a BCG terápiának köszönhető, mely terápiában a HG betegek csoportjából 20-an részeültek, míg összesen 1 beteg a LG csoportban. A BCG terápia hatása a rekurrencia késleltetésére ismert jelenség (Jacobs,2010); (Kakiashvili,2011)

Összegzésül megállapítottuk, hogy a *normál urothelben* a claudin-1 fehérje expresszió alapvetően főként az urothel basalis rétegeiben mutatkozott, míg a claudin-2 reakció a basalis/peribasalis rétegekben. A claudin-3 és -5 immunreakció gyakorlatilag negatív volt és a claudin-10 sem volt detektálható. A claudin-4 és -7 immunhisztokémiai pozitivitás viszont az urothel felső rétegeit jellemezte. A húgyhólyagrákok csökkent claudin-1 és emelkedett claudin-2, -4 és -7, valamint Ki-67 fehérje expressziót mutattak, míg a claudin-1, -2, -4 és -7 mRNS expresszió emelkedett volt a nem-gyulladásos kontrollhoz viszonyítva. A morfometriai vizsgálatunk kimutatta, hogy a T2-es stádiumú, izominvazív tumorok figyelembe vételétől függetlenül a *HG-UCC*-k szignifikánsan magasabb claudin-4 és Ki-67, valamint szignifikánsan alacsonyabb claudin-1 fehérje expressziót mutattak a *LG-UCC* tumorokhoz viszonyítva. A HG tumorok szignifikánsan rosszabb teljes túléléssel rendelkeztek a LG tumorokhoz képest.

Az *invertált papillomák* mintegy háromnegyedében a claudin-1 festődés a daganat teljes terjedelmében pozitivitást adott és összességében az invertált papillomákban szignifikánsan emelkedett claudin-1 expresszió mutatkozott a papillomákkal, valamint a PUNLMP-kkel és a LG-

UCC-kkel való összehasonlításban, akár morfometriai, akár szemikvantitatív kiértékelést alkalmaztunk. A claudin-1-et alacsonyan, azaz a medián alatt expresszáló PUNLMP-k szignifikánsan rövidebb szövődmény mentes túlélést mutattak a claudin-1-et magasan, a medián fölött expresszáló PUNLMP-khez képest. A claudin-4-et magasan, a medián fölött termelő LG-UCC-k szignifikánsan rövidebb szövődmény mentes túléléssel rendelkeztek a claudin-4-et alacsonyan, a medián alatt expresszáló LG-UCC-khez képest, azonban érdekes módon a Ki-67 expresszió nem mutatott összefüggést a túléléssel. A LG-UCC-k szignifikánsan magasabb, a Ki-67 magi pozitivitás által jelzett proliferációs aktivitással rendelkeztek a normál urothelhez, papillomákhoz és a PUNLMP-khez képest. Azon Ta-T1-es tumorok, melyek magasan, azaz a medián fölött expresszálták a claudin-7 fehérjét szignifikánsan rövidebb szövődmény mentes túléléssel rendelkeztek a claudin-7-et alacsonyan, a medián alatt expresszáló tumorokhoz képest

A claudin expresszió mértéke és mintázata a *normál cervicalis hámhoz* képest már a carcinogenesis korainak szakaszaiban is, tehát a CIN I-II -ben is megváltozott. A legkifejezettebb eltérés a claudin-1 és -7 fehérjék esetében volt észlelhető, melyek termelődése a progresszióval jelentősen növekedett, a maximumát a CIN III/CIS léziókban érve el. *Elsőként igazoltuk, hogy a cervicalis carcinogenesis folyamatában számos TJ protein expressziója jelentősen megváltozik. A várttal ellentétben a praemalignus elváltozásokban fokozódott az egyes claudinok expressziója.* Ezen megfigyelés arra utal, hogy a TJ módosulása, mely ismert a carcinogenesis során, nem feltétlenül az egyes TJ-t alkotó proteinek elvesztésével jár, ellenkezőleg, átmenetileg fokozott expresszió mutatható ki, legalábbis a korábbi szakaszokban. Számos adat igazolta vizsgálataink elkezdését követően az irodalomban, hogy ez más szervek laphám eredetű praemalignus elváltozásaiban is hasonlóan történik. A nagyobb mennyiségben kimutatható TJ protein jelenléte, mely a praemalignus léziókban észlelhető, nem feltétlenül jelenti azonban a TJ funkció „erősödését”, azaz a sejtkapcsolatok szorosabbá válását, hanem ellenkezőleg, a barrier és permeabilitási funkció károsodását jelezheti, mely kedvezhet a daganatsejtek disszociációjának, a sejtkapcsolatok lazulásának és a növekedési faktorok hatásának fokozott érvényesülését teszi lehetővé. A vizsgált claudinok expressziójának jelentős növekedése a daganat előtti elváltozásokban a sejtkapcsolatok alakulását új megvilágításba helyezi. A fenti eltérések arra utalnak, hogy a sejtkapcsolatok TJ fehérjék által történő szabályozása a protein összetevők igen bonyolult kölcsönhatásának az eredménye, mely nem feltétlenül követi az elvárt mennyiségi „csökkenés” lehetőségét. A TJ pontosan felépített molekuláris szerkezetében az egyedi összetevők arányának megváltozása is alapvető funkcionális zavart eredményezhet. *A leírt TJ fehérjék expressziójának a fokozódása, elsősorban a claudin-1 és -7 esetében, a „rezisztens” típusú laphám praemalignus szakaszait jellemző elváltozás.* Mindez azt a reményt nyújthatja, hogy a fokozott claudin expresszió

kiegészítő markerként jelezheti a korai eltéréseket a cervicalis carcinogenesisben. Diagnosztikus felhasználása mind az immunhisztokémiai, mind az immuncitokémiai vizsgálatok során felmerülhet. A T1+T2 laphámrákokban a TJ fehérjék expressziójának jelentős csökkenése volt megfigyelhető a praemalignus elváltozásokhoz viszonyítva, azonban még magasabb volt a normális hámban detektált értékekhez viszonyítva. Ezen adatainkat munkánk megjelenése óta számosan igazolták az irodalomban, hivatkozva megfigyeléseinkre. Meglepő, hogy a TJ proteinek még jelentős mennyiségben kimutathatók az invázió során és fokozottabban expresszálódhatnak a daganatban, mint a normális hámban. Ezen adatok a sejtkapcsolatok szabályzása igen bonyolult folyamatának fontosságát hangsúlyozzák a carcinogenesis folyamatában.

Munkacsoportunk a claudin expresszió jellegzetes változását számos tumorban vizsgálta és publikálta eredményeit (Gyorffy,2005; Halasz,2006; Lódi,2006; Tokes,2005), így a cervix premalignus lézióiban és malignus tumoraiban (Sobel,2005). A tumorokban észlelt jellegzetes expressziós mintázatok megkülönböztethetik a különböző hisztogenezisű tumorokat (Soini,2005). Az endometrioid és seropapilláris endometrium adenocarcinomák jellegzetes claudin-1 és -2 expressziós különbségei szintén ezt a nézetet támogatják. Tehát összegzésük megállapítottuk, hogy a *normál cervicalis laphámban* az occludin és a claudin-2 fehérje egyaránt a basalis rétegben lokalizálódott, míg a syndecan-1 és a claudin-1, -4 és -7 termelődés a parabasalis és intermedier rétegben volt kimutatható. A cervicalis intraepithelialis neoplasia (CIN) és invazív carcinoma stádiumaiban a *claudin-1* fehérje expresszió szignifikáns növekedése volt detektálható, mely a progresszió előrehaladásával növekedett. A *claudin-4, -7* expresszió a CIN léziókban ugyancsak szignifikánsan magasabb volt a normál hámhoz képest. A praemalignus elváltozásokban a claudin-1 expressziója mutatta a legerőteljesebb növekedést, mely a CIN diagnosztikus markereként szolgálhat. Míg a claudinok expressziója a CIN/CIS léziókban progresszíven nőtt, addig a *syndecan-1* expresszió csökkent a CIN progressziójával. Ezen adatok összeségében azt mutatják, hogy az egyes TJ protein alkotórészek és a syndecan-1 eltérő, azonban jellegzetes expressziós mintázatot, illetve változásokat mutatnak a cervicalis carcinogenesisben.

A TJ szelektív permeabilitása az embryo beágyazódásában is szerepet játszik, befolyásolhatja az endometrium befogadási képességét (Riesewijk,2003; Wang,2004). Egyes claudinok expressziójára hatással lehetnek jelátviteli útvonalak, így a claudin-1 termelődésére a β-catenin jelátviteli útvonal (Miwa,2001), a claudin-4-ére a transforming growth factor β (TGF-β) (Michl,2001), a claudin-2-ére az IL- 1β (Yamamoto,2004) és ezen feltárt kapcsolatok száma folyamatosan bővül és fordított irányban is működhet egyes TJ alkotórészek és jelátviteli útvonalak között. Vizsgálatunkban fehérje szinten a claudin-1 és -2 immunhisztokémiai reakció jól elkülönítette a seropapilláris variánst az endometrioid endometrium adenocarcinomától, azonban az mRNS expresszió csak a claudin-1

expresszióban tárt fel szignifikáns különbséget a két altípus között. A claudinok expressziós szabályozása során a pathologiás történések funkcionális magyarázata ellentmondásos lehet, mivel sokszor a komplex változások egyes elemeit látjuk. Az alacsony claudin-1 expressziót a colorectalis carcinoma invazív tulajdonságával hozták összefüggésbe (Resnick,2005), csakúgy, mint emlőrákban (Tokes,2005). Egyes faktorok mind a claudin-1, mind pedig a claudin-2 expresszióját befolyásolják, míg mások szelektíven hathatnak (Escaffit,2005; Ikenouchi,2003; Mankertz,2004; Miwa,2001). A két claudinnak eltérő fiziológiás, funkcionális szerepet tulajdonítanak: a claudin-1 az epithelialis barriert kevésbé áteresztővé teszi (Furuse,2002; Inai,1999), míg a claudin-2 a junkciók áteresztőképességét növeli (Amasheh,2002; Furuse,2001). Bár a claudin-1 és -2 expressziós különbségének funkcionális jelentősége nem tisztázott, a jellegzetes, homogén immunhisztokémiai mintázat alkalmas az I. és II. típusú endometrium carcinoma kielégítő diagnosztikus hatékonyságú elkülönítésére. Santin és munkatársai (Santin,2005) mRNS chip technologiával a claudin-3 és -4 expressziót azonosították, mint az endometrium seropapilláris típusának markerét, azonban eredményeink szerint sem a claudin-3, sem a claudin-4 nem mutat jellegzetes különbségeket a két entitás között, bár expressziójuk magas volt. A claudin expresszió alapján a seropapilláris carcinoma claudin-1 magas mRNS és fehérje expressziója alapján jelentősen eltér az alacsony expressziót mutató endometrium hyperplasiától és az endometrioid carcinomától. Ez egyben a hyperplasia-endometrioid carcinoma pathogenesis különbözőségét mutatja a seropapilláris carcinoma eltérő kialakulásától és az endometriális carcinogenesis duális szemléletét támogatja (Lax,1997; Sherman,1995). Ez tükrözheti az eltérő celluláris eredetet és az eltérő jelátviteli útvonalak érintettségét, mely a sejtadhéziós és inváziós különbségeket is magyarázhatják. A claudin-1-et túltermelő tumorok agresszívabb klinikai viselkedése a terápiás megközelítések változását is maga után vonhatja, prediktív értékű lehet. A s*eropapilláris* és *endometrioid* típusú *endometrium carcinomák* között tehát szignifikáns különbséget detektáltunk a claudin-1 és -2 expresszióban mind immunhisztokémiai, mind mRNS szinten. A claudin-1 szignifikánsan magasabb volt a seropapilláris endometrium adenocarcinomában, mint az endometrioidban. A claudin-2 szintén szignifikáns, de fordított különbségeket mutatott. Ez tükrözheti az eltérő celluláris eredetet és az eltérő jelátviteli útvonalak érintettségét, mely a sejtadhéziós és inváziós különbségeket is magyarázhatják.

V.3. MikroRNS expressziós mintázat vizsgálata és prediktív jelentősége humán májdaganatokban és HCV hepatitisben

A modern terápiás lehetőségek dacára a HCC a mai napig onkológiailag rosszul kezelhető, rossz prognózissal bíró betegség. A sorafenib (NexavarR, Bayer-Schering Pharma) - az első

bizonyítottan szignifikáns túlélésbeli javulást hozó célzott terápia - mérföldkőnek tekinthető a betegség kezelésében. A sorafenib egy multi kináz gátló gyógyszer, mely mind a proliferációt, mind pedig az angiogén jelátviteli útvonalakat befolyásolja, többek között a Raf/MEK/ERK jelátvitelt, a vascular endothelial growth factor receptor-2-t és -3-t (VEGFR-2,-3), valamint a platelet-derived growth factor receptor-β-t (PDGFR-β)(Wilhelm,2004). A sorafenib szignifikánsan megnöveli a teljes túlélést, azonban csak korlátozott klinikai hatékonysággal bír, jórészt a betegek heterogenitásának és a biomarker hiányának köszönhetően (Lachenmayer,2010). Ezért a sorafenib kezelt betegek esetében a kezelés kimentelének előrejelzése olyan igény a klinikum részéről, mely még nem került megoldásra, ugyanis nincs egyetértés a lehetséges klinikai vagy molekuláris markerek használhatóságát illetően (Baek,2011). A mikroRNS-ek a génexpresszió olyan epigenetikai szabályozói, melyek az onkogén és a tumor szupresszor géneket egyaránt befolyásolhatják, így a cacinogenesisben fontos szerepet tölthetnek be. Ezen túlmenően a mikroRNS expresszió eltérései, ezáltal a génexpressziós mintázat megváltozása prognosztikus és prediktív jelentőséggel is bírhat. Ez általában véve igaz a malignus daganatokra, így a HCC-re is. A mikroRNS-ek stabilitása és kis méretük, valamint megőrzöttségük folytán az archív, FFPE mintákból való vizsgálhatóságuk jó. Ezáltal a mikroRNS-ek ideális biomarkerek lehetnek és segíthetnek a diagnózis, a prognózis és a terápiás válaszérzékenység pontosításában, meghatározásában (Giordano,2013). A mikroRNS vizsgálatokra a kis mennyiségű RNS szükséglet miatt kis méretű minták, akár FNAB minták is alkalmasak lehetnek, melyet több aspirációs biopsziás anyagon végzett tanulmány is megerősített, így a pajzsmirigyből (Kitano,2012), pancreasból (Ali,2012) és tüdőből (Petriella,2013). Ezen irodalmi adatok alapján HCC-ken munkacsoportunk végezte először az FNAB minták mikroRNS profiljának elemzését azzal a céllal, hogy előrehaladott májrákban vizsgáljuk a mikroRNS-ek prrediktív jelentőségét. A vizsgált betegek a sorafenib kezelés előtt nem részesültek sem sebészi, sem pedig loco-regionális vagy szisztémás kezelésben, ezért várhatóan a mikroRNS mintázat a tumorok eredeti molekuláris hátterét tükrözi. Eredményeink alapján egyes klinikopathologiai paraméterek és a mikroRNS expresszió között találtunk összefüggést. A magas miR-214 expresszió kisebb tumor mérettel asszociálódott, mely illeszkedik az irodalmi háttérhez, mivel a miR-214 ismert tumor szupresszor mikroRNS, mely a HCC sejtek növekedését *in vitro* gátolja (Wang,2012). A miR-224 kivételével a többi vizsgált mikroRNS és a predikció között nem találtunk összefüggést. Korábbi *in vitro* vizsgálatok felvetették, hogy egyes mikroRNS-ek érzékenyítik a HCC sejteket sorafenib kezelésre: a miR-122 expresszió helyreállítása a HCC sejtekben jelentősen csökkentette a tumorsejtek klonogén túlélését és növekedését a sorafenib kezelés alatt (Bai,2009). A miR-34a igazoltan erősíti a sorafenib indukálta toxicitást és az apoptosist (Yang,2013). Az általunk vizsgált esetek közül egyik mikroRNS sem mutatott összefüggést a betegek túlélésével. Érdekes módon a kezelés előtti miR-

224 expresszió a sorafenib kezelés alatti OS-el és a PFS-el asszociálódik. A miR-224 gyakran túltermelődést mutat HCC-ben, ezért májrákban onko-miR-ként tartják számon, mely a sejtosztódást, migrációt, inváziót és apoptózist egyaránt befolyásolhatja (Zhang,2013). A miR-224 túltermelődése és ennek a betegek rossz prognózisával történt asszociációja ismert a méhnyakrák esetében (Shen,2013) és leírták glioma betegekben is (Lu,2013). HCC betegekben a miR-224 expresszió nem korrelált a túléléssel, de ha a miR-224 túltermelődését és egyidejűleg a SMAD4 csökkent expresszióját is számításba vesszük, akkor ezen HCC betegek rövidebb várható túléléssel rendelkeznek (Wang,2013). Bár ez a megfigyelés munkacsoportunk eredményével látszólag ellentmondásban van, egyben jelentheti azt is, hogy a magas miR-224 szinttel rendelkező betegek jobban reagálnak a sorafenib kezelésre és így a kezelés hatására jobb a várható prognózis. Hasonló jelenséget találtak colon carcinoma sejtekben, ahol a miR-224 expresszió jelenléte érzékenyíti a tumorsejteket methotrexate kezelésre (Mencia,2011). HCC sejtvonalakban pedig a celastrol kezelés metasztázis képződést gátló hatását a miR-224 termelődés csökkentésén keresztül éri el (Li,2013). Érdekes módon a miR-224-nek kettős szerepet tulajdonítanak a sejtciklus szabályozásában, mind a sejtosztódást, mind pedig az apoptosist serkentő hatással (Wang,2008; Zhang,2013). Ezáltal míg egyfelől a magas miR-224 szint a tumor progressziót támogatja, serkenti, addig másfelől a HCC sejteket érzékennyé teheti a (drog-indukálta) apoptosisra. A miR-224 több lehetséges célpontja között van a többek között a PDGFR-α és PDGFR-β (Dweep,2011; Murakami,2006). Mindkét molekula expresszálódását a rossz prognózis (Chen,2011), illetve a rezekált HCC betegeknél a rövidebb teljes túlélés prediktorának tekintik (Patel,2011). Ezen túlmenően, a PDGFR-β a sorafenib kezelés egyi ismert célpontja (Wilhelm,2004)(). Érdekes módon, egy korábbi tanulmány azt találta - mely a mi vizsgálatunkhoz hasonló vizsgálati metodikát és tervet alkalmazott -, hogy a sorafenib kezelt HCC betegeknél az alacsony PDGFR-β expresszió hosszabb teljes túlélési idővel asszociálódott (Chu,2013). Ez összhangban van a saját eredményeinkkel, melyek szerint a miR-224-et magasan expresszáló (ez az irodalmi adatok szerint a PDGFR-β expresszió lehetséges negatív szabályozója) betegeknél szignifikánsan hosszabb teljes túlélési időt találtunk. A saját vizsgálataink eredményének interpretálásában kellő visszafogottság szükségeltetik, mivel relatív kicsi a bevont betegek száma és hiányoznak a nem tumoros kontroll esetek, valamint nehézséget jelent az elemzés retrospektív volta. Nagyobb bevont cohortokra és prospektív vizsgálatokra lenne szükség, hogy validálni lehessen ezen legfrissebb eredményeinket. Saját vizsgálataink szerint a mikroRNS-ek biomarkerként és a terápiára adott klinikai válasz prediktoraként egyaránt felhasználhatóak.

