

Tricellulin és epigenetikus változások vizsgálata humán epitheliális hepatoblastomában

Doktori értekezés

Dr. Schlachter Krisztina

Semmelweis Egyetem
Patológiai Tudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Schaff Zsuzsa, az MTA levelező tagja, professzor emerita

Hivatalos bírálók: Dr. Kovács Gábor, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Szekeres György, Ph.D., egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Sági Zoltán, Ph.D., egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Bodánszky Hedvig, egyetemi tanár
Dr. Simon Károly, Ph.D., osztályvezető főorvos

Budapest
2015

1 TARTALOMJEGYZÉK

1	TARTALOMJEGYZÉK	2
2	RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
3	BEVEZETÉS	10
3.1	Gyermekkori májdaganatok.....	10
3.2	Hepatoblastoma	13
3.2.1	Incidencia.....	14
3.2.2	Etiopatogenezis.....	15
3.2.3	Szövettani felosztás	17
3.2.4	Kezelési stratégia.....	22
3.3	Sejtkapcsoló struktúrák és TAMP fehérjék	23
3.3.1	Tight junction	24
3.3.2	Occludin (OCLN).....	27
3.3.3	Tricellulin (TRIC)	27
3.4	Epigenetikus reguláció.....	29
3.4.1	Hisztón modifikáció és EZH2 (enhancer of zeste homolog 2) szerepe....	30
3.5	Az Argináz szerepe és jelentősége.....	33
4	CÉLKITŰZÉSEK	35
5	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	36
5.1	Betegek és szövetminták.....	36
5.2	Szövettani és hisztokémiai vizsgálatok.....	39
5.2.1	Immunhisztokémia	39
5.2.2	Immunfluoreszcens vizsgálatok	44
5.3	Statisztikai módszerek	45
5.4	Egyéb módszerek	45
6	EREDMÉNYEK	47
6.1	Immunhisztokémiai vizsgálatok és statisztikai analízis eredményei	47
6.1.1	Argináz-1, β-catenin, EZH2 és tricellulin fehérjék expressziójának vizsgálata immunhisztokémiai módszerrel a tumormentes, környező májmintákon..	47
6.1.2	Tricellulin expressziójának vizsgálata humán hepatoblastomában.....	48
6.1.3	Tricellulin vizsgálata sejtvonalakban	53

6.1.4	EZH2 immunreakció humán hepatoblastomában.....	55
6.1.5	Argináz-1 és β-catenin expressziója humán hepatoblastomában	58
6.1.6	Hepatoblastoma esetek utánkötése	62
6.2	Fetális májak immunhisztokémiai és immunfluoreszcens vizsgálata.....	67
7	MEGBESZÉLÉS.....	76
8	KÖVETKEZTETÉSEK	89
9	ÖSSZEFOGLALÁS.....	91
10	SUMMARY	92
11	IRODALOMJEGYZÉK.....	93
12	SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE.....	118
13	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	119

2 RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

Rövidítés	Magyarázat és feloldás
AFP	Alpha- fetoprotein
AJ	Adherens junkció (Adherens junction)
AKT	Aktivált kináz (Activated kinase)
AML-M7	Akut myeloid leukémia 7 (Acut myeloid leukaemia 7)
APC	Adenomatous polyposis coli
ADRB 2	Adrenoreceptor β 2
Bax	B sejt limfómával asszociált X fehérje (Bcl-2-associated X protein)
BCL-2	B sejt limfóma 2 (B-cell lymphoma 2/B-cell CLL)
bTJ	Bicelluláris Tight Junction (Bicellular Tight Junction)
BMI 1	B-sejt specifikus murine leukémia vírus 1 –es integrációs hely (B cell –specific moloney murine leukemia virus integration site 1)
BMP	Csont morfogenetikus fehérje (Bone morphogenetic protein)
CTNNB-1	Cadherin asszociált protein; β -catenin (Cadherin associated protein beta 1)
COG	Children's Oncology Group
CLDN-	Claudin-
CAR	Coxsackie -és adenovírus receptor (Coxsackievirus and adenovirus receptor)
CBX2	Chromobox fehérje 2 (Chromobox Homolog protein 2)
CC	Cholangiocarcinoma