A miR-ek kóros expressziója a carcinogenesis folyamatának része. Egyfelől a csökkent miR szintek onkogének megnövekedett expresszióját eredményezhetik, melyek a sejtproliferációt és a tumor növekedését támogatják, másfelől viszont a megnövekedett miR termelődés bizonyos

sejtciklust gátló tumor szupresszor gének termelődését gátolhatják (Shenouda,2009). A megváltozott miR expressziós mintázatnak diagnosztikus és prognosztikus jelentősége is lehet (Rong,2013). A HB fetális és embryonális/fetális altípusaiban (Adesina,2009; Chopra,2010; Lopez-Terrada,2009), valamint a hepatoblastomában a tumor kialakulásával kapcsolatos gének megváltozott expresszióját több irodalmi adat támasztja alá (Cairo,2010; Magrelli,2009; von Frowein,2011). Ennek ellenére vizsgálatunk előtt a miR-ek fetális és embryonális komponenseinek összehasonlító miR expressziós analízisét még nem közölték. A HB-t sokszor a HCC-hez hasonlítják, mely tumor jóval gyakrabb és molekuláris szinten is több információ áll rendelkezésre. Azonban a HB valószínűleg embryonális máj progenitor sejtekből alakul ki és más májbetegségek, így a vírushepatitisek sem állnak összefüggésben kialakulásával (Cairo,2010). A HCC-ben gyakran megváltozott expressziót mutató 15 vizsgált miR (Karakatsanis,2013; Pineau,2010; Varnholt,2008) közül a miR-17-5p, a miR-122, a miR-195, a miR-210 és a miR-214 alacsonyabb, míg a miR-221 a normál májhoz képest magasabb expressziót mutatott HB-ban. A legtöbb expressziós változás a fetális komponensben történt, míg az embryonális komponensben a miR-122 csökkent termelődése volt megfigyelhető. A megfigyelt változások több ponton hasonlóan bizonyultak a HCC-ben tapasztalt miR expressziós eltérésekhez. A miR-122 csökkent expressziója gyakori HCC-ben, mely folyamat korrelál a tumorsejtek migrációjával, inváziójával és *in vivo* a tumorigenezissel, míg a miR-122 expressziót megtartó HCC sejtek epitheliális fenotípust mutatnak (Boutz,2011; Karakatsanis,2013; Scisciani,2012). A miR-122 tehát a hepatocyták differenciációs markerének is tekinthető (Cairo,2010) és a teljes mikroRNS mennyiség mintegy 70 %-át adja a májsejtekben. Az alacsony miR-122 szint egyben a HB-ban az embryonális komponens alacsonyabb szintű differenciációját tükrözheti. Másfelől a csökkent miR-122 expresszió májsejtkárosodást is jelenthet, mivel ez a mikroRNS a hepatocyták normál működéséhez nélkülözhetetlen és pozitívan szabályozza a koleszterin, triglicerid és zsírsav metabolizmust (Hu,2012). A miR-195 a sejtciklus szabályozásával, a G1/S átmenet gátlásával a HCC sejtek tumorigén tulajdonságát csökkenti (Xu,2009), míg a miR-221 az irodalmi adatok szerint a HCC-ben túltermelődést mutat és részt vesz a hepatocarcinogenesisben (Karakatsanis,2013; Pineau,2010). Magrelli és munkatársai a miR-214 megnövekedett expresszióját találták HB-ban a környező tumormentes májszövethez képest, mely korrelált a PTEN fehérje expresszió csökkenésével (Magrelli,2009). Saját vizsgálatunkban ugyanakkor a miR-214 csökkent expresszióját detektáltuk HB-ban. A HCC-ben szintén leírták a miR-214 csökkent termelődését, mely a tumorsejt proliferációt és tumorprogressziót támogatja (Wu,2013). A részben eltérő saját eredményünk lehet a tumortípusok közötti funkcionális különbségek eredménye, illetve a mintaszám miatt is adódhat eltérés. Mivel az Európában használatos SIOPEL protokoll a preoperatív kemoterápián alapszik és nem kötelező a preoperatív biopszia, ezért a tumor rezekciós minták csak kemoterápiás kezelést követően vizsgálhatóak. Így a

kezelés előtti miR szintek tumorbiológiai szerepe nem megítélhető, de lehet következtetéseket levonni a kemoterápián átesett betegekben a miR expressziós mintázat prediktív erejéről. A magas miR-21, alacsony miR-222 és miR-224 szintek szignifikánsan hosszabb teljes túléléssel társultak. Az alacsony miR-222 és miR-224 expresszió hosszabb túléléssel való kapcsolatát az irodalmi adatok is támogatják, mivel ezek az onko-miR-ek a sejtproliferációt és a HCC sejtek migrációját, inváziójét támogatják az AKT jelátviteli útvonal támogatásával, másfelől ezen miR-ek magas expressziója rossz prognózissal társult (Garofalo,2012; Lu,2013; Ma,2012; Scisciani,2012; Shen,2013; Wong,2010). Az általunk talált magas miR-21 expresszió és a jobb teljes túlélés közötti kapcsolatot tovább kell vizsgálni, mivel ezt a miR-t onko-miR-ként ismeri az irodalom, mely a PTEN szabályozásán keresztül a sejtek migrációját, inváziójét segíti elő (Bao,2013; Karakatsanis,2013; Zhu,2012). Ez ellen szól az általunk észlelt jelenségnek, melynek lehet magyarázata a tumor ritka előfordulása és a szigorú mintabevonási kritériumok miatti relatív kicsi mintaszám. Összességében tehát miR-18a megnövekedett expresszióját találtuk az embryonális komponensben a fetális komponenshez képest, míg a miR-17-5p, miR-122, miR-195, miR- 210 és a miR-214 alacsonyabb, ám a miR-221 magasabb expresszióját detektáluk a HB mintákban a környező májhoz képest. A magas miR-21 és alacsony miR-222 és miR-224 szintek szignifikánsan megnövekedett teljes túléléssel társultak a SIOPEL protokoll szerint kezelt HB betegekben. Mindezek alapján a mikroRNS expresszió profil a hepatoblastomában diagnosztikus és prediktív értékkel bírhat.

A *hepatitis C vírus (*HCV) fertőzés világszerte jelentős egészségügyi problémát jelent, mintegy 170 millió ember HCV fertőzött (Czepiel,2008). A cirrhosis mellett a máj steatosisa is gyakran megfigyelhető a CHC-ben, a vírus genotípusától függően a betegek 40%-86%-ában (Giannini,1999; Hwang,2011; Jarmay,2005; Khan,2010). *In vitro*, Huh7 sejtekben a HCV 3a genotípusának virális core fehérjéje következtében jön létre a májsejtek legnagyobb mértékű triglycerid felhalmozódása (Abid,2005; Hourioux,2007). A steatosis előfordulása kétszerese a HCV-fertőzött betegekben a hepatitis B vírus-fertőzött betegekhez képest, mely aláhúzza a CHC és a nem-alkoholos májbetegség (nonalcoholic fatty liver disease: NAFLD) közti kapcsolatot (Felmlee,2013). A máj zsíros degenerációja, a steatosis akkor jön létre, amikor a zsírsavak melyek vagy a májban szintetizálódnak *de novo* vagy oda szállíttatnak olyan mennyiségben vannak jelen, melyek meghaladják a máj β-oxidáción keresztüli metabolizáló kapacitását vagy a very-low-density lipoprotein (VLDL) által történő szekréciós kapacitását. Mindez a felborult egyensúly dominálóan triglycerid és koleszterin észter tartalmú lipid cseppek felhalmozódásához vezet, mely folyamat dominálóan a hepatocytákat érinti (El-Zayadi,2008). A nem-alkoholos májbetegségben a steatosis kialakulása obesitással vagy anyagcsere betegségekkel - mint a hyperlipidemia, inzulin rezisztencia

vagy diabetes - van összefüggésben (Krawczyk,2010; Rosmorduc,2012). A steatosis általában emelkedett alanin aminotranszferáz (ALT) májenzim szintekkel jár (Jarmay,2005). A HCV fertőzés során a steatosis pathogenezisében a metabolikus és virális tényezők egyaránt szerepet játszhatnak (Barba,1997; El-Zayadi,2008; Felmlee,2013; Monto,2002; Ratziu,2004). A zsírok azonban szükségesek magának a vírusnak a proliferáció során történő összeszerelődéséhez (Bassendine,2013). Ráadásul a HCV vírusok trigliceridekkel, koleszterinnel és több apolipoproteinnel asszociáltak, ezáltal VLDL-hez hasonlóak, mely segíti a vírusnak immunrendszer által való felismerésének elkerülésében (Bassendine,2013). Ezen kívűl egyes HCV fehérjék (core, NS2 és NS4B) a lipidfelhalmozódásért felelős gének transzkripciós aktiválását növelik, így az SREBP gének és a PPAR-α,γ esetében. Másfelől a miR-33a aktiválódása gátolja az inzulin mediálta jelátvitelt, csökkenti a sejtek β-oxidációját és a sejtosztódást, mely a CDK6 és a cyclinD1 gátlásán keresztül valósul meg és a sejtek G1 fázisban történő blokkját eredményezi (Cirera-Salinas,2012). A miR-33a gátlása ezért felmerült a metabolikus szindróma és a NAFLD kezelésének lehetséges jövőbeni terápiás entitásaként (Davalos,2011). Eredményeink a miR-33a emelkedett szintjét mutatták steatosist mutató krónikus HCV hepatitisben a steatosist nem mutató HCV hepatitis esetekhez képest. Hasonlóan emelkedett miR-33a szinteket észleltünk a normál májhoz képest akár a HCV asszociált, akár a metabolikus eredetű steatosisban, mely jelenséget az irodalmi adatok is megerősítik. Az az eredmény, hogy a metabolikus és a HCV hepatitis eredetű steatosis között nem találtunk különbséget a miR-33a szintjében érdekes eredmény és arra utal, hogy a steatosis jelensége az, ami ezzel a jelenséggel alapvetően asszociált és nem maga a vírusfertőzés. A miR-33a szintje egyik csoportban sem korrelált a steatosis morfológiai alapon történő stádiumbeosztásával, a zsíros degeneráció mértékével. A miR-122 expressziója nem mutatott különbséget a steatosis csoportok és a krónikus HCV hepatitis csoport között, de a HCV asszociált steatosisban a normál májhoz képest csökkent termelődés volt kimutatható. A miR-33a-hoz hasonlóan a miR-122 szabályozó szerepe szintén kiterjed a zsír metabolizmusra. A miR-122 csendesítése ugyanis csökkenti a koleszterin, VLDL és HDL szinteket és a májban a zsírfelhalmozódást. Ugyanakkor a jelenségért felelős célpont gének még nem kerültek azonosításra (Hu,2012). A zsírmetabolizmus tükrében a miR-122 csökkent szintje esetünkben ellentmondásos, de mivel ez a májspecifikusnak mondott miR adja a májsejtek miR készletének 70%-t, a normál májsejtekben (Lagos-Quintana,2002) és májsejtkárosodás esetén a miR-122 szint csökken (Ding,2012). Így a miR-122 expresszió NAFLD-ben (Kerr,2011; Lakner,2011), HCV fertőzés esetén (Marquez,2010) és HCC-ben is csökkenést mutat (Hu,2012). A vizsgálatunkban talált csökkent miR-122 expresszió ezért inkább a májkárosodásnak tulajdonítható. A HCV fertőzés során kimutatták, hogy a miR-122 a HCV RNS 5’ UTR régiójának két helyéhez kötődik, mely segíti a vírus replikációt és *in vitro* serkenti a transzlációt *(Shimakami,2012). In vivo* azonban a miR-122 5’ UTR-hoz kapcsolódásának

valószínűsíthető szerepe inkább a HCV RNS védelme az exonukelázok általi lebontás ellen, mivel *in vivo* nem találtak összefüggést a miR-122 expresszió és az intrahepatikus vagy szérum vírusszám között (Sarasin-Filipowicz,2010). Vizsgálatunkban steatosistól függetlenül sem találtunk emelkedett miR-122 szinteket a krónikus HCV hepatitisben. A HCV asszociált steatosisban talált csökkent miR-122 expresszió egy rákmegelőző állapotot tükrözhet, mivel a miR-122 csökkent szintjét gyakran észlelték HCC-ben és a migrációval, a sejtek inváziójával és az *in vivo* tumorigenezissel kapcsolatban (Scisciani,2012). A miR-21, miR-221 és miR-224 hepatocarcinogenesissel asszociált fokozatos expressziós emelkedését leírták a normál máj, cirhosis, HCC szekvencia során (Pineau,2010). Ezt a kérdést vizsgálva eltérő eredményeket kaptunk vizsgálatunkban: amíg a miR-224 emelkedett expressziót mutatott, addig a miR-221 esetében csökkent termelődést találtunk és a miR-21 expresszió nem mutatott változást. A miR-224-et az irodalom onko-miR-ként tartja számon, mely a HCC esetében az AKT jelátvitel aktiválásával serkenti a proliferációt, a migrációt és az inváziót, ezáltal szerepet játszik a májcarcinogenesisben és a májrák progressziójában (Ma,2012). Ennélfogva a steatosis nélküli krónikus hepatitis C csoporthoz és a normál máj csoporthoz viszonyítva a HCV asszociált és metabolikus steatosisban talált emelkedett miR-224 szintek azt jelezhetik, hogy ezekben a betegségcsoportokban a steatosis a rákmegelőző állapothoz hasonló. Felvetették, hogy a normál miR expressziós mintázat megváltozása hosszú idővel a konkrét daganatos betegség kialakulása előtt már detektálható (Ciesla,2011). A miR-221, melyet szintén onko-miR-nek tartanak és expressziója hasonlóan emelkedettnek mutatkozott HCC-ben és a HCC pathogenezisében szerepet játszó cirrhosisban, krónikus hepatitis C-ben és nem-alkoholos steatohepatitis egérmodelljében is emelkedett volt (Karakatsanis,2013). A miR-221 célpontjai főképp tumor szupresszor gének, melyek a sejtciklust gátolják. Az emelkedett miR-224 szintekkel ellentétben a csökkent miR-221 expresszió arra utal, hogy az általunk vizsgált betegségcsoportokban, így a krónikus C vírus hepatitisben és a NAFLD-ben a miR-221 expresszió nem érintett. Az onko-miR-nek tartott miR-21-et összefüggésbe hozták a sejtproliferációval, migrációval és a tumorsejtek inváziójával és magával a tumornövekedéssel, melyet az epitheliális-mesenchymális átmenet AKT/ERK jelátviteli útvonal befolyásolásával fejt ki [45]. A miR-21 gyakran felülexpresszált a tumorokban, így a HCC-ben is (Karakatsanis,2013), de sejtosztódással járó fiziológiás folyamatokban is emelkedett szintet mutathat, így a májregenerációban is (Marquez,2010). A miR-21 fokozott termelődését magas zsírtartalmú étrenden tartott patkányok májában, valamint elhízott betegek májbiopsziáiban is kimutatták. Leírták, hogy a telítetlen zsírsavak okozhatják a miR-21 szint emelkedését, mely végül a PTEN csökkent expressziójához, és végső soron a steatosis kialakulásához vezet (Vinciguerra,2009). Ezzel ellentétben eredményeink nem mutatták a miR-21 szint emelkedését a vizsgált steatosis és krónikus hepatitis mintacsoportokban. Az egyes betegekben tapasztalható miR-21 expressziós szintek

variabilitását leírták krónikus hepatitisben C-ben szenvedő betegekben (Marquez,2010) és egyes vizsgálatokban a miR-21 csökkent termelődését is észlelték mind a zsíros degenerációt mutató májsejtekben, mind pedig elhízott egerek májában (Li,2009; Zheng,2010). Eredményeink érdekes módon negatív korrelációt tártak fel a miR-33a expresszió és a szérum AST, AP májenzim szintek és a gyulladás között. Hasonlóan negatív korreláció mutatkozott a miR-21 expresszió és a klinikai laborvizsgálatok által mért triglicerid szintek között. Ez arra utal, hogy a zsír metabolizmust erősen befolyásolja a nekroinflammáció mértéke a krónikus hepatitisben és a steatosisban szenvedő betegekben, valószínűleg a károsodott májsejtekből a szérumba kiáramló miR-33a által. Ezen túlmenően a magas zsírszint a miR-21 által szabályozott sejtproliferációt is befolyásolhatja, mely ezáltal érinti ezen betegekben a májregenerációs folyamatokat. A steatosist mutató betegekben a nekroinflammáció mértéke korrelált a mért miR-21 szintekkel és így a májsejtproliferáció stimulálásában részt vehetett. Ezt a gondolatot támogatja, hogy az irodalom szerint az AST szintek korrelálnak CCl4 okozta májkárosodás indukálta egérmodellben a fibrosissal (Marquez,2010). Összességében a miR-21 kivételével a vizsgált miR-ek kóros expresszióját észleltük a krónikus C vírus hepatitisben és a HCV fertőzéssel vagy metabolikus eltérésekkel asszociált steatosisban. A steatosisban a normál májhoz vagy a krónikus HCV hepatitishez képest emelkedett miR-33a és miR-224 szinteket detektáltunk. Ezzel ellentétben a csökkent miR-221 expresszió etiológiától függetlennek bizonyult.

A HCV rekurrencia jelentős mértékben hozzájárul a májtranszplantáltak túlélési idejének megkevesbedéséhez (Nemes,2007). A HCV progressziója a transzplantáció után fel is gyorsulhat a betegek immunszupresszió miatt (Berenguer,2001). A jelenleg még protokoll szerint alkalmazott IFN/RBV kezelés a betegek mintegy 50%-át tudja hatékonyan meggyógyítani a jellemző 1-es genotípusban (Norman,2010). A HCV rekurrenciája májtranszplantált betegekben egy egyedülálló vizsgálati lehetőség a HCV reinfekció tanulmányozására és összehasonlítására a donor máj vírusmentes állapotával, majd ezt követően a vírusellenes terápia követésére nyílik mód. Vizsgálatunkban elsőként tanulmányoztuk a HCV receptorokat potenciálisan szabályozó miR-ek expresszióját HCV indukálta májelégtelenség indikálta májtranszplantációban. A HCV receptorok expresszióját poszt-transzkripcionálisan befolyásoló miR-eket *in silico* célpont keresés alapján választottuk ki. A vírus partikulumok a sejtfelszín fehérjéihez, így az alacsony denzitású lipoprotein receptorokhoz és glycosaminoglicánokhoz történő nem specifikus kapcsolódása után egy olyan komplexhez kapcsolódnak, melyeket a SCARB-1 és CD81 képez. A CD81-hez kapcsolódott vírus ezután a TJ pontokhoz jut, ahol a HCV a claudin-1-el és az occludinnal kerül kapcsolatba, hogy be tudjon lépni a sejtbe (Mensa,2011). A CLDN-1 és az OCLN fehérjék a normál májhoz képest fokozott expressziót mutatnak a HCV fertőzött májban (Nakamuta,2011; Reynolds,2008) és az OLT-ot követően is a HCV rekurrenciakor (Mensa,2011). Ugyanakkor nem találtak korrelációt

ezen vírus receptor TJ fehérjék mRNS és fehérje expressziója között (Mensa,2011). Ezt erősítették Nakamuta és munkatársainak eredményei, miszerint eltérő CLDN-1 és OCLN mRNS és fehérje expressziós szinteket detektáltak HCV fertőzött májakban (Nakamuta,2011). Ezek alapján a CLDN-1 és az occludin expressziójára a HCV fertőzés jelenléte jelentős poszt-transzkricpcionális befolyást gyakorolhat. A miR-ek kóros expressziós mintázatát számos humán betegségben leírták már, így különböző daganatokban, metabolikus és fertőző betegségekben, krónikus gyulladásos és autoimmun megbetegedésekben (Dai,2011; Shenouda,2009). A HCV fertőzéssel kapcsolatban fontos információ, hogy a májspecifikusnak mondott miR-122 a vírus *5′ UTR* régiójához kötődve a HCV vírusreplikációt serkentette humán hepatoma sejtvonalakban, majd *in vitro* a miR-122 antiszenz oligonukelotidok általi lebontása csökkentette a vírus replikációt és a transzlációt is (Chang,2008; Henke,2008; Jopling,2008; Norman,2010; Randall,2007), *in vivo* állatkísérletben is (Buhler,2012; Wang,2012). Mindezek ellenére korreláció nem (Sarasin-Filipowicz,2009) vagy csak nagyon gyenge mértékben (Morita,2011) mutatkozott a májbeli miR-122 szintek és a szérum vírusszám között és a májbeli miR-122 szint és a májban mért vírusszám között egyáltalán nem találtak összefüggést (Morita,2011; Sarasin-Filipowicz,2009). Sőt, humán hepatoma sejtvonalakban a miR-122 szintet csökkentnek találták a HCV fertőzést követő 4. napon (Liu,2010) és az IFN-β csökkentette a miR-122 expresszióját (Pedersen,2007). Ez arra utal, hogy a miR-122 expressziót a HCV fertőzés és az interferon kezelés egyaránt befolyásolhatja. Saját vizsgálatunk eredménye szerint a magasabb májbeli miR-122 szint magasabb szérum vírusszámmal asszociálódott, de nem találtunk szignifikáns különbséget a miR-122 expresszióban a vírus rekurrenciakor a normál májhoz képest. Ugyanebben az összehasonlításban azonban a vírus rekurrenciakor alacsonyabb miR-21 és miR-194 szinteket mértünk, míg a miR-99a* és miR-224 szintek szignifikáns emelkedést mutattak a HCV fertőzés reaktiválódásakor. A miR-21-t és a miR-194-t leírták, mint a *CLDN-1* mRNS expresszió szabályozóit, míg a miR-99a* a S*CARB-1* expressziót befolyásolhatja, a miR-224 pedig az *OCLN* mRNS expresszió módosításában vehet részt. Az *in silico* szekvencia összehasonlítás is arra utal, hogy a miR-194 az *OCLN és a CD81* mRNS-ekhez kötődhet. Ennélfogva az irodalmi eredmények szerint megfigyelt CLDN-1 és occludin expressziós emelkedést (Nakamuta,2011; Reynolds,2008) okozhatja a HCV fertőzés során a miR-194 és miR-21 expresszió csökkenése. Ez a vizsgált miR-eknek egy *in vivo* szabályozó funkcióját jelentheti, mellyel a HCV receptorok expressziójának poszt-transzkripcionális szabályozását valósítják meg. A normál májban a miR-194 magas expressziós szintje ismert jelenség (Meng,2010). A miR-194 szerepet játszik a fibrogenesis során a májbeli Ito sejtek szabályozásában (Venugopal,2010) és gátolja az N-cadherin expressziót, mellyel a HCC sejtek migrációját, adhézióját és a metastasis képzését gátolja (Meng,2010). A miR-21-t korábban “onko-miR”-ként azonosították, mivel aberráns expresszióját észlelték számos daganatban, így emlőrákban, vastagbélrákban és HCC-ben is (Jazbutyte,2010). Érdekes módon a

saját vizsgálatunk a miR-21 csökkent expresszióját tárta fel a HCV rekurrenciakor. Ugyanakkor más, általunk észlelt expressziós változást, így a miR-224 vírus rekurrenciakor mért emelkedett expresszióját HCV fertőzés talaján létrejött HCC-ben is kimutatták (Wang,2011). A miR-224 emelkedett expresszióját HCC sejtvonalakban és hepatocelluláris carcinomában is leírták. A közelmúltban Scisciani és munkatársai kimutatták, hogy lipopolysacharidok, a lymphotoxin-α, és a tumor necrosis factor-α gyulladáshoz kapcsolt jelátviteli utak aktiválták a miR-224 expresszióját. A vizsgálat azt is kimutatta, hogy a *p65/NFκB* a miR-224 expresszió direkt transzkripciós regulátora (Scisciani,2012). Saját eredményünkkel, mely a miR-224 emelkedett expressziós szintjét mutatta a HCV rekurrenciakor, egybevág Scisciani és munkatársainak megfigyelése (Scisciani,2012). miszerint az NFκB-függő gyulladásos jelátviteli útvonal az egyik kulcsszereplője a HCV fertőzésnek (Tardif,2005). Az IFN/RBV kezelést követően a kezelés előtti expressziós szintekhez képest a miR-221, miR-224, és a miR-217 emelkedett expresszióját figyelték meg és a miR-224 fel tudta ismerni az occludin mRNS-t, mint célpontot. A miR-221expresszió kóros eltérést mutat HCC-ben (Pineau,2010) és arra utalnak közlemények, hogy expresszióját befolyásolhatja mind a HCV, mind pedig az IFN kezelés. Liu és munkatársai kimutatták, hogy a HCV fertőzés során a miR-221 csökkent expressziót mutat és *in vitro* HCV fertőzés dinamikus modelljében a miR-221 emelte a HCV RNS mennyiségét (Liu,2010) Zhang és munkatársai glioblastoma sejtekben a miR-221 és miR-222 kiütésével kimutatták, hogy az IFN-α jelátviteli útvonal volt a leginkább érintett (Zhang,2010). Saját vizsgálatunkban azt találtuk, hogy a miR-221 expressziós szintje negatív korrelációt mutatott a gyulladás hisztológiai aktivitás index-el (HAI). Korábban leírták, hogy a miR-217 expresszió predikálhatja a terápia sikerességét krónikus HCV fertőzött betegekben (Estrabaud,2011) és kapcsolatban van a tumor differenciációval (Schickel,2008). Vizsgálatukban az IFN/RBV kezelés előtti szintekhez képest jelentős eltéréseket találtunk az SVR betegcsoport mikroRNS expressziós profiljában, míg a non-responder csoportban nem változott az expressziós mintázat. A részleges terápiás választ adó betegcsoportban mindössze három beteg volt, ezért ezen betegek statisztikai kiértékelését összevontuk a non-responder betegekkel. Bár nemrég került leírásra, hogy a májbeli miR expresszió kapcsolatban lehet a kezelésre adott válasszal (Murakami,2010); azonban saját vizsgálatunkban a kezelés előtti miR expressziós mintázatnak, beleértve a miR-122 szintjét is, nem volt prediktív értéke az IFN/RBV kezelés sikerességének kimenetelére. Sarasin-Filipowicz és munkatársainak korábbi közlése szerint az interferon terápiára virológiai választ nem adó betegekben szignifikánsan csökkent a kezelés előtti miR-122 szinteket mérteke (Sarasin-Filipowicz,2009). Estrabaud és munkatársai a miR-99a*, miR-181a-2*, miR-23a, és miR-217 kóros expresszióját találták a kezelésre nem reagáló betegekben a később SVR-t mutató betegekhez képest. Ezzel ellentétben saját vizsgálatunk a nem reagáló betegekhez képest a miR-96, miR-99a*, miR-122, miR-181a-2*, miR-217, és a miR-221 emelkedett expressziós szintjét

találta az IFN/RBV kezelésre SVR-t mutató betegcsoportban. A vírusellenes kezelést követően a miR-221 és a miR-122 expressziós szintek magasabbak voltak az SVR-ben, mint a kezelés előtt. Ez arra utal, hogy a vírusellenes terápia helyreállította a miR-122 expressziót az SVR-t mutató betegekben. A miR-122-t a hepatocyta differenciáció és a homeostasis markerének tartják (Coulouarn,2009). Mivel a miR-221 az irodalom szerint HCC-ben onko-miR-ként viselkedik és a miR-122 szükséges a HCV replikációjához, ezért eredményeink is a miR-ek komplex szabályozó funkciójára utalnak és az egyszerű, mechanisztikus magyarázatok elégtelenségére hívják fel a figyelmet. Nem volt különbség a terápiára adott válaszban vagy a mikroRNS expresszióban abban tekintetben, hogy a betegek tacrolimus vagy cyclosporin bázisú immunszupresszióban részesültek.

Összességében kimutattuk, hogy a HCV rekurrencia és a vírusellenes terápia jellegzetes változásokat okozott a májbeli miR expressziós mintázatban, belértve azokat is, melyek a HCV receptorok expressziójának lehetséges szabályozói. A *mikroRNS profil változásakor a májtranszplantáció* után bekövetkező *HCV kiújuláskor* szignifikánsan magasabb miR-99a* és miR-224 expressziót, míg csökkent miR-21 és miR-194 termelődést találtunk a normál májszövethez képest. A HCV kiújulást követő egy éven át tartó antivirális terápiát (IFN/RBV) követően a miR expressziós mintázatot összevetve a kezelés előtti, tehát a rekurrenciakor vett biopsziás minták miR profiljával, a kezelés után emelkedett miR-221, miR-224 és miR-217 expressziót találtunk. Amennyiben ezt az összehasonlítást szűkítettük az SVR-t mutató betegekre, akkor az antivirális kezelés előtti profilhoz képest a kezelés után a miR-221 és a miR-122 expresszió szignifikáns növekedést mutatott. **A** HCV rekurrencia során vizsgált miR-ek közül egyik sem bizonyult prediktív értékűnek az antivirális kezelésre adandó klinikai válasz (SVR versus non-responder) tekintetében. Eredményeink szerint a miR-194 és a miR-21 játszhat szerepet a HCV receptorok expressziós szabályozásában a HCV fertőzés és a vírusellenes terápia során.

Összességében a miR-21 kivételével a vizsgált miR-ek kóros expresszióját észleltük a krónikus HCV hepatitisben és a HCV fertőzéssel vagy metabolikus eltérésekkel asszociált steatosisban. A *steatosis* vizsgálata során a mir-221 csökkent szintjét találtuk krónikus hepatitis C-ben (CHC), a HCV pozitív krónikus hepatitis asszociált steatosisban (CHC-Steatosis) és metabolikus erredetű steatosisban (Steatosis). Ugyanakkor a steatosisban a normál májhoz vagy a krónikus HCV hepatitishez képest emelkedett miR-33a és miR-224 szinteket detektáltunk. Emellett a miR-122 csökkent termelődése volt kimutatható a normál májhoz képest a CHC-Steatosis mintákban. Ezzel ellentétben a normál májhoz képest a miR-33a és miR-224 emelkedett expressziója volt azonosítható CHC-Steatosis-ban és a Steatosis mintákban Ezen felül a miR-224 emelkedett expresszióját detektáltuk a Steatosis csoportban a CHC csoporthoz viszonyítva. A mikroRNS expresszió és a steatosis foka között sem találtunk összefüggést, sem CHC-Steatosis sem a Steatosis csoportban. Azonban a krónikus HCV hepatitis a steatosis mellett szintén

hozzájárulhatott ezen miR-ek emelkedett expressziójához a steatosist mutató HCV hepatitis betegekben és ebben a betegcsoportban hasonló együttes hatás érvényesülhetett a miR-122 csökkent expressziójában. Ezzel ellentétben a csökkent miR-221 expresszió etiológiától függetlennek bizonyult. A vizsgált miR-ekben a steatotikus minták között nem mutatkozott különbség abban a tekintetben hogy HCV okozta krónikus hepatitisben vagy metabolikus okok miatt alakult ki a steatosis. Ez arra utal, hogy a steatosis okozta biológiai elváltozások a molekuláris szabályozás, illetve a sejtbiológiai változások terén döntőbbek, mint a krónikus HCV fertőzés maga, de ezen téma feltárása további vizsgálatokat igényel.

A *hepatoblastoma* mintákat szubtípustól függetlenül összehasonlítva a környező májszövetben a miR-17-5p, miR-122, miR-195, miR-210 és miR-214 relatív expressziója szignifikánsan csökkent, míg a miR-221 termelődés növekedett a tumorokban a környező tumormentes májszövethez képest. A fetális komponensben csökkent miR-17-5p, miR-195, miR-210 és miR-214 expressziót, míg emelkedett miR-221 szintet találtunk. A tisztán embryonális és a tisztán fetális csoportok között nem találtunk szignifikáns különbséget sem az eseménymentes túlélésben, sem pedig a teljes túlélésben. Ha a szövettani altípust nem vettük figyelembe, akkor a miR expresszió és a EFS között szintén nem találtunk különbséget. A miR expressziót felosztva a miR-eket magasan (medián felett) és alacsonyan expresszáló (medián alatt) csoportokra, azt mutattuk ki, hogya magas miR-21 és alacsony miR-222 és miR-224 szintek szignifikánsan megnövekedett teljes túléléssel társultak a SIOPEL protokoll szerint kezelt HB betegekben. Mindezek alapján a mikroRNS expresszió profil a hepatoblastomában diagnosztikus és prediktív értékkel bírhat.

A *Sorafenib kezelt HCC* betegek kezelés előtti miR expressziós mintázatának vizsgálatakor kimutattuk, hogy a teljes és a progressziómentes túlélés szignifikánsan hosszabbnak mutatkozott a mir-224-t magasan expresszáló betegek csoportjában, a miR-224-t alacsonyan termelő betegek csoportjához képest, tehát a miR-224 expresszió független prediktív faktornak bizonyult. A többi vizsgált mikroRNS HCC-ben mért, Sorafenib kezelés előtti szintje nem mutatott szignifikáns összefüggést a túléléssel. Eredményeink szerint az általunk kidolgozott eljárás ígéretes olyan mikroRNS-ek felfedezésében is, melyek előre jelezhetik a beteg terápiás érzékenységét. Vizsgálatunk a világon elsőként mutatta be a mikroRNS profilok detektálását és alkalmazhatóságát a HCC betegek sorafenib kezelés előtt vett vékonytű aspirációs mintáin. A kezelés előtti mikroRNS profil, különösen a miR-224 expressziója, a Sorafenib kezelés alatt álló betegekben jó kiegészítő eszköz lehet a túlélés várható hosszának felmérésében.

VI. Új megállapítások

1. A cirrhotikus átalakulás a normál májhoz képest a *claudin-1 és -7 szint emelkedésével* jár mind a tumormentes májban, mind pedig az annak talaján kialakult HCC-ben. A HCV fertőzöttség és a claudin expressziós szint között nem találtunk összefüggést, ugyanakkor a cirrhosisban tapasztalt emelkedett claudin-1 fehérje, mint a HCV egyik sejtfelszíni receptorának fokozott expressziója, elősegítheti a vírus eredményesebb behatolását a májsejtekbe, fokozhatja a reinfekciót és egyben hozzájárulhat a malignus transzformációhoz.

2. Elsőként mutattuk ki, hogy a humán epeútrendszer különböző szakaszaiból származó biliáris epitheliumban és ezen lokalizációjú cholangiocarcinomákban a *claudin-4 erősen expresszálódik*, viszont ezzel ellentétben a hepatocelluláris carcinoma nem mutat claudin-4 expressziót. Ezen eredmények alapján a claudin-4 immunhisztokémiai kimutatása alkalmas új diagnosztikai eszköz lehet a máj primer daganatain belül az epeúti rendszer carcinomáinak és a hepatocelluláris carinomának az elkülönítésére.

3. A HCC-k a cholangiocarcinomákhoz képest alacsonyabb *tricellulin expressziót* mutatnak. Míg a HCC-k esetében a tumorok differenciáltsága nem mutatott összefüggést a túléléssel, ezen daganatok tricellulint magasan expresszáló alcsoportja szignifikánsan rövidebb túlélést mutatott.

4. A colorectális carcinoma, valamint a pancreas ductalis carcinoma májmetasztázisai és a HCC-k jellegzetes és egymástól *eltérő claudin expressziós mintázatot* mutatnak. A csoportokon belül a talált mintázatok és különbségek fehérje és mRNS expressziója lényegében hasonló. A mintázat differenciáldiagnosztikai értékén túl a daganatok hisztogenezisét is tükrözheti. A colorectális carcinoma májmetasztázisai karakterisztikusan eltérő, erős *occludin és ZO-1* fehérje expressziót mutatnak a negatív HCC-hez képest.

5. A *tricellulint a normál exocrin pancreas*, a hepatocyták és az epeúti sejtek termelik, azonban az endocrin pancreas Langerhans szigetének sejtjei nem expresszálják. A pancreas exocrin ductalis adenocarcinomák és a cholangiocarcinomák tricellulin expressziója a daganatok differenciáltságával együtt csökken. A pancreas exocrin ductalis adenocarcinomák és a cholangiocarcinomák esetében a jól differenciált, kiérett daganatokat jellemző magasabb tricellulin expresszió hosszabb teljes túléléssel társul.

6. A *tricellulin eltérő kifejeződését a fetális és embryonális hepatoblastoma altípusban* elsőként mutattuk ki. A hepatoblastomák jobban differenciált fetális komponensében a claudin-1 és

a claudin-2 expressziója mind fehérje, mind pedig mRNS szinten szignifikánsan magasabb, mint a rosszabbul differenciált, magasabb osztódási aktivitással rendelkező embryonális komponensben. A fetális komponensben a tricellulin fehérje expressziója is szignifikánsan magasabb, így a claudin-1 és -2, valamint a tricellulin az epitheliális hepatoblastoma differenciációs markereinek tekinthetőek. Elsőként detektáltuk, hogy a tricellulint magas mértékben termelő hepatoblastoma esetek szignifikánsan jobb teljes túlélést mutatnak az alacsony expresszióval rendelkező tumorokhoz képest, mely megállapításnak így prediktív jelentősége lehet.

7. Az epitheliális hepatoblastomában a szubtípustól függetlenül a magas miR-21 vagy az alacsony miR-222 és miR-224 expresszió a betegek szignifikánsan hosszabb teljes túlélésével asszociált. Elsőként tártuk fel, hogy az EZH2 a hepatoblastoma mindkét epitheliális szubtípusában kifejeződik és az embryonális komponens szignifikánsan magasabb EZH-2 és miR-18a expressziót mutat a fetális szubtípushoz képest, melynek differenciáldiagnosztikai és klinikai onkológiai jelentősége lehet.

8. Az epitheliális hepatoblastomák szövettani altípusaiban jellegzetes, egymástól és a normál májtól is eltérő miR expressziós mintázatot mutattunk ki. A szövettani szubtípusok nem mutattak összefüggést a túléléssel, azonban elsőként tártuk fel, hogy a magas miR-21 és az alacsony miR-222 és miR-224 expresszió a szignifikánsan jobb teljes túlélés epitheliális altípustól független prediktorai.

9. A HCV cirrhosis miatt végzett orthotopikus májtranszplantációt követően a HCV rekurrencia során, majd az ezt követő antivirális kezelést követően is változik a miR expressziós mintázat, beleértve az egyes HCV receptorokat szabályozó mikroRNS-ek expresszióját is. A miR-194-nek és miR-21-nek szerepe lehet a vírusreceptor claudin-1 és occludin génexpressziójának a szabályozásában a kiújuló HCV fertőzés során. A HCV rekurrencia során vizsgált miR-ek közül egyik sem bizonyult prediktív értékűnek az antivirális kezelésre adandó klinikai válasz (SVR versus non-responder) tekintetében, azonban a súlyosabb virémia magasabb hepatikus miR-122 expressziós szinttel asszociált.

10. A krónikus hepatitis C, a krónikus HCV-asszociált steatosis, és a metabolikus eredetű steatosis mikroRNS expressziós mintázata jellegzetes különbségeket mutat és eltér a normál májban találtaktól. A miR-33a és a miR-224 expressziója a steatosissal összefüggésben megemelkedett, míg a miR-122-nek csökkent a szintje a normál májhoz és a steatosis mentes krónikus hepatitis C-hez képest. A miR-221, ezen vizsgált kóros állapotokban, etiológiától független csökkenést mutatott a

normál májhoz képest. A krónikus hepatitis C talaján és egyéb metabolikus okok miatt kialakuló steatosis nem mutatott lényeges eltérést a mikroRNS expresszióban, ami arra utal, hogy a normál májhoz képest talált miR expressziós változások egy, a steatosis miatt alapvetően megváltozott biológiai helyzetet tükröznek.

11. A Sorafenib kezelt HCC-s betegek esetében a kezelés előtt vett tumormintában kimutatott magas miR-224 expresszió szignifikánsan jobb tünetmentes és teljes túléléssel társul, így a kezelés előtt vett tumorminta mikroRNS expressziós profiljának meghatározása a Sorafenib kezelt HCC-s betegek predikcióját javíthatja.

12. Elsőként mutattuk ki, hogy az egyes *tight junction alkotórészek a cervicális hám* különböző rétegeiben jellegzetes expressziós mintázattal bírnak, mely a hámban jelzi a polaritást és az orientációt. A cervix praemalignus elváltozásaiban (CIN I-III) és cervix *in situ* carcinomában (CIS) az egyes claudinok, az occludin és a syndecan-1 expressziója jelentősen növekszik, ezáltal elsőként mutattuk be, hogy a cervicalis laphám praemalignus lézióiban egyes claudin típusok termelődése nem csökken, hanem eltérő mértékben megnövekszik.

13. A seropapilláris endometrium carcinoma magas claudin-1 mRNS és fehérje expressziója alapján jelentősen eltér az alacsony expressziót mutató endometrium hyperplasiától és az endometrioid carcinomától. Ez mutatja a hyperplasia-endometrioid carcinoma pathogenesis különbözőségét a seropapilláris carcinoma eltérő kialakulásától, valamint endometriális carcinogenesis duális szemléletét támogatja.

14. A claudin-4 és Ki-67 fehérje expresszió szignifikánsan magasabb, míg a claudin-7 expresszió szignifikánsan alacsonyabb a high grade húgyhólyag carcinomákban a low grade tumorokhoz viszonyítva. A húgyhólyag Ta-T1-es stádiumú urotheliális carcinomái esetében a magas claudin-7 fehérje expresszió rövidebb kiújulás mentes túléléssel társul.

15. A PUNLMP (Papillary Urinary Neoplasia of Low Malignant Potential) húgyhúlyag tumorok esetében az alacsony claudin-1 fehérje expresszióval rendelkező daganatokat rövidebb kiújulás mentes túlélés jellemzi a magas claudin-1 expresszióval rendelkezőkhöz viszonyítva, míg a húgyhólyag LG-UCC-ben a magas claudin-4 expresszió rövidebb kiújulás mentes túléléssel társul az alacsony claudin-4 expresszióval rendelkező tumorokhoz képest. Az invertált papillomákat jellemző szignifikánsan nagyobb claudin-1 expresszió segíthet ezen pathologiai entitásnak a klasszikus papillomáktól, PUNLMP-ktől és a nem invazív low grade UCC-ktől való elkülönítésében.