CDK 1-2	Cyclin-dependens kináz 1, 2 (Cyclin-dependent kinase 1, 2)
CDH 1	Cadherin 1, E-cadherin (Cadherin 1, epithelial cadherin)
CEA	Carcino-embriónális antigén (Carcinoembryonic antigen)
CK-19	Citokeratin- 19 (Cytokeratin- 19)
DSRCT	Dezmoplasztikus kis kereksejtes tumor (Desmoplastic small-round-cell tumor)
DAB2IP	Mitogén aktivált foszfoprotein 2 kapcsolt fehérje (Disabled homolog 2-interacting protein)
DFNB42	Autoszómális recesszív sükettség – B42 (Autosomal-Recessive Hearing Impairment-B42)
DKK 1	Dickkopf fehérje 1 (Dickkopf-related protein 1)
DLK 1	Delta like fehérje 1 (Delta like protein 1)
DZNep	3-Deazaneplanocin A
ECM	Extracelluláris mátrix (Extracellular matrix)
EED	Embriónális ectodermális fejlődés (Embryonic ectoderm development)
EFS	Esemény mentes túlélés (Event-free survival)
EMT	Epithelialis-mezenchymális tranzíció (Epithelial mesenchymal transition)
ESAM	Endothel sejt szelektív adhéziós molekula (Endothelial cell-selective adhesion molecule)
EZH2	Enhancer of zeste homolog 2

EWS-FLI	Ewing szarkóma –Friend leukémia integrált transzkripció faktor 1 (Ewing's sarcoma- Friend leukemia integration 1 transcription factor)
FAP	Familiáris adenomatosus polyposis (Familial adenomatous polyposis)
FLC	Fibrolamelláris hepatocelluláris carcinoma (Fibrolamellar hepatocellular carcinoma)
GK	Guanilát kináz (Guanylate kinase)
GLI 1	Glioma-asszociált onkogén homológ 1 (Glioma-associated oncogene homolog 1)
GNRH	Gonadotrop szabályozó hormon (Gonadotropin releasing hormon)
HB	Hepatoblastoma
HBV	Hepatitis B vírus (Hepatitis B virus)
HCC	Hepatocellularis carcinoma (Hepatocellular carcinoma)
hCG	Humán chorio gonadotropin (Human chorionic gonadotropin)
HCV	Hepatitis C vírus (Hepatitis C virus)
HepPar 1	Hepatocytá paraffin 1 (hepatocyte paraffin 1)
HH	Hedgehog útvonal (Hedgehog signaling pathway)
HIF 1 α	Hypoxia indukált faktor 1 α (Hypoxia-inducible factor 1 α)
HMGA 2	High mobility group AT-hook 2
HPH	Humán homológ polyhomeotic (Human polyhomeotic homolog)
ICC	Intrahepatikus cholangiocarcinoma (Intrahepatic cholangiocarcinoma)

IGF II	Inzulin-szerű növekedési faktor II (Insulin-like growth factor II)
IHC	Immunhisztokémia (Immunohistochemistry)
ILDR 1,2	Immunglobulin-szerű domént tartalmazó receptor 1,2 (immunoglobulin-like domain receptor 1,2)
INK4A-ARF	p16 (INK4A)-p19 (ARF)
INI 1	Integráz interaktor 1 (Integrase interactor1)
JAM-A, B, C	Junkcionális adhéziós molekula –A, B, C (Junctional adhesion molecule-A, B, C)
LSR	Lipolízis stimulált lipoprotein receptor (Lipolysis-stimulated lipoprotein receptor)
MAGUK	Membrán asszociált guanilát kináz (Membrane-associated guanylate kinase)
MAL	Mielinhez és limfocitákhoz asszociált fehérje (Myelin and lymphocyte protein)
MARVEL	MAL és hasonló fehérjék a vezikuláris transzportért és membránhoz kapcsolódásért (MAL and related proteins for vesicle trafficking and membrane link)
miR	mikroRNS (microRNA)
mRNS	Messenger RNS
MT1G	Metallothionein 1G fehérje (Metallothionein 1 G protein)
MUPP-1	Multi-PDZ domén fehérje-1 (Multi-PDZ domain protein 1)
NB	Neuroblastoma
NO	Nitrogén monoxid (Nitrogen monoxide)