VI. A DISSZERTÁCIÓ ANYAGÁT KÉPEZŐ SAJÁT PUBLIKÁCIÓK és SCIENTOMETRIAI ADATOK

VI.1. A dolgozat alapját képező első és utolsó szerzős in extenso eredeti közlemények

1. Gyongyosi B, Vegh E, Jaray B, Szekely E, Fassan M, Bodoky G, Schaff Z, **Kiss A**
Pretreatment Microrna Level and Outcome of sorafenib-Treated Hepatocellular Carcinoma.
JOURNAL OF HISTOCHEMISTRY & CYTOCHEMISTRY **62:**(8) pp. 547-555. (2014)
IF: 2.403

2. Gelley F, Zadori G, Nemes B, Fassan M, Lendvai G, Sarvary E, Doros A, Gerlei Z, Nagy P, Schaff Z, **Kiss A**
MicroRNA profile before and after antiviral therapy in liver transplant recipients for Hepatitis C virus cirrhosis
JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY AND HEPATOLOGY **29:**(1) pp. 121-127. (2014)
Független idéző: 11 Összesen: 11, **IF: 3.627**

3. Gyugos M, Lendvai G, Kenessey I, Schlachter K, Halász J, Nagy P, Garami M, Jakab Z, Schaff Z, **Kiss A**
microRNA expression might predict prognosis of epithelial hepatoblastoma
VIRCHOWS ARCHIV-AN INTERNATIONAL JOURNAL OF PATHOLOGY **464:**(4) pp. 419-427. (2014)
Független idéző: 3 Összesen: 3, **IF: 2.560**

4. Holczbauer A, Gyongyosi B, Lotz G, Torzsok P, Kaposi-Novak P, Szijarto A, Tatrai P, Kupcsulik P, Schaff Z, **Kiss A**
Increased Expression of Claudin-1 and Claudin-7 in Liver Cirrhosis and Hepatocellular Carcinoma.
PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH **20:**(3) pp. 493-502. (2014)
Független idéző: 1 Összesen: 1, **IF: 1.806**

5. Schlachter K, Gyugos M, Halasz J, Lendvai G, Baghy K, Garami M, Gyongyosi B, Schaff Z, **Kiss A**
High Tricellulin Expression Is Associated With Better Survival In Human Hepatoblastoma.
HISTOPATHOLOGY **65:**(5) pp. 631-641. (2014)
IF: 3.301

6. Lendvai G, Jarmay K, Karacsony G, Halasz T, Kovalszky I, Baghy K, Wittmann T, Schaff Z, **Kiss A**
Elevated miR-33a and miR-224 in steatotic chronic hepatitis C liver biopsies.
WORLD JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY **20:**(41) pp. 15343-15350. (2014)
IF: 2.433

7. Somoracz A, Korompay A, Torzsok P, Patonai A, Erdelyi-Belle B, Lotz G, Schaff Z, **Kiss A**
Tricellulin Expression and its Prognostic Significance in Primary Liver Carcinomas.
PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH **20:**(4) pp. 755-764. (2014)
IF: 1.806

8. Holczbauer A, Gyongyosi B, Lotz G, Szijarto A, Kupcsulik P, Schaff Z, **Kiss A**
Distinct claudin expression profiles of hepatocellular carcinoma and metastatic colorectal and pancreatic carcinomas
JOURNAL OF HISTOCHEMISTRY & CYTOCHEMISTRY **61:**(4) pp. 294-305. (2013)
Független idéző: 3 Függő idéző: 1 Összesen: 4, **IF: 2.403**

9. Korompay A, Borka K, Lotz G, Somorácz Á, Törzsök P, Erdélyi-Belle B, Kenessey I, Baranyai Zs, Zsoldos F, Kupcsulik P, Bodoky Gy, Schaff Zs, **Kiss A**
Tricellulin expression in normal and neoplastic human pancreas
HISTOPATHOLOGY **60:**(6B) pp. E76-E86. (2012)
Független idéző: 7 Függő idéző: 4 Összesen: 11, **IF: 2.857**

10. Torzsok P, Riesz P, Kenessey I, Szekely E, Somoracz A, Nyirady P, Romics I, Schaff Z, Lotz G, **Kiss A**
Claudins and ki-67: potential markers to differentiate low- and high-grade transitional cell carcinomas of the urinary bladder
JOURNAL OF HISTOCHEMISTRY & CYTOCHEMISTRY **59:**(11) pp. 1022-1030. (2011)
Független idéző: 3 Függő idéző: 2 Összesen: 5, **IF: 2.725**

11. Székely E, Törzsök P, Riesz P, Korompay A, Fintha A, Székely T, Lotz G, Nyírády P, Romics I, Tímár J, Schaff Zs, **Kiss A**
Expression of claudins and their prognostic significance in non-invasive urothelial neoplasms of the human urinary bladder
JOURNAL OF HISTOCHEMISTRY & CYTOCHEMISTRY **59:**(10) pp. 932-941. (2011)
Független idéző: 2 Függő idéző: 3 Összesen: 5, **IF: 2.725**

12. Orbán E, Szabó E, Lotz G, Kupcsulik P, Páska Cs, Schaff Zs, **Kiss A**
Different expression of occludin and ZO-1 in primary and metastatic liver tumors
PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH **14:**(3) pp. 299-306. (2008)
Független idéző: 30 Függő idéző: 3 Összesen: 33, **IF: 1.260**

13. Borka K, Kaliszky P, Szabó E, Lotz G, Kupcsulik P, Schaff Zs, **Kiss A**
Claudin expression in pancreatic endocrine tumors as compared with ductal adenocarcinomas
VIRCHOWS ARCHIV-AN INTERNATIONAL JOURNAL OF PATHOLOGY **450:**(5) pp. 549-557. (2007)
Független idéző: 23 Függő idéző: 8 Összesen: 31, **IF: 2.029**

14. Halász J, Holczbauer Á, Páska Cs, Kovács M, Benyo G, Verebély T, Schaff Zs, **Kiss A**
Claudin 1 and claudin 2 differentiate fetal and embryonal components in human hepatoblastoma
HUMAN PATHOLOGY **37:**(5) pp. 555-561. (2006)
Független idéző: 16 Függő idéző: 7 Összesen: 23, **IF: 2.810**

15. Lodi C , Szabo E , Holczbauer A , Batmunkh E , Szijarto A , Kupcsulik P , Kovalszky I , Paku S , Illyes G , **Kiss A** , Schaff Z * **megosztott utolsó szerzős cikk**
Claudin-4 differentiates biliary tract cancers from hepatocellular carcinomas
MODERN PATHOLOGY 19:(3) pp. 460-469. (2006)
Független idéző: 40 Függő idéző: 15 Összesen: 55**, IF: 3.753**

A fenti *in extenso* eredeti közlemények összesített impakt faktora: **38,498**, független citációja: **139**, összes citációja: **182**.

VI.2. Scientometriai adatok

Speciális tudománymetriai adatok	Adat
Első szerzős folyóiratcikkek száma	5
Utolsó szerzős folyóiratcikkek száma	24
Első és utolsó szerzőségű folyóiratcikkek impakt faktor összege	61,5
Az utolsó tudományos fokozat/cím (Kandidátus) elnyerése utáni (1999 -) teljes tudományos folyóiratcikkek száma	83
impakt faktor összege	146,6
Magyar nyelven megjelent tudományos teljes folyóiratcikkek száma	16
Az utolsó 10 év (2005-2015) tudományos, teljes, lektorált folyóiratcikkeinek száma	73
impakt faktor összeg	136,4
idézések száma	1118
A legmagasabb idézettségű közlemény idézettsége (az összes idézettség százalékában)	155 (8,17%)
WOS/Scopus azonosítóval idézettség	1817
Sokszerzős és/vagy csoportos közlemények impakt faktor összege	0
idézettsége	0
Folyóiratcikkek,15-29 szerzővel	2

Kiss András tudományos és oktatási munkásságának összefoglalása
MTA V. Orvostudományi Osztály (2015.05.12.)

Tudományos és oktatási közlemények	Száma		Hivatkozások[1]	
	Összesen	Részletezve	Független	Összes
I. Folyóiratcikk[2]	96	—	—	—
szakcikk, összefoglaló nemzetközi folyóiratban	—	74	1465	1771
szakcikk, összefoglaló, hazai idegen nyelvű	—	5	13	66
szakcikk, összefoglaló, magyar nyelvű	—	16	29	48
rövid közlemény	—	1	0	0
II. Könyv	0	—	—	—
a) Szakkönyv, kézikönyv	0	—	—	—
idegen nyelvű	—	0	0	0
magyar nyelvű	—	0	0	0
Felsőoktatási tankönyv	—	0	0	0
b) Szakkönyv, tankönyv szerkesztőként	0	—	—	—
idegen nyelvű	—	0	—	—
magyar nyelvű	—	0	—	—
Felsőoktatási tankönyv	—	0	—	—
III. Könyvrészlet	3	—	—	—
idegen nyelvű	—	0	0	0
magyar nyelvű	—	3	0	0
Felsőoktatási tankönyvfejezet	—	0	0	0
IV. Konferenciaközlemény[3]	0	—	0	0
Oktatási közlemények összesen (II.-III.)		**0**	**0**	**0**
Tudományos és oktatási közlemények összesen (I-IV.)[4]	99	—	1507	1885

V. További tudományos művek	1	—	—	—
További tudományos művek, ide értve a nem teljes folyóiratcikkeket és a nem ismert lektorálságú folyóiratokban megjelent teljes folyóiratcikkeket is	—	0	0	0
Szerkesztőségi levelezés, hozzászólások, válaszok	—	1	2	4
Jelentés, guideline	—	0	0	0

VI. Idézett absztraktok[5]	1	—	1	1

Összesített impakt faktor[4]	**192,9**	—	—	—
Idézettség száma[1, 4]	—	—	**1510**	**1890**
Hirsch index[1]	**27**	—	—	—

Köszönetnyilvánítás

Szeretném köszönetem kifejezni mindazoknak, akik az értekezés elkészítésében segítettek.

Legelőször is köszönöm **Schaff Zsuzsa akadémikus asszonynak** a hatalmas szakmai és emberi segítséget, melyet attól a ponttól kezdve végig érezhettem, hogy pathológia szigorlatomat nála tettem le, majd tudományos diákkörös hallgatóként, MTA tudományos ösztöndíjasként, majd pathológus rezidensként és szakorvosként is mentorom volt. Megtiszteltetés számomra, hogy ma is támogat, tanulhatok Tőle. Értékes tanácsaival mindvégig segítette, támogatta munkám létrejöttét.

Köszönetemet szeretném kifejezni a Semmelweis Egyetem tanszékvezetőinek, akik alatt pathologusként, oktatóként dolgozhattam és tudományos pályámat folytathattam. Mindegyikük számos szakmai útravalóval látott el. Az I. sz. Pathologiai és Kísérleti Rákkutató Intézetben **Lapis Károly akadémikus úr** egy életre szóló szemléletet adott a kutatás nemzetközi kapcsolatairól és támogatta az N.I.H-beli ösztöndíjamat, **Szende Béla professzor úr** segített pathologiai tudásom elmélyítésében. A II. sz. Pathologiai Intézetben tisztelettel adózom **Jellinek Harry professzor úrnak**, aki támogatott a freiburgi tanulmányutamban és értékes szakmai iránymutatást adott. Szeretném köszönetemet kifejezni **Kádár Anna professzor asszonynak**, aki megtisztelt barátságával és bevezetett az International Academy of Pathology társaságba.

Külön köszönettel tartozom **Snorri S. Thorgeirssonnak**, a National Institutes of Health, National Cancer Institute, Laboratory of Experimental Carcinogenesis igazgatójának, akinek laboratóriumában egy életre szóló kutatási tapasztalatot és molekuláris biológiai ismereteket szereztem.

Hálás vagyok **Kovalszky Ilona professzor asszonynak**, akinek baráti és sejtbiológiai és molekuláris biológiai szakmai tanácsaira mindig számíthattam. **Kovács Margit docens asszonynak** is hálásan köszönöm segítségét a pathologiai ismeretek elsajátításában.

A munkám során a Semmelweis Egyetem I. sz. Pathologiai és Kísérletes Rákkutató Intézet és a II. sz. Pathologiai Intézet számos kollégájával dolgoztam együtt, mindannyiuknak köszönetet mondok segítségükért. A Molekuláris Pathologiai Laboratórium minden volt és jelenlegi munkatársának szeretném megköszönni segítségét; külön megköszönve **Lotz Gábor docens úrét.** .

Hasonlóan köszönettel tartozom a II. sz. Pathologiai Intézet számos asszisztensének, **Pekár Zoltánnénak és Somogyi Évának** külön szeretném kifejezni hálámat. **Rigóné Kálé Elvirának** igen hálás vagyok az angol nyelvű publikációk nyelvi korrekciójáért, a cikkek publikációjában és a tudományos adatbázisok karban tartásában nyújtott segítségéért. **Balogh Lenkének** köszönöm a fáradhatatlan segítségét és odafigyelését az adminisztratív teendők ellátásában. **Dr. Schönfeld Tibornak** is köszönöm nagy türelmét, informatikai tanácsait és segítségét.

Végtelenül hálás vagyok szűkebb és tágabb értelemben vett családomnak, szüleimnek, feleségemnek, gyermekeimnek a szüntelen támogatásukért és azért, hogy biztos hátteret biztosítottak kutatómunkámhoz.

IRODALOMJEGYZÉK

1. Abdul-Al HM, Wang G, Makhlouf HR, Goodman ZD. Fibrolamellar hepatocellular carcinoma: an immunohistochemical comparison with conventional hepatocellular carcinoma. Int J Surg Pathol. 2010;18(5):313-8.
2. Abid K, Pazienza V, de Gottardi A, Rubbia-Brandt L, Conne B, Pugnale P, Rossi C, Mangia A, Negro F. An in vitro model of hepatitis C virus genotype 3a-associated triglycerides accumulation. J Hepatol. 2005;42(5):744-51.
3. Adesina AM, Lopez-Terrada D, Wong KK, Gunaratne P, Nguyen Y, Pulliam J, Margolin J, Finegold MJ. Gene expression profiling reveals signatures characterizing histologic subtypes of hepatoblastoma and global deregulation in cell growth and survival pathways. Human pathology. 2009;40(6):843-53.
4. Ali S, Saleh H, Sethi S, Sarkar FH, Philip PA. MicroRNA profiling of diagnostic needle aspirates from patients with pancreatic cancer. Br J Cancer. 2012;107(8):1354-60.
5. Amasheh S, Meiri N, Gitter AH, Schoneberg T, Mankertz J, Schulzke JD, Fromm M. Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells. Journal of cell science. 2002;115(Pt 24):4969-76.
6. Amasheh S, Schmidt T, Mahn M, Florian P, Mankertz J, Tavalali S, Gitter AH, Schulzke J-D, Fromm M. Contribution of claudin-5 to barrier properties in tight junctions of epithelial cells. Cell and tissue research. 2005;321(1):89-96.
7. Armengol C, Cairo S, Fabre M, Buendia MA. Wnt signaling and hepatocarcinogenesis: the hepatoblastoma model. Int J Biochem Cell Biol. 2011;43(2):265-70.
8. Aung PP, Mitani Y, Sanada Y, Nakayama H, Matsusaki K, Yasui W. Differential expression of claudin-2 in normal human tissues and gastrointestinal carcinomas. Virchows Arch. 2006;448(4):428-34.
9. Baek KK, Kim JH, Uhm JE, Park SH, Lee J, Park JO, Park YS, Kang WK, Lim HY. Prognostic factors in patients with advanced hepatocellular carcinoma treated with sorafenib: a retrospective comparison with previously known prognostic models. Oncology. 2011;80(3-4):167-74.
10. Bai S, Nasser MW, Wang B, Hsu SH, Datta J, Kutay H, Yadav A, Nuovo G, Kumar P, Ghoshal K. MicroRNA-122 inhibits tumorigenic properties of hepatocellular carcinoma cells and sensitizes these cells to sorafenib. J Biol Chem. 2009;284(46):32015-27.
11. Balda MS, Matter K. The tight junction protein ZO-1 and an interacting transcription factor regulate ErbB-2 expression. EMBO J. 2000;19(9):2024-33.
12. Balda MS, Matter K. Tight junctions and the regulation of gene expression. Biochimica et biophysica acta. 2009;1788(4):761-7.
13. Balda MS, Matter K. Tight junctions and the regulation of gene expression. BiochimBiophysActa. 2009;1788(4):761-7.
14. Bao L, Yan Y, Xu C, Ji W, Shen S, Xu G, Zeng Y, Sun B, Qian H, Chen L, Wu M, Chen J, Su C. MicroRNA-21 suppresses PTEN and hSulf-1 expression and promotes hepatocellular carcinoma progression through AKT/ERK pathways. Cancer letters. 2013;337(2):226-36.
15. Barba G, Harper F, Harada T, Kohara M, Goulinet S, Matsuura Y, Eder G, Schaff Z, Chapman MJ, Miyamura T, Brechot C. Hepatitis C virus core protein shows a cytoplasmic localization and associates to cellular lipid storage droplets. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997;94(4):1200-5.
16. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell. 2004;116(2):281-97.
17. Barwad A, Gupta N, Gupta K, Rajwanshi A, Marwaha RK, Rao KL, Dey P, Srinivasan R, Nijhawan R. Hepatoblastoma-An attempt of histological subtyping on fine-needle aspiration material. Diagnostic cytopathology. 2013;41(2):95-101.
18. Bassendine MF, Sheridan DA, Bridge SH, Felmlee DJ, Neely RD. Lipids and HCV. Semin Immunopathol. 2013;35(1):87-100.
19. Bello IO, Vilen ST, Niinimaa A, Kantola S, Soini Y, Salo T. Expression of claudins 1, 4, 5, and 7 and occludin, and relationship with prognosis in squamous cell carcinoma of the tongue. Human pathology. 2008;39(8):1212-20.
20. Berenguer M, Lopez-Labrador FX, Wright TL. Hepatitis C and liver transplantation. J Hepatol. 2001;35(5):666-78.

21. Boireau S, Buchert M, Samuel MS, Pannequin J, Ryan JL, Choquet A, Chapuis H, Rebillard X, Avances C, Ernst M, Joubert D, Mottet N, Hollande F. DNA-methylation-dependent alterations of claudin-4 expression in human bladder carcinoma. Carcinogenesis. 2007;28(2):246-58.
22. Borel F, Konstantinova P, Jansen PL. Diagnostic and therapeutic potential of miRNA signatures in patients with hepatocellular carcinoma. J Hepatol. 2012;56(6):1371-83.
23. Borka K, Kaliszky P, Szabo E, Lotz G, Kupcsulik P, Schaff Z, Kiss A. Claudin expression in pancreatic endocrine tumors as compared with ductal adenocarcinomas. Virchows Archiv : an international journal of pathology. 2007;450(5):549-57.
24. Borlak J, Meier T, Halter R, Spanel R, Spanel-Borowski K. Epidermal growth factor-induced hepatocellular carcinoma: gene expression profiles in precursor lesions, early stage and solitary tumours. Oncogene. 2005;24(11):1809-19.
25. Bornholdt J, Friis S, Godiksen S, Poulsen SS, Santoni-Rugiu E, Bisgaard HC, Lothe IM, Ikdahl T, Tveit KM, Johnson E, Kure EH, Vogel LK. The level of claudin-7 is reduced as an early event in colorectal carcinogenesis. BMC Cancer. 2011;11:65.
26. Boutz DR, Collins PJ, Suresh U, Lu M, Ramirez CM, Fernandez-Hernando C, Huang Y, Abreu Rde S, Le SY, Shapiro BA, Liu AM, Luk JM, Aldred SF, Trinklein ND, Marcotte EM, Penalva LO. Two-tiered approach identifies a network of cancer and liver disease-related genes regulated by miR-122. J Biol Chem. 2011;286(20):18066-78.
27. Brock M, Trenkmann M, Gay RE, Gay S, Speich R, Huber LC. MicroRNA-18a enhances the interleukin-6-mediated production of the acute-phase proteins fibrinogen and haptoglobin in human hepatocytes. J Biol Chem. 2011;286(46):40142-50.
28. Buhler S, Bartenschlager R. New targets for antiviral therapy of chronic hepatitis C. Liver Int. 2012;32 Suppl 1:9-16.
29. Burek M, Arias-Loza PA, Roewer N, Forster CY. Claudin-5 as a novel estrogen target in vascular endothelium. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. 2010;30(2):298-304.
30. Cairo S, Wang Y, de Reynies A, Duroure K, Dahan J, Redon MJ, Fabre M, McClelland M, Wang XW, Croce CM, Buendia MA. Stem cell-like micro-RNA signature driven by Myc in aggressive liver cancer. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010;107(47):20471-6.
31. Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. Cell. 2009;136(4):642-55.
32. Castillo-Martin M, Domingo-Domenech J, Karni-Schmidt O, Matos T, Cordon-Cardo C. Molecular pathways of urothelial development and bladder tumorigenesis. Urol Oncol. 2010;28(4):401-8.
33. Centeno BA. Pathology of liver metastases. Cancer Control. 2006;13(1):13.
34. Chang J, Guo JT, Jiang D, Guo H, Taylor JM, Block TM. Liver-specific microRNA miR-122 enhances the replication of hepatitis C virus in nonhepatic cells. J Virol. 2008;82(16):8215-23.
35. Chao YC, Pan SH, Yang SC, Yu SL, Che TF, Lin CW, Tsai MS, Chang GC, Wu CH, Wu YY, Lee YC, Hong TM, Yang PC. Claudin-1 Is a Metastasis Suppressor and Correlates with Clinical Outcome in Lung Adenocarcinoma. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 2009;179(2):123-33.
36. Chen L, Jiang M, Yuan W, Tang H. miR-17-5p as a novel prognostic marker for hepatocellular carcinoma. Journal of investigative surgery : the official journal of the Academy of Surgical Research. 2012;25(3):156-61.
37. Chen L, Shi Y, Jiang CY, Wei LX, Lv YL, Wang YL, Dai GH. Coexpression of PDGFR-alpha, PDGFR-beta and VEGF as a prognostic factor in patients with hepatocellular carcinoma. Int J Biol Markers. 2011;26(2):108-16.
38. Cheung ID, Bagnat M, Ma TP, Datta A, Evason K, Moore JC, Lawson ND, Mostov KE, Moens CB, Stainier DY. Regulation of intrahepatic biliary duct morphogenesis by Claudin 15-like b. Developmental biology. 2012;361(1):68-78.
39. Cheung ST, Leung KL, Ip YC, Chen X, Fong DY, Ng IO, Fan ST, So S. Claudin-10 expression level is associated with recurrence of primary hepatocellular carcinoma. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2005;11(2 Pt 1):551-6.
40. Chiba H, Osanai M, Murata M, Kojima T, Sawada N. Transmembrane proteins of tight junctions. Biochim Biophys Acta. 2008;1778(3):588-600.
41. Chiba K, Yamaguchi K, Ando M, Miyake H, Fujisawa M. Expression pattern of testicular claudin-11 in infertile men. Urology. 2012;80(5):1161 e13-7.
42. Chopra A, Iyer VK, Agarwala S, Mathur SR, Aron M, Gupta SD, Verma K. Apoptotic protein expression, glycogen content, DNA ploidy and cell proliferation in hepatoblastoma subtyping and their role in prognostication. Pediatr Surg Int. 2010;26(12):1173-8.