NOS	Nem osztályozható (Not otherwise specified)
OCLN	Occludin
OS	Teljes túlélés (Overall Survival)
PAR-3, 6	Partitioning-defektív fehérje- 3, 6 (Partitioning-defective protein-3, 6)
PATJ	PALS1-asszociált TJ protein (PALS1-associated TJ protein)
PCNA	Proliferáló sejt nukleáris antigén (Proliferating cell nuclear antigen)
PDCA	Pancreas ductalis adenocarcinoma (Pancreatic ductal adenocarcinoma)
PEG 3	Paternalisan kifejeződő gén 3 fehérje (Paternally-expressed gene 3 protein)
PEG 10	Paternalisan kifejeződő gén 10 fehérje (Paternally-expressed gene 10 protein)
PI3K	Foszfatidil-inozitol-3 kináz (Phosphatidylinositol 3 kinase)
PLADO	Cisplatin és doxorubicin (Cisplatin and Doxorubicin)
PLAG-1	Pleomorf adenoma gén 1 (Pleiomorphic Adenoma Gene 1)
PLK-1	Polo-szerű kináz- 1 (Polo-like kinase-1)
pPNET	Perifériás primitív neuroektodermális tumor (Peripheral primitive neuroectodermal tumor)
PRC	Polycomb represszív komplex (Polycomb repressive complex)
PRETEXT	Kezelést megelőző tumorterjedelem (Pre-Treatment Extent of disease)
PTCH 1	Fehérjéhez kapcsolódó homológ 1 (Protein patched homolog 1)

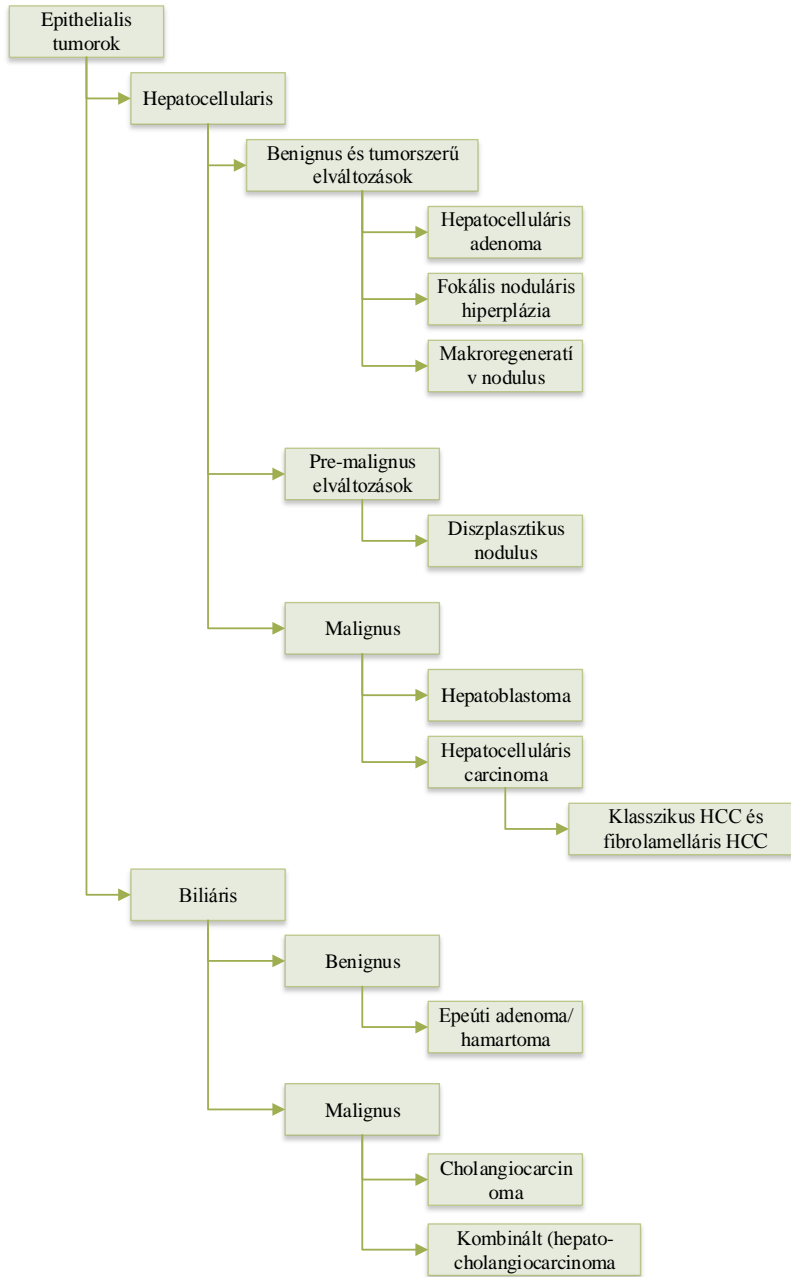
RBBP 4, 7	Retinoblastoma-kötő fehérje 4, 7 (Retinoblastoma binding protein 4, 7)
RING 1A	Gyűrű ujj fehérje 1A (Ring finger protein 1A)
RING 1B	Gyűrű ujj fehérje 1B (Ring finger protein 1B)
SMO	Smoothened fehérje (Smoothened protein)
SIOPEL	Gyermekekori májtumorok nemzetközi stratégiai csoportja (Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique – Epithelial Liver Tumor Study Group [International Childhood Liver Tumour Strategy Group])
SALL 4	Sal-szerű fehérje 4 (Sal-like protein 4)
SUZ 12	Supressor of zeste 12 fehérje
TJ	Sejtkapcsoló struktúra (Tight junction)
TAMP	Tight junction asszociált MARVEL protein (Tight junction associated MARVEL protein)
TNF	Tumor nekrosis faktor (Tumor necrosis factor)
TRIC	Tricellulin
tTJ	Tricelluláris Tight Junction
TGF α	Transzformáló növekedési faktor α (Transforming growth factor α)
ZO-1	Zonula occludens- 1

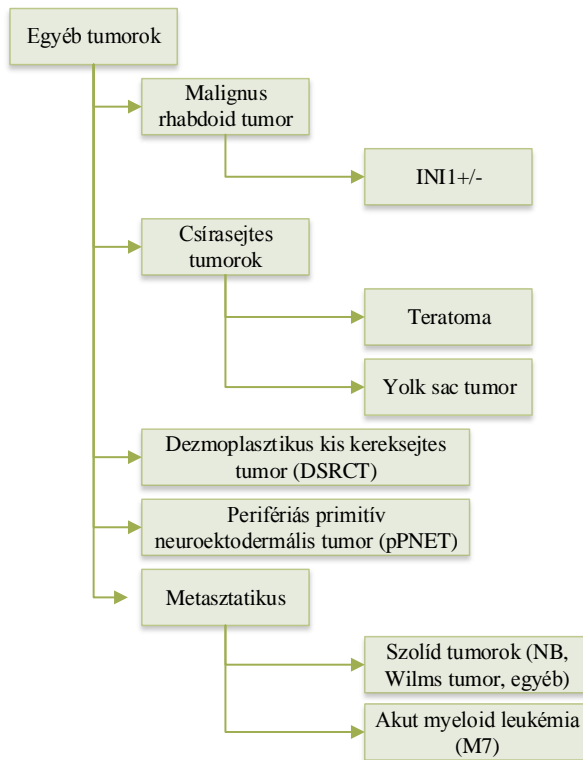
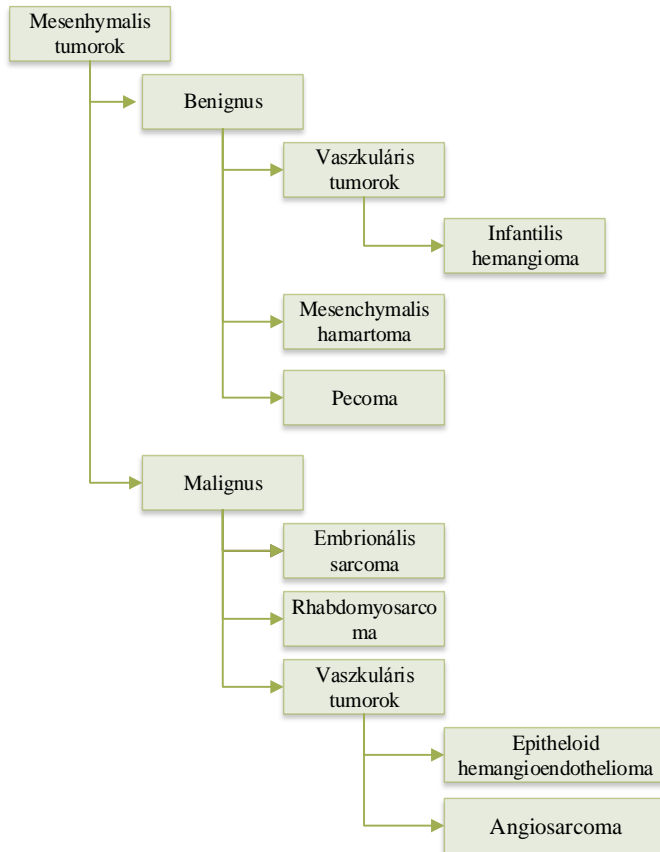
3 BEVEZETÉS