43. Christofori G. New signals from the invasive front. Nature. 2006;441(7092):444-50.
44. Chu JS, Ge FJ, Zhang B, Wang Y, Silvestris N, Liu LJ, Zhao CH, Lin L, Brunetti AE, Fu YL, Wang J, Paradiso A, Xu JM. Expression and prognostic value of VEGFR-2, PDGFR-beta, and c-Met in advanced hepatocellular carcinoma. J Exp Clin Cancer Res. 2013;32:16.
45. Ciesla M, Skrzypek K, Kozakowska M, Loboda A, Jozkowicz A, Dulak J. MicroRNAs as biomarkers of disease onset. Anal Bioanal Chem. 2011;401(7):2051-61.
46. Cirera-Salinas D, Pauta M, Allen RM, Salerno AG, Ramirez CM, Chamorro-Jorganes A, Wanschel AC, Lasuncion MA, Morales-Ruiz M, Suarez Y, Baldan A, Esplugues E, Fernandez-Hernando C. Mir-33 regulates cell proliferation and cell cycle progression. Cell Cycle. 2012;11(5):922-33.
47. Cortez MA, Welsh JW, Calin GA. Circulating microRNAs as noninvasive biomarkers in breast cancer. Recent results in cancer research Fortschritte der Krebsforschung Progres dans les recherches sur le cancer. 2012;195:151-61.
48. Cortez MA, Ivan C, Zhou P, Wu X, Ivan M, Calin GA. microRNAs in cancer: from bench to bedside. Advances in cancer research. 2010;108:113-57.
49. Cortez MA, Valdecanas D, Zhang X, Zhan Y, Bhardwaj V, Calin GA, Komaki R, Giri DK, Quini CC, Wolfe T, Peltier HJ, Bader AG, Heymach JV, Meyn RE, Welsh JW. Therapeutic delivery of miR-200c enhances radiosensitivity in lung cancer. Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy. 2014;22(8):1494-503.
50. Coulouarn C, Factor VM, Andersen JB, Durkin ME, Thorgeirsson SS. Loss of miR-122 expression in liver cancer correlates with suppression of the hepatic phenotype and gain of metastatic properties. Oncogene. 2009;28(40):3526-36.
51. Croce CM, Calin GA. miRNAs, cancer, and stem cell division. Cell. 2005;122(1):6-7.
52. Cross TJ, Rashid MM, Berry PA, Harrison PM. The importance of steatosis in chronic hepatitis C infection and its management: A review. Hepatol Res. 2010;40(3):237-47.
53. Cummins JM, He Y, Leary RJ, Pagliarini R, Diaz LA, Jr., Sjoblom T, Barad O, Bentwich Z, Szafranska AE, Labourier E, Raymond CK, Roberts BS, Juhl H, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE. The colorectal microRNAome. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103(10):3687-92.
54. Czepiel J, Biesiada G, Mach T. Viral hepatitis C. Pol Arch Med Wewn. 2008;118(12):734-40.
55. Dai R, Ahmed SA. MicroRNA, a new paradigm for understanding immunoregulation, inflammation, and autoimmune diseases. Transl Res. 2011;157(4):163-79.
56. Darido C, Buchert M, Pannequin J, Bastide P, Zalzali H, Mantamadiotis T, Bourgaux J-F, Garambois V, Jay P, Blache P. Defective claudin-7 regulation by Tcf-4 and Sox-9 disrupts the polarity and increases the tumorigenicity of colorectal cancer cells. Cancer research. 2008;68(11):4258-68.
57. Davalos A, Goedeke L, Smibert P, Ramirez CM, Warrier NP, Andreo U, Cirera-Salinas D, Rayner K, Suresh U, Pastor-Pareja JC, Esplugues E, Fisher EA, Penalva LO, Moore KJ, Suarez Y, Lai EC, Fernandez-Hernando C. miR-33a/b contribute to the regulation of fatty acid metabolism and insulin signaling. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011;108(22):9232-7.
58. de Oliveira SS, de Oliveira IM, De Souza W, Morgado-Díaz JA. Claudins upregulation in human colorectal cancer. FEBS letters. 2005;579(27):6179-85.
59. de Oliveira SS, de Oliveira IM, De Souza W, Morgado-Diaz JA. Claudins upregulation in human colorectal cancer. FEBS Lett. 2005;579(27):6179-85.
60. Dhawan P, Singh AB, Deane NG, No Y, Shiou SR, Schmidt C, Neff J, Washington MK, Beauchamp RD. Claudin-1 regulates cellular transformation and metastatic behavior in colon cancer. J Clin Invest. 2005;115(7):1765-76.
61. Ding X, Ding J, Ning J, Yi F, Chen J, Zhao D, Zheng J, Liang Z, Hu Z, Du Q. Circulating microRNA-122 as a potential biomarker for liver injury. Mol Med Report. 2012;5(6):1428-32.
62. Dos Reis PP, Bharadwaj RR, Machado J, Macmillan C, Pintilie M, Sukhai MA, Perez-Ordonez B, Gullane P, Irish J, Kamel-Reid S. Claudin 1 overexpression increases invasion and is associated with aggressive histological features in oral squamous cell carcinoma. Cancer. 2008;113(11):3169-80.
63. Dweep H, Sticht C, Pandey P, Gretz N. miRWalk--database: prediction of possible miRNA binding sites by "walking" the genes of three genomes. J Biomed Inform. 2011;44(5):839-47.
64. Eiber M, van Oers JM, Zwarthoff EC, van der Kwast TH, Ulrich O, Helpap B, Stoerkel S, Blaszyk H, Cheville J, Sauter G, Wild PJ, Stoehr R, Hofstaedter F, Hartmann A. Low frequency of molecular changes and tumor recurrence in inverted papillomas of the urinary tract. Am J Surg Pathol. 2007;31(6):938-46.
65. Eiber M, van Oers JM, Zwarthoff EC, van der Kwast TH, Ulrich O, Helpap B, Stoerkel S, Blaszyk H, Cheville J, Sauter G, Wild PJ, Stoehr R, Hofstaedter F, Hartmann A. Low frequency of molecular

changes and tumor recurrence in inverted papillomas of the urinary tract. AmJSurgPathol. 2007;31(6):938-46.
66. El-Zayadi AR. Hepatic steatosis: a benign disease or a silent killer. World J Gastroenterol. 2008;14(26):4120-6.
67. El Tayebi HM, Omar K, Hegy S, El Maghrabi M, El Brolosy M, Hosny KA, Esmat G, Abdelaziz AI. Repression of miR-17-5p with elevated expression of E2F-1 and c-MYC in non-metastatic hepatocellular carcinoma and enhancement of cell growth upon reversing this expression pattern. Biochem Biophys Res Commun. 2013;434(3):421-7.
68. Ersoz S, Mungan S, Cobanoglu U, Turgutalp H, Ozoran Y. Prognostic importance of Claudin-1 and Claudin-4 expression in colon carcinomas. Pathology-Research and Practice. 2011;207(5):285-9.
69. Escaffit F, Boudreau F, Beaulieu JF. Differential expression of claudin-2 along the human intestine: Implication of GATA-4 in the maintenance of claudin-2 in differentiating cells. Journal of cellular physiology. 2005;203(1):15-26.
70. Estrabaud E, Bieche I, Lapalus M, De Muynck S, Lada O, Martinot-Peignoux M, Duces A, Valla D, Bedossa P, Marcellin P, editors. Hepatic miRNA signature associated with treatment response in chronic hepatitis C. Hepatology; 2011: WILEY-BLACKWELL COMMERCE PLACE, 350 MAIN ST, MALDEN 02148, MA USA.
71. Evans MJ, von Hahn T, Tscherne DM, Syder AJ, Panis M, Wolk B, Hatziioannou T, McKeating JA, Bieniasz PD, Rice CM. Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. Nature. 2007;446(7137):801-5.
72. Evarts RP, Nagy P, Marsden E, Thorgeirsson SS. A precursor-product relationship exists between oval cells and hepatocytes in rat liver. Carcinogenesis. 1987;8(11):1737-40.
73. Ezzat S, Asa SL. The molecular pathogenetic role of cell adhesion in endocrine neoplasia. Journal of clinical pathology. 2005;58(11):1121-5.
74. Facchetti F, Gentili F, Lonardi S, Bercich L, Santin A. Claudin-4 in mesothelioma diagnosis. Histopathology. 2007;51(2):261-3.
75. Facchetti F, Lonardi S, Gentili F, Bercich L, Falchetti M, Tardanico R, Baronchelli C, Lucini L, Santin A, Murer B. Claudin 4 identifies a wide spectrum of epithelial neoplasms and represents a very useful marker for carcinoma versus mesothelioma diagnosis in pleural and peritoneal biopsies and effusions. Virchows Arch. 2007;451(3):669-80.
76. Felmlee DJ, Hafirassou ML, Lefevre M, Baumert TF, Schuster C. Hepatitis C virus, cholesterol and lipoproteins--impact for the viral life cycle and pathogenesis of liver disease. Viruses. 2013;5(5):1292-324.
77. Fofana I, Krieger SE, Grunert F, Glauben S, Xiao F, Fafi-Kremer S, Soulier E, Royer C, Thumann C, Mee CJ, McKeating JA, Dragic T, Pessaux P, Stoll-Keller F, Schuster C, Thompson J, Baumert TF. Monoclonal anti-claudin 1 antibodies prevent hepatitis C virus infection of primary human hepatocytes. Gastroenterology. 2010;139(3):953-64, 64 e1-4.
78. Forster C. Tight junctions and the modulation of barrier function in disease. Histochemistry and cell biology. 2008;130(1):55-70.
79. Fredriksson K, Van Itallie CM, Aponte A, Gucek M, Tietgens AJ, Anderson JM. Proteomic analysis of proteins surrounding occludin and claudin-4 reveals their proximity to signaling and trafficking networks. PloS one. 2015;10(3):e0117074.
80. French AD, Fiori JL, Camilli TC, Leotlela PD, O'Connell MP, Frank BP, Subaran S, Indig FE, Taub DD, Weeraratna AT. PKC and PKA phosphorylation affect the subcellular localization of claudin-1 in melanoma cells. Int J Med Sci. 2009;6(2):93-101.
81. Fukasawa M, Nagase S, Shirasago Y, Iida M, Yamashita M, Endo K, Yagi K, Suzuki T, Wakita T, Hanada K, Kuniyasu H, Kondoh M. Monoclonal Antibodies against Extracellular Domains of Claudin-1 Block Hepatitis C Virus Infection in a Mouse Model. J Virol. 2015;89(9):4866-79.
82. Furuse M. Knockout animals and natural mutations as experimental and diagnostic tool for studying tight junction functions in vivo. Biochimica et biophysica acta. 2009;1788(4):813-9.
83. Furuse M, Furuse K, Sasaki H, Tsukita S. Conversion of zonulae occludentes from tight to leaky strand type by introducing claudin-2 into Madin-Darby canine kidney I cells. The Journal of cell biology. 2001;153(2):263-72.
84. Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. The Journal of cell biology. 1993;123(6 Pt 2):1777-88.
85. Furuse M, Hata M, Furuse K, Yoshida Y, Haratake A, Sugitani Y, Noda T, Kubo A, Tsukita S. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. J Cell Biol. 2002;156(6):1099-111.

86. Furuse M, Hata M, Furuse K, Yoshida Y, Haratake A, Sugitani Y, Noda T, Kubo A, Tsukita S. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. Journal of Cell Biology. 2002;156(6):1099-111.
87. Garajova I, Le Large TY, Frampton AE, Rolfo C, Voortman J, Giovannetti E. Molecular mechanisms underlying the role of microRNAs in the chemoresistance of pancreatic cancer. BioMed research international. 2014;2014:678401.
88. Garofalo M, Quintavalle C, Romano G, Croce CM, Condorelli G. miR221/222 in cancer: their role in tumor progression and response to therapy. Curr Mol Med. 2012;12(1):27-33.
89. Gelley F, Zadori G, Nemes B, Fassan M, Lendvai G, Sarvary E, Doros A, Gerlei Z, Nagy P, Schaff Z, Kiss A. MicroRNA profile before and after antiviral therapy in liver transplant recipients for hepatitis C virus cirrhosis. Journal of gastroenterology and hepatology. 2014;29(1):121-7.
90. Georges R, Bergmann F, Hamdi H, Zepp M, Eyol E, Hielscher T, Berger MR, Adwan H. Sequential biphasic changes in claudin1 and claudin4 expression are correlated to colorectal cancer progression and liver metastasis. Journal of cellular and molecular medicine. 2012;16(2):260-72.
91. Giannini E, Ceppa P, Botta F, Fasoli A, Romagnoli P, Cresta E, Venturino V, Risso D, Celle G, Testa R. Steatosis and bile duct damage in chronic hepatitis C: distribution and relationships in a group of Northern Italian patients. Liver. 1999;19(5):432-7.
92. Giordano S, Columbano A. MicroRNAs: new tools for diagnosis, prognosis, and therapy in hepatocellular carcinoma? Hepatology. 2013;57(2):840-7.
93. Gnemmi V, Leteurtre E, Sudour-Bonnange H, Devisme L, Guettier C, Buob D, Leroy X. SALL4 is a marker of the embryonal subtype of hepatoblastoma. Histopathology. 2013;63(3):425-8.
94. Gonzalez-Mariscal L, Lechuga S, Garay E. Role of tight junctions in cell proliferation and cancer. Prog Histochem Cytochem. 2007;42(1):1-57.
95. Gonzalez-Mariscal L, Hernandez S, Vega J. Inventions designed to enhance drug delivery across epithelial and endothelial cells through the paracellular pathway. Recent Pat Drug Deliv Formul. 2008;2(2):145-76.
96. Grotegut S, von Schweinitz D, Christofori G, Lehembre F. Hepatocyte growth factor induces cell scattering through MAPK/Egr-1-mediated upregulation of Snail. The EMBO journal. 2006;25(15):3534-45.
97. Gröne J, Weber B, Staub E, Heinze M, Klaman I, Pilarsky C, Hermann K, Castanos-Velez E, Röpcke S, Mann B. Differential expression of genes encoding tight junction proteins in colorectal cancer: frequent dysregulation of claudin-1,-8 and-12. International journal of colorectal disease. 2007;22(6):651-9.
98. Gunzel D, Fromm M. Claudins and other tight junction proteins. Compr Physiol. 2012;2(3):1819-52.
99. Gyongyosi B, Vegh E, Jaray B, Szekely E, Fassan M, Bodoky G, Schaff Z, Kiss A. Pretreatment MicroRNA Level and Outcome in sorafenib-treated Hepatocellular Carcinoma. The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society. 2014;62(8):547-55.
100. Gyongyosi B, Vegh E, Jaray B, Szekely E, Fassan M, Bodoky G, Schaff Z, Kiss AMDPD. Pretreatment Microrna Level and Outcome of sorafenib-Treated Hepatocellular Carcinoma. The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society. 2014.
101. Gyorffy H, Holczbauer A, Nagy P, Szabo Z, Kupcsulik P, Paska C, Papp J, Schaff Z, Kiss A. Claudin expression in Barrett's esophagus and adenocarcinoma. Virchows Archiv : an international journal of pathology. 2005;447(6):961-8.
102. Gyugos M, Lendvai G, Kenessey I, Schlachter K, Halasz J, Nagy P, Garami M, Jakab Z, Schaff Z, Kiss A. MicroRNA expression might predict prognosis of epithelial hepatoblastoma. Virchows Archiv : an international journal of pathology. 2014;464(4):419-27.
103. Hadj-Rabia S, Baala L, Vabres P, Hamel-Teillac D, Jacquemin E, Fabre M, Lyonnet S, de Prost Y, Munnich A, Hadchouel M. Claudin-1 gene mutations in neonatal sclerosing cholangitis associated with ichthyosis: a tight junction disease. Gastroenterology. 2004;127(5):1386-90.
104. Halasz J, Holczbauer A, Paska C, Kovacs M, Benyo G, Verebely T, Schaff Z, Kiss A. Claudin-1 and claudin-2 differentiate fetal and embryonal components in human hepatoblastoma. Human pathology. 2006;37(5):555-61.
105. Harris HJ, Davis C, Mullins JG, Hu K, Goodall M, Farquhar MJ, Mee CJ, McCaffrey K, Young S, Drummer H, Balfe P, McKeating JA. Claudin association with CD81 defines hepatitis C virus entry. The Journal of biological chemistry. 2010;285(27):21092-102.
106. Harris HJ, Farquhar MJ, Mee CJ, Davis C, Reynolds GM, Jennings A, Hu K, Yuan F, Deng H, Hubscher SG, Han JH, Balfe P, McKeating JA. CD81 and claudin 1 coreceptor association: role in hepatitis C virus entry. Journal of virology. 2008;82(10):5007-20.