3.1 Gyermekkori májdaganatok

Magyarországon az 1-14 év közötti gyermekeknél a daganatos megbetegedések által okozott halálozás –a baleseteket nem számítva- a leggyakrabban előforduló halálok (Garami és mtsai 2014). A gyermekkori daganatos betegségek jelentős hányada – szemben a felnőttkoriakkal– sok esetben nagyon jó arányban gyógyítható (Last és mtsai 2005). Európában évente 100 000 gyermekre 12-15 újonnan diagnosztizált malignus megbetegedés jut (Ward és mtsai 2014). Gyermekkorban ritkák a primer májdaganatok, az összes szolid gyermekkori daganatnak csupán 1%-t adják. Világszerte egymillió 18 éven aluli gyermekből 1.5-2 esetet diagnosztizálnak (Hadzic és Finegold 2011). A gyermekkori májtumороk nagy része sporadikus, de előfordulnak családi tumoros szindrómákkal, metabolikus betegségekkel és egyéb prediszponáló faktorokkal -mint az extrém mértékű alultápláltság vagy a nagyon alacsony születési súly- társultak (Darbari és mtsai 2003). Napjainkban is nagy kihívást jelent a patológusok számára a gyermekkori májtumороk diagnosztizálása, osztályozása, tekintve ritka előfordulásukat. A gyermekkori májtumороk klasszifikációját az *1. táblázat* mutatja.

1. táblázat. Gyermekkori májtumороk klasszifikációja (*Lopez-Terrada és mtsai 2014*)





Számos tanulmány a gyermekkori tumorok -köztük a májtumorok- növekvő incidenciájáról számol be (Allan és mtsai 2014, Baade és mtsai 2010, Kaatsch 2010). Ezeknek a májtumoroknak 2/3-a malignus és 70%-a hepatocelluláris eredetű, mely hepatoblastoma (HB), vagy hepatocellularis carcinoma (HCC) (Hiyama 2013). Egy nagy esetszámú tanulmányban (n=73) leírtak alapján a vizsgált májtumorok 46 %-a HB, 23%-a HCC, 13%-a benignus vaszkuláris tumor, 6%-a mezenchymalis hamartoma, 6%-a sarcoma, 2%-a adenoma és FNH, 5% egyéb tumor formájában mutatkozott (Dezsofi és mtsai 2014). Újszülöttek esetében májtumor esetében a HB mellett gondolnunk kell hemangiómára, hemangioendotheliómára és mezenchymalis hamartómára. Serdülőknél inkább HCC jöhet szóba, főleg ha az anamnézisben szerepel biliáris atrézia, öröklött májbetegség vagy hepatitis B (HBV) vírus fertőzés (Hadzic és Finegold 2011, Savas és mtsai 2006).

A HB -a leggyakoribb primer gyermekkori malignus májtumor a nyugati országokban- incidenciája 1.6-2 eset/millió gyermek, szemben a HCC 0.29-0.45 eset/millió gyermek incidenciájával (Becker és mtsai 2015, Darbari és mtsai 2003). Kelet-Ázsia bizonyos részein (Kína, Korea, Fuji, Hong Kong) magasabb HCC incidenciáról számolnak be, ami a hepatitis B és C vírusfertőzés magas prevalenciájával magyarázható (Chen és mtsai 2009). Az elmúlt évtizedekben a HB egyre gyakrabban vizsgált daganattá vált, hiszen a csecsemőkorban és kisgyermekkorban előforduló tumorok esetében a neuroblastoma és nephroblastoma után a harmadik leggyakrabban előforduló daganat (Meyers és mtsai 2014).