107. He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. Nat Rev Genet. 2004;5(7):522-31.
108. Heinzelmann-Schwarz VA, Gardiner-Garden M, Henshall SM, Scurry J, Scolyer RA, Davies MJ, Heinzelmann M, Kalish LH, Bali A, Kench JG, Edwards LS, Vanden Bergh PM, Hacker NF, Sutherland RL, O'Brien PM. Overexpression of the cell adhesion molecules DDR1, Claudin 3, and Ep-CAM in metaplastic ovarian epithelium and ovarian cancer. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2004;10(13):4427-36.
109. Henke JI, Goergen D, Zheng J, Song Y, Schuttler CG, Fehr C, Junemann C, Niepmann M. microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA. Embo J. 2008;27(24):3300-10.
110. Hermo L, Pelletier RM, Cyr DG, Smith CE. Surfing the wave, cycle, life history, and genes/proteins expressed by testicular germ cells. Part 1: background to spermatogenesis, spermatogonia, and spermatocytes. Microsc Res Tech. 2010;73(4):241-78.
111. Hewitt KJ, Agarwal R, Morin PJ. The claudin gene family: expression in normal and neoplastic tissues. BMC cancer. 2006;6:186.
112. Hibbs K, Skubitz KM, Pambuccian SE, Casey RC, Burleson KM, Oegema TR, Jr., Thiele JJ, Grindle SM, Bliss RL, Skubitz AP. Differential gene expression in ovarian carcinoma: identification of potential biomarkers. The American journal of pathology. 2004;165(2):397-414.
113. Higashi Y, Suzuki S, Sakaguchi T, Nakamura T, Baba S, Reinecker HC, Nakamura S, Konno H. Loss of claudin-1 expression correlates with malignancy of hepatocellular carcinoma. J Surg Res. 2007;139(1):68-76.
114. Hirohashi S, Kanai Y. Cell adhesion system and human cancer morphogenesis. Cancer Sci. 2003;94(7):575-81.
115. Holczbauer A, Gyongyosi B, Lotz G, Szijarto A, Kupcsulik P, Schaff Z, Kiss A. Distinct claudin expression profiles of hepatocellular carcinoma and metastatic colorectal and pancreatic carcinomas. The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society. 2013;61(4):294-305.
116. Holczbauer A, Gyongyosi B, Lotz G, Torzsok P, Kaposi-Novak P, Szijarto A, Tatrai P, Kupcsulik P, Schaff Z, Kiss A. Increased Expression of Claudin-1 and Claudin-7 in Liver Cirrhosis and Hepatocellular Carcinoma. Pathology oncology research : POR. 2014.
117. Hourioux C, Patient R, Morin A, Blanchard E, Moreau A, Trassard S, Giraudeau B, Roingeard P. The genotype 3-specific hepatitis C virus core protein residue phenylalanine 164 increases steatosis in an in vitro cellular model. Gut. 2007;56(9):1302-8.
118. Hu J, Xu Y, Hao J, Wang S, Li C, Meng S. MiR-122 in hepatic function and liver diseases. Protein Cell. 2012;3(5):364-71.
119. Huerta M, Munoz R, Tapia R, Soto-Reyes E, Ramirez L, Recillas-Targa F, Gonzalez-Mariscal L, Lopez-Bayghen E. Cyclin D1 is transcriptionally down-regulated by ZO-2 via an E box and the transcription factor c-Myc. Molecular biology of the cell. 2007;18(12):4826-36.
120. Huo Q, Kinugasa T, Wang L, Huang J, Zhao J, Shibaguchi H, Kuroki M, Tanaka T, Yamashita Y, Nabeshima K, Iwasaki H, Kuroki M. Claudin-1 Protein is a Major Factor Involved in the Tumorigenesis of Colorectal Cancer. Anticancer Research. 2009;29(3):851-7.
121. Hwang SJ, Lee SD. Hepatic steatosis and hepatitis C: Still unhappy bedfellows? J Gastroenterol Hepatol. 2011;26 Suppl 1:96-101.
122. Ikenouchi J, Matsuda M, Furuse M, Tsukita S. Regulation of tight junctions during the epithelium-mesenchyme transition: direct repression of the gene expression of claudins/occludin by Snail. Journal of cell science. 2003;116(Pt 10):1959-67.
123. Ikenouchi J, Furuse M, Furuse K, Sasaki H, Tsukita S. Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. J Cell Biol. 2005;171(6):939-45.
124. Inai T, Kobayashi J, Shibata Y. Claudin-1 contributes to the epithelial barrier function in MDCK cells. European journal of cell biology. 1999;78(12):849-55.
125. Iorio MV, Visone R, Di Leva G, Donati V, Petrocca F, Casalini P, Taccioli C, Volinia S, Liu CG, Alder H, Calin GA, Menard S, Croce CM. MicroRNA signatures in human ovarian cancer. Cancer Res. 2007;67(18):8699-707.
126. Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, Magri E, Pedriali M, Fabbri M, Campiglio M, Menard S, Palazzo JP, Rosenberg A, Musiani P, Volinia S, Nenci I, Calin GA, Querzoli P, Negrini M, Croce CM. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. Cancer Res. 2005;65(16):7065-70.

127. Ishak KG. Tumors of the liver and intrahepatic bile ducts. Atlas of Tumor Pathology, 3rd Series. 2001;31:199-230.
128. Ismail H, Broniszczak D, Kalicinski P, Dembowska-Baginska B, Perek D, Teisseyre J, Kluge P, Kosciesza A, Lembas A, Markiewicz M. Changing treatment and outcome of children with hepatoblastoma: analysis of a single center experience over the last 20 years. J Pediatr Surg. 2012;47(7):1331-9.
129. Jacobs BL, Lee CT, Montie JE. Bladder cancer in 2010: how far have we come? CA Cancer J Clin. 2010;60(4):244-72.
130. Jakab C, Rusvai M, Gálfi P, Mándoki M, Demeter Z, Szabó Z, Kulka J. Expression of claudin-5 in hepatoid gland biopsies. Veterinary dermatology. 2010;21(3):276-81.
131. Jarmay K, Karacsony G, Nagy A, Schaff Z. Changes in lipid metabolism in chronic hepatitis C. World J Gastroenterol. 2005;11(41):6422-8.
132. Jazbutyte V, Thum T. MicroRNA-21: from cancer to cardiovascular disease. Curr Drug Targets. 2010;11(8):926-35.
133. Jones TD, Wang M, Eble JN, MacLennan GT, Lopez-Beltran A, Zhang S, Cocco A, Cheng L. Molecular evidence supporting field effect in urothelial carcinogenesis. Clin Cancer Res. 2005;11(18):6512-9.
134. Jopling CL, Schutz S, Sarnow P. Position-dependent function for a tandem microRNA miR-122-binding site located in the hepatitis C virus RNA genome. Cell Host Microbe. 2008;4(1):77-85.
135. Kaihara T, Kawamata H, Imura J, Fujii S, Kitajima K, Omotehara F, Maeda N, Nakamura T, Fujimori T. Redifferentiation and ZO-1 reexpression in liver-metastasized colorectal cancer: Possible association with epidermal growth factor receptor-induced tyrosine phosphorylation of ZO-1. Cancer science. 2003;94(2):166-72.
136. Kakiashvili DM, van Rhijn BW, Trottier G, Jewett MA, Fleshner NE, Finelli A, Azuero J, Bangma CH, Vajpeyi R, Alkhateeb S, Hanna S, Kostynsky A, Kuk C, Van Der Kwast TH, Zlotta AR. Long-term follow-up of T1 high-grade bladder cancer after intravesical bacille Calmette-Guerin treatment. BJU Int. 2011;107(4):540-6.
137. Karakatsanis A, Papaconstantinou I, Gazouli M, Lyberopoulou A, Polymeneas G, Voros D. Expression of microRNAs, miR-21, miR-31, miR-122, miR-145, miR-146a, miR-200c, miR-221, miR-222, and miR-223 in patients with hepatocellular carcinoma or intrahepatic cholangiocarcinoma and its prognostic significance. Mol Carcinog. 2013;52(4):297-303.
138. Katsuno T, Umeda K, Matsui T, Hata M, Tamura A, Itoh M, Takeuchi K, Fujimori T, Nabeshima Y, Noda T, Tsukita S. Deficiency of zonula occludens-1 causes embryonic lethal phenotype associated with defected yolk sac angiogenesis and apoptosis of embryonic cells. Molecular biology of the cell. 2008;19(6):2465-75.
139. Kerr TA, Korenblat KM, Davidson NO. MicroRNAs and liver disease. Transl Res. 2011;157(4):241-52.
140. Khan M, Jahan S, Khaliq S, Ijaz B, Ahmad W, Samreen B, Hassan S. Interaction of the hepatitis C virus (HCV) core with cellular genes in the development of HCV-induced steatosis. Arch Virol. 2010;155(11):1735-53.
141. Kim T, Huh J, Lee S, Kang H, Kim G, An H. Down-regulation of claudin-2 in breast carcinomas is associated with advanced disease. Histopathology. 2008;53(1):48-55.
142. Kinugasa T, Huo Q, HIGASHI D, Shibaguchi H, KUROKI M, Tanaka T, Futami K, Yamashita Y, Hachimine K, Maekawa S. Selective up-regulation of claudin-1 and claudin-2 in colorectal cancer. Anticancer research. 2007;27(6A):3729-34.
143. Kiss A, Szepesi A, Lotz G, Nagy P, Schaff Z. Expression of transforming growth factor-alpha in hepatoblastoma. Cancer. 1998;83(4):690-7.
144. Kitano M, Rahbari R, Patterson EE, Steinberg SM, Prasad NB, Wang Y, Zeiger MA, Kebebew E. Evaluation of candidate diagnostic microRNAs in thyroid fine-needle aspiration biopsy samples. Thyroid. 2012;22(3):285-91.
145. Klymkowsky MW, Savagner P. Epithelial-mesenchymal transition: a cancer researcher's conceptual friend and foe. Am J Pathol. 2009;174(5):1588-93.
146. Kojima S, Rahner C, Peng S, Rizzolo LJ. Claudin 5 is transiently expressed during the development of the retinal pigment epithelium. The Journal of membrane biology. 2002;186(2):81-8.
147. Kojima T, Yamamoto T, Murata M, Chiba H, Kokai Y, Sawada N. Regulation of the blood-biliary barrier: interaction between gap and tight junctions in hepatocytes. Medical electron microscopy : official journal of the Clinical Electron Microscopy Society of Japan. 2003;36(3):157-64.

148. Kojima T, Takano K, Yamamoto T, Murata M, Son S, Imamura M, Yamaguchi H, Osanai M, Chiba H, Himi T, Sawada N. Transforming growth factor-beta induces epithelial to mesenchymal transition by down-regulation of claudin-1 expression and the fence function in adult rat hepatocytes. Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver. 2008;28(4):534-45.
149. Kominsky SL, Vali M, Korz D, Gabig TG, Weitzman SA, Argani P, Sukumar S. Clostridium perfringens enterotoxin elicits rapid and specific cytolysis of breast carcinoma cells mediated through tight junction proteins claudin 3 and 4. The American journal of pathology. 2004;164(5):1627-33.
150. Kominsky SL, Argani P, Korz D, Evron E, Raman V, Garrett E, Rein A, Sauter G, Kallioniemi OP, Sukumar S. Loss of the tight junction protein claudin-7 correlates with histological grade in both ductal carcinoma in situ and invasive ductal carcinoma of the breast. Oncogene. 2003;22(13):2021-33.
151. Kominsky SL, Argani P, Korz D, Evron E, Raman V, Garrett E, Rein A, Sauter G, Kallioniemi OP, Sukumar S. Loss of the tight junction protein claudin-7 correlates with histological grade in both ductal carcinoma in situ and invasive ductal carcinoma of the breast. Oncogene. 2003;22(13):2021-33.
152. Kondoh A, Takano K, Kojima T, Ohkuni T, Kamekura R, Ogasawara N, Go M, Sawada N, Himi T. Altered expression of claudin-1, claudin-7, and tricellulin regardless of human papilloma virus infection in human tonsillar squamous cell carcinoma. Acta Otolaryngol. 2011;131(8):861-8.
153. Kondoh M, Yagi K. Tight junction modulators: promising candidates for drug delivery. Curr Med Chem. 2007;14(23):2482-8.
154. Korompay A, Borka K, Lotz G, Somoracz A, Torzsok P, Erdelyi-Belle B, Kenessey I, Baranyai Z, Zsoldos F, Kupcsulik P, Bodoky G, Schaff Z, Kiss A. Tricellulin expression in normal and neoplastic human pancreas. Histopathology.
155. Korompay A, Borka K, Lotz G, Somoracz A, Torzsok P, Erdelyi-Belle B, Kenessey I, Baranyai Z, Zsoldos F, Kupcsulik P, Bodoky G, Schaff Z, Kiss A. Tricellulin expression in normal and neoplastic human pancreas. Histopathology. 2012;60(6B):E76-86.
156. Kramer F, White K, Kubbies M, Swisshelm K, Weber BH. Genomic organization of claudin-1 and its assessment in hereditary and sporadic breast cancer. Human genetics. 2000;107(3):249-56.
157. Krawczyk M, Bonfrate L, Portincasa P. Nonalcoholic fatty liver disease. Best Pract Res Clin Gastroenterol. 2010;24(5):695-708.
158. Krieger SE, Zeisel MB, Davis C, Thumann C, Harris HJ, Schnober EK, Mee C, Soulier E, Royer C, Lambotin M, Grunert F, Dao Thi VL, Dreux M, Cosset FL, McKeating JA, Schuster C, Baumert TF. Inhibition of hepatitis C virus infection by anti-claudin-1 antibodies is mediated by neutralization of E2-CD81-claudin-1 associations. Hepatology. 2010;51(4):1144-57.
159. Krug SM, Schulzke JD, Fromm M. Tight junction, selective permeability, and related diseases. Semin Cell Dev Biol. 2014;36:166-76.
160. Krug SM, Amasheh S, Richter JF, Milatz S, Gunzel D, Westphal JK, Huber O, Schulzke JD, Fromm M. Tricellulin forms a barrier to macromolecules in tricellular tight junctions without affecting ion permeability. Molecular biology of the cell. 2009;20(16):3713-24.
161. Kuhn S, Koch M, Nübel T, Ladwein M, Antolovic D, Klingbeil P, Hildebrand D, Moldenhauer G, Langbein L, Franke WW. A complex of EpCAM, claudin-7, CD44 variant isoforms, and tetraspanins promotes colorectal cancer progression. Molecular cancer research. 2007;5(6):553-67.
162. Kwak PB, Iwasaki S, Tomari Y. The microRNA pathway and cancer. Cancer science. 2010;101(11):2309-15.
163. Lachenmayer A, Alsinet C, Chang CY, Llovet JM. Molecular approaches to treatment of hepatocellular carcinoma. Dig Liver Dis. 2010;42 Suppl 3:S264-72.
164. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. Curr Biol. 2002;12(9):735-9.
165. Lakner AM, Bonkovsky HL, Schrum LW. microRNAs: fad or future of liver disease. World J Gastroenterol. 2011;17(20):2536-42.
166. Lal-Nag M, Morin PJ. The claudins. Genome biology. 2009;10(8):235.
167. Lau SK, Prakash S, Geller SA, Alsabeh R. Comparative immunohistochemical profile of hepatocellular carcinoma, cholangiocarcinoma, and metastatic adenocarcinoma. Human pathology. 2002;33(12):1175-81.
168. Lawrie CH. MicroRNAs in hematological malignancies. Blood Rev. 2013;27(3):143-54.
169. Lax SF, Kurman RJ. A dualistic model for endometrial carcinogenesis based on immunohistochemical and molecular genetic analyses. Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft fur Pathologie. 1997;81:228-32.

170. Lechpammer M, Resnick MB, Sabo E, Yakirevich E, Greaves WO, Sciandra KT, Tavares R, Noble LC, DeLellis RA, Wang LJ. The diagnostic and prognostic utility of claudin expression in renal cell neoplasms. Mod Pathol. 2008;21(11):1320-9.
171. Lee SK, Moon J, Park SW, Song SY, Chung JB, Kang JK. Loss of the tight junction protein claudin 4 correlates with histological growth-pattern and differentiation in advanced gastric adenocarcinoma. Oncology reports. 2005;13(2):193-9.
172. Lendvai G, Jarmay K, Karacsony G, Halasz T, Kovalszky I, Baghy K, Wittmann T, Schaff Z, Kiss A. Elevated miR-33a and miR-224 in steatotic chronic hepatitis C liver biopsies. World J Gastroenterol. 2014;20(41):15343-50.
173. Lenzi R, Liu MH, Tarsetti F, Slott PA, Alpini G, Zhai WR, Paronetto F, Lenzen R, Tavoloni N. Histogenesis of bile duct-like cells proliferating during ethionine hepatocarcinogenesis. Evidence for a biliary epithelial nature of oval cells. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology. 1992;66(3):390-402.
174. Li D, Mrsny RJ. Oncogenic Raf-1 disrupts epithelial tight junctions via downregulation of occludin. The Journal of cell biology. 2000;148(4):791-800.
175. Li H, Li Y, Liu D, Sun H, Liu J. miR-224 is Critical for Celastrol-Induced Inhibition of Migration and Invasion of Hepatocellular Carcinoma Cells. Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology. 2013;32(2):448-58.
176. Li S, Chen X, Zhang H, Liang X, Xiang Y, Yu C, Zen K, Li Y, Zhang CY. Differential expression of microRNAs in mouse liver under aberrant energy metabolic status. J Lipid Res. 2009;50(9):1756-65.
177. Li X, Saeki R, Watari A, Yagi K, Kondoh M. Tissue distribution and safety evaluation of a claudin-targeting molecule, the C-terminal fragment of Clostridium perfringens enterotoxin. European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences. 2014;52:132-7.
178. Li X, Iida M, Tada M, Watari A, Kawahigashi Y, Kimura Y, Yamashita T, Ishii-Watabe A, Uno T, Fukasawa M, Kuniyasu H, Yagi K, Kondoh M. Development of an anti-claudin-3 and -4 bispecific monoclonal antibody for cancer diagnosis and therapy. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics. 2014;351(1):206-13.
179. Liu S, Yang W, Shen L, Turner JR, Coyne CB, Wang T. Tight junction proteins claudin-1 and occludin control hepatitis C virus entry and are downregulated during infection to prevent superinfection. J Virol. 2009;83(4):2011-4.
180. Liu X, Wang T, Wakita T, Yang W. Systematic identification of microRNA and messenger RNA profiles in hepatitis C virus-infected human hepatoma cells. Virology. 2010;398(1):57-67.
181. Lodi C, Szabo E, Holczbauer A, Batmunkh E, Szijarto A, Kupcsulik P, Kovalszky I, Paku S, Illyes G, Kiss A, Schaff Z. Claudin-4 differentiates biliary tract cancers from hepatocellular carcinomas. Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc. 2006;19(3):460-9.
182. Lódi C, Szabó E, Holczbauer A, Batmunkh E, Szíjártó A, Kupcsulik P, Kovalszky I, Paku S, Illyés G, Kiss A. Claudin-4 differentiates biliary tract cancers from hepatocellular carcinomas. Modern pathology. 2006;19(3):460-9.
183. Long H, Crean CD, Lee WH, Cummings OW, Gabig TG. Expression of Clostridium perfringens enterotoxin receptors claudin-3 and claudin-4 in prostate cancer epithelium. Cancer Res. 2001;61(21):7878-81.
184. Lopez-Terrada D, Zimmermann A. Current issues and controversies in the classification of pediatric hepatocellular tumors. Pediatr Blood Cancer. 2012;59(5):780-4.
185. Lopez-Terrada D, Gunaratne PH, Adesina AM, Pulliam J, Hoang DM, Nguyen Y, Mistretta TA, Margolin J, Finegold MJ. Histologic subtypes of hepatoblastoma are characterized by differential canonical Wnt and Notch pathway activation in DLK+ precursors. Human pathology. 2009;40(6):783-94.
186. Lu S, Wang S, Geng S, Ma S, Liang Z, Jiao B. Upregulation of microRNA-224 confers a poor prognosis in glioma patients. Clin Transl Oncol. 2013;15(7):569-74.
187. Luettig J, Rosenthal R, Barmeyer C, Schulzke JD. Claudin-2 as a mediator of leaky gut barrier during intestinal inflammation. Tissue barriers. 2015;3(1-2):e977176.
188. Ma D, Tao X, Gao F, Fan C, Wu D. miR-224 functions as an onco-miRNA in hepatocellular carcinoma cells by activating AKT signaling. Oncol Lett. 2012;4(3):483-8.
189. Magrelli A, Azzalin G, Salvatore M, Viganotti M, Tosto F, Colombo T, Devito R, Di Masi A, Antoccia A, Lorenzetti S, Maranghi F, Mantovani A, Tanzarella C, Macino G, Taruscio D. Altered microRNA Expression Patterns in Hepatoblastoma Patients. Translational oncology. 2009;2(3):157-63.