3.2 Hepatoblastoma

Közel 100 évvel ezelőtt Professor Chiari, a Prágai Egyetem Patológia-Anatómia Intézetben közölte le elsőként egy 6 hetes csecsemő halálesete kapcsán az első diagnosztizált hepatoblastoma esetet, amit akkoriban 'teratoma hepatis' -ként írt le (OS 1898). 60 évvel később Willis vezette be a HB kifejezést (RA 1962).

A hepatoblastoma az esetek 80% -ban unifokálisan jelenik meg, a jobb lebeny érintettsége gyakoribb. Klinikailag általában tünetmentes, nagy hasi terimeként jelentkezik, hepatomegália tapintható, ugyanakkor néha akut has formájában jelentkezik lázzal együttesen. Súlyvesztés, fogyás, étvágytalanság, hányás, hasi fájdalom jelenléte

előrehaladott állapotot jelez. Obstrukciós sárgaság, esetleg a tumor ruptúrája ritkán fordulnak elő. Néhány esetben leírták a tumorhoz társuló pubertás precoc jelenlétét, hiszen a tumor képes a humán chorion gonadotropin termelésére (hCG), mely kivált GnRH független módon idő előtti pubertást (Al-Jumaily és mtsai 2011, Eren és mtsai 2009).

Laboratóriumi eltérések közül leggyakrabban normochrom, normocyter anémia, esetleg thrombocitózis fordulhat elő. A markáns tromboticózis oka a tumor által termelt interleukin-6 –mely a megakariociták növekedési faktora- paraneopláziás hatása. Az AFP szint a betegek 90%-ban emelkedett, újszülöttek esetében viszont a fiziológiásan magasabb AFP szint megtévesztő lehet, illetve bizonyos benignus májtumorokban, adenomában és mezenchymalis hamartomában is emelkedett AFP szintet észlelhetünk (Meyers és mtsai 2014). Egy nemrég leírt új diagnosztikus szérumszint marker, a DLK1 vizsgálata is indokolt lehet, hiszen a HB-ák 5-10%-a AFP negatív, illetve a 0-6 hónapos HB-s betegek korosztályában szignifikáns DLK1 szérumszint emelkedést írtak le a kontroll csoporthoz képest, míg ebben a korosztályban az AFP szintemelkedés nem volt szignifikáns (Falix és mtsai 2012). A DLK1 humán hepatoblastomákban való vizsgálatakor ezen kívül nagyon specifikus és szenzitív markernek bizonyult (Dezso és mtsai 2008)

A HB esetek 20%-ban a diagnózis felállításakor távoli metasztázis észlelhető, leggyakrabban a tüdőben és központi idegrendszerben, de vannak adatok a nagyon ritkán előforduló szembe adott metasztázisról is (Endo és mtsai 1996, Perilongo és mtsai 2000).

3.2.1 Incidencia

A HB a gyermekkori malignitások 1%-t teszi ki, 1992 és 2004 között a legnagyobb incidencia növekedést mutatta a gyermekkori tumorok között az USA-ban és Európában is (Becker és mtsai 2015, Linabery és Ross 2008). Az 5 éven aluli gyermekek esetében a májtumorok 91%-a HB, míg 5%-ban a 4 éven felüli korosztályban fordul elő. Incidenciája 0.05-0.15 eset/100 000 gyermek a 15 éven aluli korosztályban (Gupta és mtsai 2011, Hadzic és Finegold 2011). Számos tanulmány szerint 5 éves kor alatt diagnosztizálják leggyakrabban (átlagosan 18 hónapos korban), ezt követi az 5-9 és 10-14 éves korosztály, végül az esetek legkisebb része (<1%) fiatal felnőttkorban, illetve 15-19 évesen extrém ritkán kerül diagnosztizálásra (Hadzic és mtsai 2010, Singh és mtsai 2010). Az idősebb gyermekekben és fiatal felnőttekben prognózisa kifejezetten rosszabb,

mint az 1-5 éves korosztályban. Magyarországon évente 2-3 eset fordul elő (Magyar Gyermek Tumor Regiszter).