190. Malogolowkin MH, Katzenstein HM, Meyers RL, Krailo MD, Rowland JM, Haas J, Finegold MJ. Complete surgical resection is curative for children with hepatoblastoma with pure fetal histology: a report from the Children's Oncology Group. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2011;29(24):3301-6.
191. Mankertz J, Hillenbrand B, Tavalali S, Huber O, Fromm M, Schulzke JD. Functional crosstalk between Wnt signaling and Cdx-related transcriptional activation in the regulation of the claudin-2 promoter activity. Biochemical and biophysical research communications. 2004;314(4):1001-7.
192. Marquez RT, Bandyopadhyay S, Wendlandt EB, Keck K, Hoffer BA, Icardi MS, Christensen RN, Schmidt WN, McCaffrey AP. Correlation between microRNA expression levels and clinical parameters associated with chronic hepatitis C viral infection in humans. Lab Invest. 2010;90(12):1727-36.
193. Martin TA, Jiang WG. Loss of tight junction barrier function and its role in cancer metastasis. Biochimica et biophysica acta. 2009;1788(4):872-91.
194. Masuda R, Semba S, Mizuuchi E, Yanagihara K, Yokozaki H. Negative regulation of the tight junction protein tricellulin by snail-induced epithelial-mesenchymal transition in gastric carcinoma cells. Pathobiology. 2010;77(2):106-13.
195. Matter K, Balda MS. Signalling to and from tight junctions. Nature reviews Molecular cell biology. 2003;4(3):225-36.
196. May M, Brookman-Amissah S, Roigas J, Hartmann A, Storkel S, Kristiansen G, Gilfrich C, Borchardt R, Hoschke B, Kaufmann O, Gunia S. Prognostic accuracy of individual uropathologists in noninvasive urinary bladder carcinoma: a multicentre study comparing the 1973 and 2004 World Health Organisation classifications. Eur Urol. 2010;57(5):850-8.
197. McEwen AE, Escobar DE, Gottardi CJ. Signaling from the adherens junction. Subcell Biochem. 2012;60:171-96.
198. Meertens L, Bertaux C, Cukierman L, Cormier E, Lavillette D, Cosset FL, Dragic T. The tight junction proteins claudin-1, -6, and -9 are entry cofactors for hepatitis C virus. J Virol. 2008;82(7):3555-60.
199. Mencia N, Selga E, Noe V, Ciudad CJ. Underexpression of miR-224 in methotrexate resistant human colon cancer cells. Biochemical pharmacology. 2011;82(11):1572-82.
200. Meng Z, Fu X, Chen X, Zeng S, Tian Y, Jove R, Xu R, Huang W. miR-194 is a marker of hepatic epithelial cells and suppresses metastasis of liver cancer cells in mice. Hepatology. 2010;52(6):2148-57.
201. Mensa L, Crespo G, Gastinger MJ, Kabat J, Perez-del-Pulgar S, Miquel R, Emerson SU, Purcell RH, Forns X. Hepatitis C virus receptors claudin-1 and occludin after liver transplantation and influence on early viral kinetics. Hepatology. 2011;53(5):1436-45.
202. Michl P, Buchholz M, Rolke M, Kunsch S, Lohr M, McClane B, Tsukita S, Leder G, Adler G, Gress TM. Claudin-4: a new target for pancreatic cancer treatment using Clostridium perfringens enterotoxin. Gastroenterology. 2001;121(3):678-84.
203. Michl P, Barth C, Buchholz M, Lerch MM, Rolke M, Holzmann KH, Menke A, Fensterer H, Giehl K, Lohr M, Leder G, Iwamura T, Adler G, Gress TM. Claudin-4 expression decreases invasiveness and metastatic potential of pancreatic cancer. Cancer Res. 2003;63(19):6265-71.
204. Michl P, Barth C, Buchholz M, Lerch MM, Rolke M, Holzmann KH, Menke A, Fensterer H, Giehl K, Lohr M, Leder G, Iwamura T, Adler G, Gress TM. Claudin-4 expression decreases invasiveness and metastatic potential of pancreatic cancer. Cancer Research. 2003;63(19):6265-71.
205. Mineta K, Yamamoto Y, Yamazaki Y, Tanaka H, Tada Y, Saito K, Tamura A, Igarashi M, Endo T, Takeuchi K, Tsukita S. Predicted expansion of the claudin multigene family. FEBS Lett. 2011;585(4):606-12.
206. Missiaglia E, Blaveri E, Terris B, Wang YH, Costello E, Neoptolemos JP, Crnogorac-Jurcevic T, Lemoine NR. Analysis of gene expression in cancer cell lines identifies candidate markers for pancreatic tumorigenesis and metastasis. International journal of cancer Journal international du cancer. 2004;112(1):100-12.
207. Miwa N, Furuse M, Tsukita S, Niikawa N, Nakamura Y, Furukawa Y. Involvement of claudin-1 in the β-catenin/Tcf signaling pathway and its frequent upregulation in human colorectal cancers. Oncology Research. 2001;12(11-12):469-76.
208. Miwa N, Furuse M, Tsukita S, Niikawa N, Nakamura Y, Furukawa Y. Involvement of claudin-1 in the β-catenin/Tcf signaling pathway and its frequent upregulation in human colorectal cancers. Oncology research. 2001;12(11-12):469-76.
209. Miyaaki H, Ichikawa T, Kamo Y, Taura N, Honda T, Shibata H, Milazzo M, Fornari F, Gramantieri L, Bolondi L, Nakao K. Significance of serum and hepatic microRNA-122 levels in patients with non-

alcoholic fatty liver disease. Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver. 2014;34(7):e302-7.
210. Miyamoto H, Brimo F, Schultz L, Ye H, Miller JS, Fajardo DA, Lee TK, Epstein JI, Netto GJ. Low-grade papillary urothelial carcinoma of the urinary bladder: a clinicopathologic analysis of a post-World Health Organization/International Society of Urological Pathology classification cohort from a single academic center. Arch Pathol Lab Med. 2010;134(8):1160-3.
211. Moldvay J, Jackel M, Paska C, Soltesz I, Schaff Z, Kiss A. Distinct claudin expression profile in histologic subtypes of lung cancer. Lung Cancer. 2007;57(2):159-67.
212. Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. Cell. 1982;31(1):11-24.
213. Monto A, Alonzo J, Watson JJ, Grunfeld C, Wright TL. Steatosis in chronic hepatitis C: relative contributions of obesity, diabetes mellitus, and alcohol. Hepatology. 2002;36(3):729-36.
214. Morita K, Furuse M, Fujimoto K, Tsukita S. Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999;96(2):511-6.
215. Morita K, Taketomi A, Shirabe K, Umeda K, Kayashima H, Ninomiya M, Uchiyama H, Soejima Y, Maehara Y. Clinical significance and potential of hepatic microRNA-122 expression in hepatitis C. Liver Int. 2011;31(4):474-84.
216. Munker R, Calin GA. MicroRNA profiling in cancer. Clin Sci (Lond). 2011;121(4):141-58.
217. Murakami Y, Yasuda T, Saigo K, Urashima T, Toyoda H, Okanoue T, Shimotohno K. Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues. Oncogene. 2006;25(17):2537-45.
218. Murakami Y, Tanaka M, Toyoda H, Hayashi K, Kuroda M, Tajima A, Shimotohno K. Hepatic microRNA expression is associated with the response to interferon treatment of chronic hepatitis C. BMC Med Genomics. 2010;3:48.
219. Musilova K, Mraz M. MicroRNAs in B-cell lymphomas: how a complex biology gets more complex. Leukemia. 2015;29(5):1004-17.
220. Nadarajah L, Khosravi M, Dumitriu S, Klootwijk E, Kleta R, Yaqoob MM, Walsh SB. A novel claudin-16 mutation, severe bone disease, and nephrocalcinosis. Lancet. 2014;383(9911):98.
221. Nakamuta M, Fujino T, Yada R, Aoyagi Y, Yasutake K, Kohjima M, Fukuizumi K, Yoshimoto T, Harada N, Yada M, Kato M, Kotoh K, Taketomi A, Maehara Y, Nakashima M, Enjoji M. Expression profiles of genes associated with viral entry in HCV-infected human liver. J Med Virol. 2011;83(5):921-7.
222. Nakanishi K, Ogata S, Hiroi S, Tominaga S, Aida S, Kawai T. Expression of occludin and claudins 1, 3, 4, and 7 in urothelial carcinoma of the upper urinary tract. AmJClinPathol. 2008;130(1):43-9.
223. Nakanishi K, Ogata S, Hiroi S, Tominaga S, Aida S, Kawai T. Expression of occludin and claudins 1, 3, 4, and 7 in urothelial carcinoma of the upper urinary tract. Am J Clin Pathol. 2008;130(1):43-9.
224. Nakayama F, Semba S, Usami Y, Chiba H, Sawada N, Yokozaki H. Hypermethylation-modulated downregulation of claudin-7 expression promotes the progression of colorectal carcinoma. Pathobiology. 2008;75(3):177-85.
225. Neesse A, Griesmann H, Gress T, Michl P. Claudin-4 as therapeutic target in cancer. Archives of biochemistry and biophysics. 2012;524(1):64-70.
226. Nemes B, Sarvary E, Gerlei Z, Fazakas J, Doros A, Nemeth A, Gorog D, Fehervari I, Mathe Z, Galffy Z, Par A, Schuller J, Telegdy L, Feher J, Lotz G, Schaff Z, Nagy P, Jaray J, Lengyel G. [The recurrence of hepatitis C virus after liver transplantation]. Orvosi hetilap. 2007;148(42):1971-9.
227. Nemeth Z, Szasz AM, Tatrai P, Nemeth J, Gyorffy H, Somoracz A, Szijarto A, Kupcsulik P, Kiss A, Schaff Z. Claudin-1, -2, -3, -4, -7, -8, and -10 protein expression in biliary tract cancers. The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society. 2009;57(2):113-21.
228. Nemeth Z, Szasz AM, Somoracz A, Tatrai P, Nemeth J, Gyorffy H, Szijarto A, Kupcsulik P, Kiss A, Schaff Z. Zonula occludens-1, occludin, and E-cadherin protein expression in biliary tract cancers. Pathology oncology research : POR. 2009;15(3):533-9.
229. Nichols LS, Ashfaq R, Iacobuzio-Donahue CA. Claudin 4 protein expression in primary and metastatic pancreatic cancer: support for use as a therapeutic target. American journal of clinical pathology. 2004;121(2):226-30.
230. Norman KL, Sarnow P. Hepatitis C virus' Achilles' heel--dependence on liver-specific microRNA miR-122. Cell Res. 2010;20(3):247-9.

231. Offner S, Hekele A, Teichmann U, Weinberger S, Gross S, Kufer P, Itin C, Baeuerle PA, Kohleisen B. Epithelial tight junction proteins as potential antibody targets for pancarcinoma therapy. Cancer Immunol Immunother. 2005;54(5):431-45.
232. Offner S, Hekele A, Teichmann U, Weinberger S, Gross S, Kufer P, Itin C, Baeuerle PA, Kohleisen B. Epithelial tight junction proteins as potential antibody targets for pancarcinoma therapy. Cancer Immunology Immunotherapy. 2005;54(5):431-45.
233. Ogawa T, Enomoto M, Fujii H, Sekiya Y, Yoshizato K, Ikeda K, Kawada N. MicroRNA-221/222 upregulation indicates the activation of stellate cells and the progression of liver fibrosis. Gut. 2012;61(11):1600-9.
234. Ohta Y, Sasaki Y, Saito M, Kushima M, Takimoto M, Shiokawa A, Ota H. Claudin-4 as a marker for distinguishing malignant mesothelioma from lung carcinoma and serous adenocarcinoma. International journal of surgical pathology. 2013;21(5):493-501.
235. Orci L, Malaisse-Lagae F, Amherdt M, Ravazzola M, Weisswange A, Dobbs R, Perrelet A, Unger R. Cell contacts in human islets of Langerhans. The Journal of clinical endocrinology and metabolism. 1975;41(5):841-4.
236. Oshima T, Kunisaki C, Yoshihara K, Yamada R, Yamamoto N, Sato T, Makino H, Yamagishi S, Nagano Y, Fujii S, Shiozawa M, Akaike M, Wada N, Rino Y, Masuda M, Tanaka K, Imada T. Reduced expression of the claudin-7 gene correlates with venous invasion and liver metastasis in colorectal cancer. Oncol Rep. 2008;19(4):953-9.
237. Ouban A, Ahmed AA. Claudins in human cancer: a review. Histology and histopathology. 2010;25(1):83-90.
238. Pan L, Chen J, Yu J, Yu H, Zhang M. The structure of the PDZ3-SH3-GuK tandem of ZO-1 protein suggests a supramodular organization of the membrane-associated guanylate kinase (MAGUK) family scaffold protein core. Journal of Biological Chemistry. 2011;286(46):40069-74.
239. Paschoud S, Bongiovanni M, Pache JC, Citi S. Claudin-1 and claudin-5 expression patterns differentiate lung squamous cell carcinomas from adenocarcinomas. Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc. 2007;20(9):947-54.
240. Patel SH, Kneuertz PJ, Delgado M, Kooby DA, Staley CA, 3rd, El-Rayes BF, Kauh JS, Sarmiento JM, Hanish S, Cohen C, Farris AB, 3rd, Maithel SK. Clinically relevant biomarkers to select patients for targeted inhibitor therapy after resection of hepatocellular carcinoma. Ann Surg Oncol. 2011;18(12):3384-90.
241. Patonai A, Erdelyi-Belle B, Korompay A, Somoracz A, Straub BK, Schirmacher P, Kovalszky I, Lotz G, Kiss A, Schaff Z. Claudins and tricellulin in fibrolamellar hepatocellular carcinoma. Virchows Archiv : an international journal of pathology. 2011;458(6):679-88.
242. Pedersen IM, Cheng G, Wieland S, Volinia S, Croce CM, Chisari FV, David M. Interferon modulation of cellular microRNAs as an antiviral mechanism. Nature. 2007;449(7164):919-22.
243. Petriella D, Galetta D, Rubini V, Savino E, Paradiso A, Simone G, Tommasi S. Molecular profiling of thin-prep FNA samples in assisting clinical management of non-small-cell lung cancer. Mol Biotechnol. 2013;54(3):913-9.
244. Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. Nucleic Acids Res. 2002;30(9):e36.
245. Pineau P, Volinia S, McJunkin K, Marchio A, Battiston C, Terris B, Mazzaferro V, Lowe SW, Croce CM, Dejean A. miR-221 overexpression contributes to liver tumorigenesis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010;107(1):264-9.
246. Ploss A, Evans MJ, Gaysinskaya VA, Panis M, You H, de Jong YP, Rice CM. Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. Nature. 2009;457(7231):882-6.
247. Porcell AI, De Young BR, Proca DM, Frankel WL. Immunohistochemical analysis of hepatocellular and adenocarcinoma in the liver: MOC31 compares favorably with other putative markers. Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc. 2000;13(7):773-8.
248. Rahner C, Mitic LL, Anderson JM. Heterogeneity in expression and subcellular localization of claudins 2, 3, 4, and 5 in the rat liver, pancreas, and gut. Gastroenterology. 2001;120(2):411-22.
249. Randall G, Panis M, Cooper JD, Tellinghuisen TL, Sukhodolets KE, Pfeffer S, Landthaler M, Landgraf P, Kan S, Lindenbach BD, Chien M, Weir DB, Russo JJ, Ju J, Brownstein MJ, Sheridan R, Sander C, Zavolan M, Tuschl T, Rice CM. Cellular cofactors affecting hepatitis C virus infection and replication. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007;104(31):12884-9.

250. Rangel LB, Agarwal R, D'Souza T, Pizer ES, Alo PL, Lancaster WD, Gregoire L, Schwartz DR, Cho KR, Morin PJ. Tight junction proteins claudin-3 and claudin-4 are frequently overexpressed in ovarian cancer but not in ovarian cystadenomas. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2003;9(7):2567-75.
251. Rangel LB, Agarwal R, D'Souza T, Pizer ES, Alò PL, Lancaster WD, Gregoire L, Schwartz DR, Cho KR, Morin PJ. Tight junction proteins claudin-3 and claudin-4 are frequently overexpressed in ovarian cancer but not in ovarian cystadenomas. Clinical Cancer Research. 2003;9(7):2567-75.
252. Ratziu V, Trabut JB, Poynard T. Fat, diabetes, and liver injury in chronic hepatitis C. Curr Gastroenterol Rep. 2004;6(1):22-9.
253. Resnick MB, Konkin T, Routhier J, Sabo E, Pricolo VE. Claudin-1 is a strong prognostic indicator in stage II colonic cancer: a tissue microarray study. Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc. 2005;18(4):511-8.
254. Resnick MB, Konkin T, Routhier J, Sabo E, Pricolo VE. Claudin-1 is a strong prognostic indicator in stage II colonic cancer: a tissue microarray study. Modern pathology. 2005;18(4):511-8.
255. Reynolds GM, Harris HJ, Jennings A, Hu K, Grove J, Lalor PF, Adams DH, Balfe P, Hubscher SG, McKeating JA. Hepatitis C virus receptor expression in normal and diseased liver tissue. Hepatology. 2008;47(2):418-27.
256. Riazuddin S, Ahmed ZM, Fanning AS, Lagziel A, Kitajiri S, Ramzan K, Khan SN, Chattaraj P, Friedman PL, Anderson JM, Belyantseva IA, Forge A, Friedman TB. Tricellulin is a tight-junction protein necessary for hearing. Am J Hum Genet. 2006;79(6):1040-51.
257. Riesewijk A, Martin J, van Os R, Horcajadas JA, Polman J, Pellicer A, Mosselman S, Simon C. Gene expression profiling of human endometrial receptivity on days LH+2 versus LH+7 by microarray technology. Molecular human reproduction. 2003;9(5):253-64.
258. Riesz P, Szekely E, Torzsok P, Majoros A, Szendroi A, Dombovari P, Romics I. [Can inverted papilloma in urinary bladder be considered as a benign tumor]. OrvHetil. 2010;151(3):92-5.
259. Rong M, Chen G, Dang Y. Increased miR-221 expression in hepatocellular carcinoma tissues and its role in enhancing cell growth and inhibiting apoptosis in vitro. BMC cancer. 2013;13:21.
260. Rosenthal R, Milatz S, Krug SM, Oelrich B, Schulzke JD, Amasheh S, Gunzel D, Fromm M. Claudin-2, a component of the tight junction, forms a paracellular water channel. Journal of cell science. 2010;123(Pt 11):1913-21.
261. Rosmorduc O, Fartoux L. HCC and NASH: how strong is the clinical demonstration? Clin Res Hepatol Gastroenterol. 2012;36(3):202-8.
262. Sakaguchi T, Gu X, Golden HM, Suh E, Rhoads DB, Reinecker HC. Cloning of the human claudin-2 5'-flanking region revealed a TATA-less promoter with conserved binding sites in mouse and human for caudal-related homeodomain proteins and hepatocyte nuclear factor-1alpha. J Biol Chem. 2002;277(24):21361-70.
263. Sanada Y, Oue N, Mitani Y, Yoshida K, Nakayama H, Yasui W. Down-regulation of the claudin-18 gene, identified through serial analysis of gene expression data analysis, in gastric cancer with an intestinal phenotype. J Pathol. 2006;208(5):633-42.
264. Santin AD, Zhan F, Cane S, Bellone S, Palmieri M, Thomas M, Burnett A, Roman JJ, Cannon MJ, Shaughnessy J, Jr., Pecorelli S. Gene expression fingerprint of uterine serous papillary carcinoma: identification of novel molecular markers for uterine serous cancer diagnosis and therapy. British journal of cancer. 2005;92(8):1561-73.
265. Sarasin-Filipowicz M. Interferon therapy of hepatitis C: molecular insights into success and failure. Swiss Med Wkly. 2010;140(1-2):3-11.
266. Sarasin-Filipowicz M, Krol J, Markiewicz I, Heim MH, Filipowicz W. Decreased levels of microRNA miR-122 in individuals with hepatitis C responding poorly to interferon therapy. Nat Med. 2009;15(1):31-3.
267. Sato N, Fukushima N, Maitra A, Iacobuzio-Donahue CA, van Heek NT, Cameron JL, Yeo CJ, Hruban RH, Goggins M. Gene expression profiling identifies genes associated with invasive intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. Am J Pathol. 2004;164(3):903-14.
268. Schickel R, Boyerinas B, Park SM, Peter ME. MicroRNAs: key players in the immune system, differentiation, tumorigenesis and cell death. Oncogene. 2008;27(45):5959-74.
269. Schlachter K, Gyugos M, Halasz J, Lendvai G, Baghy K, Garami M, Gyongyosi B, Schaff Z, Kiss A. High Tricellulin Expression Is Associated With Better Survival In Human Hepatoblastoma. Histopathology. 2014.

270. Schluter H, Wepf R, Moll I, Franke WW. Sealing the live part of the skin: The integrated meshwork of desmosomes, tight junctions and curvilinear ridge structures in the cells of the uppermost granular layer of the human epidermis. European Journal of Cell Biology. 2004;83(11):655-65.
271. Schmelzer E, Wauthier E, Reid LM. The phenotypes of pluripotent human hepatic progenitors. Stem Cells. 2006;24(8):1852-8.
272. Schmelzer E, Zhang L, Bruce A, Wauthier E, Ludlow J, Yao HL, Moss N, Melhem A, McClelland R, Turner W, Kulik M, Sherwood S, Tallheden T, Cheng N, Furth ME, Reid LM. Human hepatic stem cells from fetal and postnatal donors. The Journal of experimental medicine. 2007;204(8):1973-87.
273. Scisciani C, Vossio S, Guerrieri F, Schinzari V, De Iaco R, D'Onorio de Meo P, Cervello M, Montalto G, Pollicino T, Raimondo G, Levrero M, Pediconi N. Transcriptional regulation of miR-224 upregulated in human HCCs by NFkappaB inflammatory pathways. J Hepatol. 2012;56(4):855-61.
274. Sheehan GM, Kallakury BV, Sheehan CE, Fisher HA, Kaufman RP, Jr., Ross JS. Loss of claudins-1 and -7 and expression of claudins-3 and -4 correlate with prognostic variables in prostatic adenocarcinomas. Hum Pathol. 2007;38(4):564-9.
275. Shen SN, Wang LF, Jia YF, Hao YQ, Zhang L, Wang H. Upregulation of microRNA-224 is associated with aggressive progression and poor prognosis in human cervical cancer. Diagn Pathol. 2013;8:69.
276. Shenouda SK, Alahari SK. MicroRNA function in cancer: oncogene or a tumor suppressor? Cancer Metastasis Rev. 2009;28(3-4):369-78.
277. Sherman ME, Bur ME, Kurman RJ. p53 in endometrial cancer and its putative precursors: evidence for diverse pathways of tumorigenesis. Human pathology. 1995;26(11):1268-74.
278. Shimakami T, Yamane D, Jangra RK, Kempf BJ, Spaniel C, Barton DJ, Lemon SM. Stabilization of hepatitis C virus RNA by an Ago2-miR-122 complex. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012;109(3):941-6.
279. Shin HI, Kim BH, Chang HS, Kim CI, Jung HR, Park CH. Expression of claudin-1 and -7 in clear cell renal cell carcinoma and its clinical significance. Korean journal of urology. 2011;52(5):317-22.
280. Sobel G, Paska C, Szabo I, Kiss A, Kadar A, Schaff Z. Increased expression of claudins in cervical squamous intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma. Human pathology. 2005;36(2):162-9.
281. Sobel G, Nemeth J, Kiss A, Lotz G, Szabo I, Udvarhelyi N, Schaff Z, Paska C. Claudin 1 differentiates endometrioid and serous papillary endometrial adenocarcinoma. Gynecologic oncology. 2006;103(2):591-8.
282. Soini Y. Claudins 2, 3, 4, and 5 in Paget's disease and breast carcinoma. Human pathology. 2004;35(12):1531-6.
283. Soini Y. Expression of claudins 1, 2, 3, 4, 5 and 7 in various types of tumours. Histopathology. 2005;46(5):551-60.
284. Soini Y. Tight junctions in lung cancer and lung metastasis: a review. Int J Clin Exp Pathol. 2012;5(2):126-36.
285. Soini Y, Tommola S, Helin H, Martikainen P. Claudins 1, 3, 4 and 5 in gastric carcinoma, loss of claudin expression associates with the diffuse subtype. Virchows Archiv : an international journal of pathology. 2006;448(1):52-8.
286. Soini Y, Kinnula V, Kahlos K, Paakko P. Claudins in differential diagnosis between mesothelioma and metastatic adenocarcinoma of the pleura. Journal of clinical pathology. 2006;59(3):250-4.
287. Somoracz A, Korompay A, Torzsok P, Patonai A, Erdelyi-Belle B, Lotz G, Schaff Z, Kiss A. Tricellulin Expression and its Prognostic Significance in Primary Liver Carcinomas. Pathology oncology research : POR. 2014.
288. Son S, Kojima T, Decaens C, Yamaguchi H, Ito T, Imamura M, Murata M, Tanaka S, Chiba H, Hirata K. Knockdown of tight junction protein claudin-2 prevents bile canalicular formation in WIF-B9 cells. Histochemistry and cell biology. 2009;131(3):411-24.
289. Sonoda N, Furuse M, Sasaki H, Yonemura S, Katahira J, Horiguchi Y, Tsukita S. Clostridium perfringens Enterotoxin Fragment Removes Specific Claudins from Tight Junction Strands Evidence for Direct Involvement of Claudins in Tight Junction Barrier. The Journal of cell biology. 1999;147(1):195-204.
290. Sonoda N, Furuse M, Sasaki H, Yonemura S, Katahira J, Horiguchi Y, Tsukita S. Clostridium perfringens enterotoxin fragment removes specific claudins from tight junction strands: Evidence for direct involvement of claudins in tight junction barrier. J Cell Biol. 1999;147(1):195-204.
291. Suh Y, Yoon CH, Kim RK, Lim EJ, Oh YS, Hwang SG, An S, Yoon G, Gye MC, Yi JM, Kim MJ, Lee SJ. Claudin-1 induces epithelial-mesenchymal transition through activation of the c-Abl-ERK signaling pathway in human liver cells. Oncogene. 2012.

292. Suzuki M, Kato-Nakano M, Kawamoto S, Furuya A, Abe Y, Misaka H, Kimoto N, Nakamura K, Ohta S, Ando H. Therapeutic antitumor efficacy of monoclonal antibody against Claudin-4 for pancreatic and ovarian cancers. Cancer Sci. 2009;100(9):1623-30.
293. Szabo I, Kiss A, Schaff Z, Sobel G. Claudins as diagnostic and prognostic markers in gynecological cancer. Histology and histopathology. 2009;24(12):1607-15.
294. Tabaries S, Dong Z, Annis M, Omeroglu A, Pepin F, Ouellet V, Russo C, Hassanain M, Metrakos P, Diaz Z. Claudin-2 is selectively enriched in and promotes the formation of breast cancer liver metastases through engagement of integrin complexes. Oncogene. 2011;30(11):1318-28.
295. Takaki Y, Hirai S, Manabe N, Izumi Y, Hirose T, Nakaya M, Suzuki A, Mizuno K, Akimoto K, Tsukita S, Shuin T, Ohno S. Dynamic changes in protein components of the tight junction during liver regeneration. Cell and tissue research. 2001;305(3):399-409.
296. Tamura A, Tsukita S. Paracellular barrier and channel functions of TJ claudins in organizing biological systems: advances in the field of barriology revealed in knockout mice. Seminars in cell & developmental biology. 2014;36:177-85.
297. Tardif KD, Waris G, Siddiqui A. Hepatitis C virus, ER stress, and oxidative stress. Trends Microbiol. 2005;13(4):159-63.
298. Terris B, Blaveri E, Crnogorac-Jurcevic T, Jones M, Missiaglia E, Ruszniewski P, Sauvanet A, Lemoine NR. Characterization of gene expression profiles in intraductal papillary-mucinous tumors of the pancreas. Am J Pathol. 2002;160(5):1745-54.
299. Terry S, Nie M, Matter K, Balda MS. Rho signaling and tight junction functions. Physiology (Bethesda). 2010;25(1):16-26.
300. Tokes AM, Kulka J, Paku S, Mathe M, Paska C, Lodi C, Kiss A, Schaff Z. The expression of five different claudins in invasive breast carcinomas: comparison of pT1pN1 and pT1pN0 tumors. Pathology, research and practice. 2005;201(8-9):537-44.
301. Tokes AM, Kulka J, Paku S, Szik A, Paska C, Novak PK, Szilak L, Kiss A, Bogi K, Schaff Z. Claudin-1, -3 and -4 proteins and mRNA expression in benign and malignant breast lesions: a research study. Breast cancer research : BCR. 2005;7(2):R296-305.
302. Tomasetti C, Vogelstein B. Cancer etiology. Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions. Science. 2015;347(6217):78-81.
303. Tombol Z, Szabo PM, Molnar V, Wiener Z, Tolgyesi G, Horanyi J, Riesz P, Reismann P, Patocs A, Liko I, Gaillard RC, Falus A, Racz K, Igaz P. Integrative molecular bioinformatics study of human adrenocortical tumors: microRNA, tissue-specific target prediction, and pathway analysis. Endocr Relat Cancer. 2009;16(3):895-906.
304. Torzsok P, Riesz P, Kenessey I, Szekely E, Somoracz A, Nyirady P, Romics I, Schaff Z, Lotz G, Kiss A. Claudins and ki-67: potential markers to differentiate low- and high-grade transitional cell carcinomas of the urinary bladder. The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society. 2011;59(11):1022-30.
305. Troyanovsky S. Adherens junction assembly. Adherens Junctions: from Molecular Mechanisms to Tissue Development and Disease: Springer; 2012. p. 89-108.
306. Tryndyak VP, Latendresse JR, Montgomery B, Ross SA, Beland FA, Rusyn I, Pogribny IP. Plasma microRNAs are sensitive indicators of inter-strain differences in the severity of liver injury induced in mice by a choline- and folate-deficient diet. Toxicol Appl Pharmacol. 2012;262(1):52-9.
307. Tsukahara M, Nagai H, Kamiakito T, Kawata H, Takayashiki N, Saito K, Tanaka A. Distinct expression patterns of claudin-1 and claudin-4 in intraductal papillary-mucinous tumors of the pancreas. Pathology international. 2005;55(2):63-9.
308. Tsukita S, Furuse M. Overcoming barriers in the study of tight junction functions: from occludin to claudin. Genes Cells. 1998;3(9):569-73.
309. Tsukita S, Furuse M. Pores in the wall: claudins constitute tight junction strands containing aqueous pores. The Journal of cell biology. 2000;149(1):13-6.
310. Tsukita S, Furuse M, Itoh M. Multifunctional strands in tight junctions. Nature reviews Molecular cell biology. 2001;2(4):285-93.
311. Tsukita S, Yamazaki Y, Katsuno T, Tamura A. Tight junction-based epithelial microenvironment and cell proliferation. Oncogene. 2008;27(55):6930-8.
312. Tsukita S, Katsuno T, Yamazaki Y, Umeda K, Tamura A, Tsukita S. Roles of ZO-1 and ZO-2 in establishment of the belt-like adherens and tight junctions with paracellular permselective barrier function. Annals of the New York Academy of Sciences. 2009;1165:44-52.

313. Ueda J, Semba S, Chiba H, Sawada N, Seo Y, Kasuga M, Yokozaki H. Heterogeneous expression of claudin-4 in human colorectal cancer: decreased claudin-4 expression at the invasive front correlates cancer invasion and metastasis. Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology. 2007;74(1):32-41.
314. van Grevenstein WM, Hofland LJ, Jeekel J, van Eijck CH. The expression of adhesion molecules and the influence of inflammatory cytokines on the adhesion of human pancreatic carcinoma cells to mesothelial monolayers. Pancreas. 2006;32(4):396-402.
315. Van Itallie C, Rahner C, Anderson JM. Regulated expression of claudin-4 decreases paracellular conductance through a selective decrease in sodium permeability. The Journal of clinical investigation. 2001;107(10):1319-27.
316. Van Itallie CM, Anderson JM. Claudin interactions in and out of the tight junction. Tissue barriers. 2013;1(3):e25247.
317. Van Itallie CM, Anderson JM. Architecture of tight junctions and principles of molecular composition. Semin Cell Dev Biol. 2014;36:157-65.
318. Van Itallie CM, Mitic LL, Anderson JM. Claudin-2 forms homodimers and is a component of a high molecular weight protein complex. The Journal of biological chemistry. 2011;286(5):3442-50.
319. Van Itallie CM, Holmes J, Bridges A, Anderson JM. Claudin-2-dependent changes in noncharged solute flux are mediated by the extracellular domains and require attachment to the PDZ-scaffold. Annals of the New York Academy of Sciences. 2009;1165:82-7.
320. Varley CL, Garthwaite MA, Cross W, Hinley J, Trejdosiewicz LK, Southgate J. PPARgamma-regulated tight junction development during human urothelial cytodifferentiation. JCell Physiol. 2006;208(2):407-17.
321. Varnholt H, Drebber U, Schulze F, Wedemeyer I, Schirmacher P, Dienes HP, Odenthal M. MicroRNA gene expression profile of hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma. Hepatology. 2008;47(4):1223-32.
322. Venugopal SK, Jiang J, Kim TH, Li Y, Wang SS, Torok NJ, Wu J, Zern MA. Liver fibrosis causes downregulation of miRNA-150 and miRNA-194 in hepatic stellate cells, and their overexpression causes decreased stellate cell activation. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2010;298(1):G101-6.
323. Vinciguerra M, Sgroi A, Veyrat-Durebex C, Rubbia-Brandt L, Buhler LH, Foti M. Unsaturated fatty acids inhibit the expression of tumor suppressor phosphatase and tensin homolog (PTEN) via microRNA-21 up-regulation in hepatocytes. Hepatology. 2009;49(4):1176-84.
324. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Jr., Kinzler KW. Cancer genome landscapes. Science. 2013;339(6127):1546-58.
325. von Frowein J, Pagel P, Kappler R, von Schweinitz D, Roscher A, Schmid I. MicroRNA-492 is processed from the keratin 19 gene and up-regulated in metastatic hepatoblastoma. Hepatology. 2011;53(3):833-42.
326. von Schweinitz D, Leuschner I, Gluer S, Pietsch T. Expression of cell adhesion molecules and common acute lymphoblastic leukaemia antigen in hepatoblastoma. Virchows Archiv : an international journal of pathology. 1996;429(4-5):235-41.
327. Waidmann O, Bihrer V, Pleli T, Farnik H, Berger A, Zeuzem S, Kronenberger B, Piiper A. Serum microRNA-122 levels in different groups of patients with chronic hepatitis B virus infection. J Viral Hepat. 2012;19(2):e58-65.
328. Wang X, Matsumoto H, Zhao X, Das SK, Paria BC. Embryonic signals direct the formation of tight junctional permeability barrier in the decidualizing stroma during embryo implantation. Journal of cell science. 2004;117(Pt 1):53-62.
329. Wang X, Tully O, Ngo B, Zitin M, Mullin JM. Epithelial tight junctional changes in colorectal cancer tissues. The Scientific World Journal. 2011;11:826-41.
330. Wang X, Chen J, Li F, Lin Y, Zhang X, Lv Z, Jiang J. MiR-214 inhibits cell growth in hepatocellular carcinoma through suppression of β-catenin. Biochem Biophys Res Commun. 2012;428(4):525-31.
331. Wang XW, Heegaard NH, Orum H. MicroRNAs in liver disease. Gastroenterology. 2012;142(7):1431-43.
332. Wang Y, Lee CG. MicroRNA and cancer--focus on apoptosis. J Cell Mol Med. 2009;13(1):12-23.
333. Wang Y, Lee CG. Role of miR-224 in hepatocellular carcinoma: a tool for possible therapeutic intervention? Epigenomics. 2011;3(2):235-43.
334. Wang Y, Ren J, Gao Y, Ma JZ, Toh HC, Chow P, Chung AY, Ooi LL, Lee CG. MicroRNA-224 targets SMAD family member 4 to promote cell proliferation and negatively influence patient survival. PLoS One. 2013;8(7):e68744.

335. Wang Y, Lee AT, Ma JZ, Wang J, Ren J, Yang Y, Tantoso E, Li KB, Ooi LL, Tan P, Lee CG. Profiling microRNA expression in hepatocellular carcinoma reveals microRNA-224 up-regulation and apoptosis inhibitor-5 as a microRNA-224-specific target. J Biol Chem. 2008;283(19):13205-15.
336. Wang Z, Wade P, Mandell KJ, Akyildiz A, Parkos CA, Mrsny RJ, Nusrat A. Raf 1 represses expression of the tight junction protein occludin via activation of the zinc-finger transcription factor slug. Oncogene. 2007;26(8):1222-30.
337. Ward SC, Huang J, Tickoo SK, Thung SN, Ladanyi M, Klimstra DS. Fibrolamellar carcinoma of the liver exhibits immunohistochemical evidence of both hepatocyte and bile duct differentiation. Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc. 2010;23(9):1180-90.
338. Wilhelm SM, Carter C, Tang L, Wilkie D, McNabola A, Rong H, Chen C, Zhang X, Vincent P, McHugh M, Cao Y, Shujath J, Gawlak S, Eveleigh D, Rowley B, Liu L, Adnane L, Lynch M, Auclair D, Taylor I, Gedrich R, Voznesensky A, Riedl B, Post LE, Bollag G, Trail PA. BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. Cancer Res. 2004;64(19):7099-109.
339. Wong QW, Ching AK, Chan AW, Choy KW, To KF, Lai PB, Wong N. MiR-222 overexpression confers cell migratory advantages in hepatocellular carcinoma through enhancing AKT signaling. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2010;16(3):867-75.
340. Wu W, Takanashi M, Borjigin N, Ohno SI, Fujita K, Hoshino S, Osaka Y, Tsuchida A, Kuroda M. MicroRNA-18a modulates STAT3 activity through negative regulation of PIAS3 during gastric adenocarcinogenesis. Br J Cancer. 2013;108(3):653-61.
341. Xu T, Zhu Y, Xiong Y, Ge YY, Yun JP, Zhuang SM. MicroRNA-195 suppresses tumorigenicity and regulates G1/S transition of human hepatocellular carcinoma cells. Hepatology. 2009;50(1):113-21.
342. Yamamoto T, Kojima T, Murata M, Takano K, Go M, Chiba H, Sawada N. IL-1beta regulates expression of Cx32, occludin, and claudin-2 of rat hepatocytes via distinct signal transduction pathways. Experimental cell research. 2004;299(2):427-41.
343. Yamashita M, Iida M, Tada M, Shirasago Y, Fukasawa M, Nagase S, Watari A, Ishii-Watabe A, Yagi K, Kondoh M. Discovery of anti-claudin-1 antibodies as candidate therapeutics against hepatitis C virus. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics. 2015;353(1):112-8.
344. Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, Seike M, Kumamoto K, Yi M, Stephens RM, Okamoto A, Yokota J, Tanaka T, Calin GA, Liu CG, Croce CM, Harris CC. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. Cancer Cell. 2006;9(3):189-98.
345. Yang F, Li QJ, Gong ZB, Zhou L, You N, Wang S, Li XL, Li JJ, An JZ, Wang DS, He Y, Dou KF. MicroRNA-34a Targets Bcl-2 and Sensitizes Human Hepatocellular Carcinoma Cells to sorafenib Treatment. Technol Cancer Res Treat. 2013.
346. Yoon CH, Kim MJ, Park MJ, Park IC, Hwang SG, An S, Choi YH, Yoon G, Lee SJ. Claudin-1 acts through c-Abl-protein kinase Cdelta (PKCdelta) signaling and has a causal role in the acquisition of invasive capacity in human liver cells. The Journal of biological chemistry. 2010;285(1):226-33.
347. Yoshida T, Kinugasa T, Akagi Y, Kawahara A, Romeo K, Shiratsuchi I, Ryu Y, Gotanda Y, Shirouzu K. Decreased expression of claudin-1 in rectal cancer: a factor for recurrence and poor prognosis. Anticancer research. 2011;31(7):2517-25.
348. Yovchev MI, Grozdanov PN, Joseph B, Gupta S, Dabeva MD. Novel hepatic progenitor cell surface markers in the adult rat liver. Hepatology. 2007;45(1):139-49.
349. Yu AS. Claudins and the kidney. J Am Soc Nephrol. 2015;26(1):11-9.
350. Zeng X, Lin Y, Yin C, Zhang X, Ning BF, Zhang Q, Zhang JP, Qiu L, Qin XR, Chen YX. Recombinant adenovirus carrying the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene inhibits hepatocellular carcinoma xenograft growth in mice. Hepatology. 2011;54(6):2036-47.
351. Zhang C, Han L, Zhang A, Yang W, Zhou X, Pu P, Du Y, Zeng H, Kang C. Global changes of mRNA expression reveals an increased activity of the interferon-induced signal transducer and activator of transcription (STAT) pathway by repression of miR-221/222 in glioblastoma U251 cells. Int J Oncol. 2010;36(6):1503-12.
352. Zhang Y, Takahashi S, Tasaka A, Yoshima T, Ochi H, Chayama K. Involvement of microRNA-224 in cell proliferation, migration, invasion, and anti-apoptosis in hepatocellular carcinoma. J Gastroenterol Hepatol. 2013;28(3):565-75.
353. Zhao H, Wang D, Du W, Gu D, Yang R. MicroRNA and leukemia: tiny molecule, great function. Crit Rev Oncol Hematol. 2010;74(3):149-55.

354. Zheng A, Yuan F, Li Y, Zhu F, Hou P, Li J, Song X, Ding M, Deng H. Claudin-6 and claudin-9 function as additional coreceptors for hepatitis C virus. J Virol. 2007;81(22):12465-71.
355. Zheng L, Lv GC, Sheng J, Yang YD. Effect of miRNA-10b in regulating cellular steatosis level by targeting PPAR-alpha expression, a novel mechanism for the pathogenesis of NAFLD. J Gastroenterol Hepatol. 2010;25(1):156-63.
356. Zhu Q, Wang Z, Hu Y, Li J, Li X, Zhou L, Huang Y. miR-21 promotes migration and invasion by the miR-21-PDCD4-AP-1 feedback loop in human hepatocellular carcinoma. Oncology reports. 2012;27(5):1660-8.
357. Zhu W, Xu B. MicroRNA-21 identified as predictor of cancer outcome: a meta-analysis. PloS one. 2014;9(8):e103373.