A HB ötször gyakrabban fordul elő fehér bőrűekben, mint afroamerikai gyermekekben, akikben rosszabb kimenetelre lehet számítani. Szintén gyakrabban érintettek a fiúgyermek, átlagosan a fiú-lány arány 1,7:1. Európában ez az arány magasabb 1,6-3,3:1, ahogy Taiwanon is 2,9:1 (Catanzarite és mtsai 2008).

3.2.2 Etiopatogenezis

A HB előfordulása erősen asszociált az igen kis súllyal (<1500 gramm) született újszülöttekben, mely a világ különböző pontjain egyaránt megfigyelhető (Dezsofi és mtsai 2014, Pu és mtsai 2009, Spector és mtsai 2008). A kis súlyú újszülötteknél (1500-2500 gramm) is gyakrabban fordul elő HB (Spector és mtsai 2004). Ezt az asszociációt azzal magyarázzák, hogy a kis súlyú újszülöttek ellátásuk során gyakran kapnak diagnosztikus céllal sugárterhelést, nagy dózisú oxigén terápiát illetve parenterális táplálást, melyek potenciális karcinogén behatásoknak tekinthetők (Chessex és mtsai 2010). Kimutatták, hogy a hepatoblastoma gyakrabban fordul elő pre-eclamsziás anyák gyermekeinél, poli- vagy oligohidramnion esetében, a terhesség előtt túlsúlyos anyáknál és infertilitás miatt kezelt anyáknál (Pu és mtsai 2009). Az anyai és apai dohányzás szerepe a HB kialakulásában még nem tisztázott, az bizonyos, hogy a dohányzásnak karcinogén szerepe van a HB kialakulásában (McLaughlin és mtsai 2006, Secretan és mtsai 2009). Fetális alkohol szindrómában is leírták a HB gyakoribb előfordulását (Spector és Birch 2012).

A HB-k 15%-a társul valamilyen genetikai szindrómához, míg a legtöbb eset sporadikus. Familiáris adenomatosus polyposis (FAP) szerepelhet a családi anamnézisben, írtak le csírasejtes adenomatosus polyposis coli (APC) mutációt HB esetekben (Hirschman és mtsai 2005). Ilyenkor ajánlott a család tagjainak kivizsgálása vastagbél polipok és daganat irányába. Az AFP-s családok gyermekeinek pedig ajánlott az évenkénti hasi ultrahang vizsgálat és 5 éves korukig az AFP szint ellenőrzése (Sanders és Furman 2006).

A hepatoblastoma társulhat Beckwith-Wiedemann szindrómához is (gigantizmus, makroglossia, omphalocele, hemihipertrophia, neonatális hipoglikémia, hasfali problémák), melyben a 11-es kromoszóma inzulinszerű növekedési faktor II (IGFII) és H19-es génjének apai uniparentális diszómiaja mutatható ki (Giardiello és mtsai 1991).

Az IGFII/H19 gén aktivációja szerepet játszik a HB patogenezisében (Honda és mtsai 2008).

Az irodalomban eddig hét HB eset előfordulását írták le Edwards szindrómás (18-as kromoszóma triszómia) betegekben (Kitanovski és mtsai 2009). Számos, öröklött szindrómához társulva is írtak le HB-s eseteket: Prader-Willi szindróma, Sotos szindróma, Kabuki szindróma, Di George szindróma, Noonan szindróma. Mivel az előbb felsorolt szindrómákhoz kapcsolódó HB-ból mindössze 1-2 esetet tartanak számon az irodalomban, így nem valószínű, hogy ezek a szindrómák meghatározó etiológiai tényezőként szerepelnek (Meyers és mtsai 2009).

Szintén nem túl gyakran, de társulhat anyagcsere megbetegedésekhez is a HB-így glikogéntárolási betegség Ia, III és IV típusához, hipoglikémiához, heterozigóta α -1 antitripszin deficienciához– és bizonyos congenitális malformációkhoz (patkóvese, Meckel divertikulum, vese diszplázia, rekeszsérv, perzisztáló ductus arteriosus). Számos citogenetikai elváltozást is írtak le HB-ban. A 2-es, 8-as és 20-as kromoszóma triszómiája és a 18-as kromoszóma monoszómiája a leggyakoribb eltérések. A 2-es és 20-as kromoszóma triszómiája rosszabb prognózissal jár (Kumon és mtsai 2001).

Számos, az embrionális fejlődésben fontos szignalizációs útvonal érintett HB-ban. A Wnt útvonal a HB-k többségében, 70-90%-ban aktiválódik, mely a β -catenin gén stabilizációjához vezet, és a sejtmagba jutva számos proliferációs és apoptózisban szerepet játszó gént aktivál. A Wnt aktiválódása bekövetkezhet magában a β -catenin génjében, a CTNNB1 génben lévő mutáció miatt -ami egyike a leginkább tanulmányozott genetikai eltérésnek HB-ban- vagy az útvonalban szerepet játszó egyéb molekulák mutációja miatt: ilyen az APC gén, az AXIN1 és az AXIN2 (Kappler és von Schweinitz 2012). Emellett a hedgehog (HH) útvonal aktiválódása is gyakori, a HB-k 2/3-ban számos HH ligand mRNS vagy fehérje szintű emelkedését leírták: BCL2, PTCH, GLI1 (Kappler és von Schweinitz 2012). A HH útvonal fontos szerepet játszik a neurogenézisben, szomatogenezisében, a bal-jobb asszimmetria kialakításában. Pozitív korrelációt is leírtak a GLI1 és egy másik HH ligand, a SMO szintje és a tumor grade, méret és prognóza között (Li és mtsai 2010). Néhány esetben beszámoltak a foszfatidil-inozitol-3 kináz kódoló PIK3CA gén pontmutációjáról, illetve a pleomorf adenoma gén 1 (PLAG1) amplifikációjáról, mely az IGFII pozitív regulátora (Zatkova és mtsai 2004). Az imprintinget szenvedett IGFII génje magas szintet mutat HB-ban, hasonló magas szint

található Wilms tumorban és rhabdomyosarcomában is (Rainier és mtsai 1995). Egyéb, szintén imprintinget szenvedett gének is nagymértékben expresszálódnak HB-ban: a DLK1, PEG3, PEG10, MEG3 gének, ezeket nephroblastomában is leírták (Hubertus és mtsai 2011).

3.2.3 Szöveti felosztás

A HB olyan hepatocytá prekurzorból ered, mely képes a májfejlődés különböző stádiumait reprezentálni, és a szöveti csoportok is ezt jelzik: (a) differenciálatlan kissejtes, melyek citokeratint és vimentint is kifejeznek, ami sem az epithelialis, sem a mezenchymális differenciálódásra nem jellemző; (b) embrionális epithelialis sejtek, melyek 6-8 hetes magzati májsejtekre emlékeztetnek; (c) jól differenciált fetális sejtek, melyeket nehéz elkülöníteni az érett májsejtektől.

A HB szöveti besorolása nem egyszerű feladat, egyrészt a tumor ritkasága, másrészt egy nemzetközileg is elfogadott és bevett klasszifikáció hiánya miatt. 2011-ben a Children's Oncology Group (COG) nemzetközi szimpóziumán megvitatásra került a gyermekkori májtumorok szöveti, és egy új szöveti klasszifikáció létrehozása. Céljuk volt egy olyan nemzetközi klasszifikáció létrehozása, melyben az egyes altípusok a kezelési stratégia és a szöveti együttes figyelembe vétele révén lettek felállítva, vagyis a szöveti szubtypusokba való sorolásnak prognosztikus jelentőséget tulajdoníthatunk. Figyelembe vették az újabban leírt molekuláris genetikai adatok meglétét is. A HB szöveti klasszifikációját a 2. táblázat mutatja.

2. táblázat. A hepatoblastomák szöveti klasszifikációja (Zimmermann 2005)

EPITHELIÁLIS TÍPUS
Fetális szubtypus
Embrionális szubtypus
Epithelialis kevert szubtypus
Makrotrabekuláris szubtypus
Kissejtes nem differenciált szubtypus
KEVERT EPITHELIÁLIS ÉS MEZENCHYMALIS TÍPUS
Teratoid elemeket tartalmazó szubtypus
Teratoid elemeket nem tartalmazó szubtypus
NEM OSZTÁLYOZHATÓ TÍPUSOK

A hepatoblastoma szövettani felosztását 2014-ben frissítették, számos új kategóriát létrehozva (Lopez-Terrada és mtsai 2014). A hepatoblastoma eseteinkkel kapcsolatos vizsgálataink 2013-ban lezárultak, így a korábbi, fent leírt klasszifikációt vettük alapul.

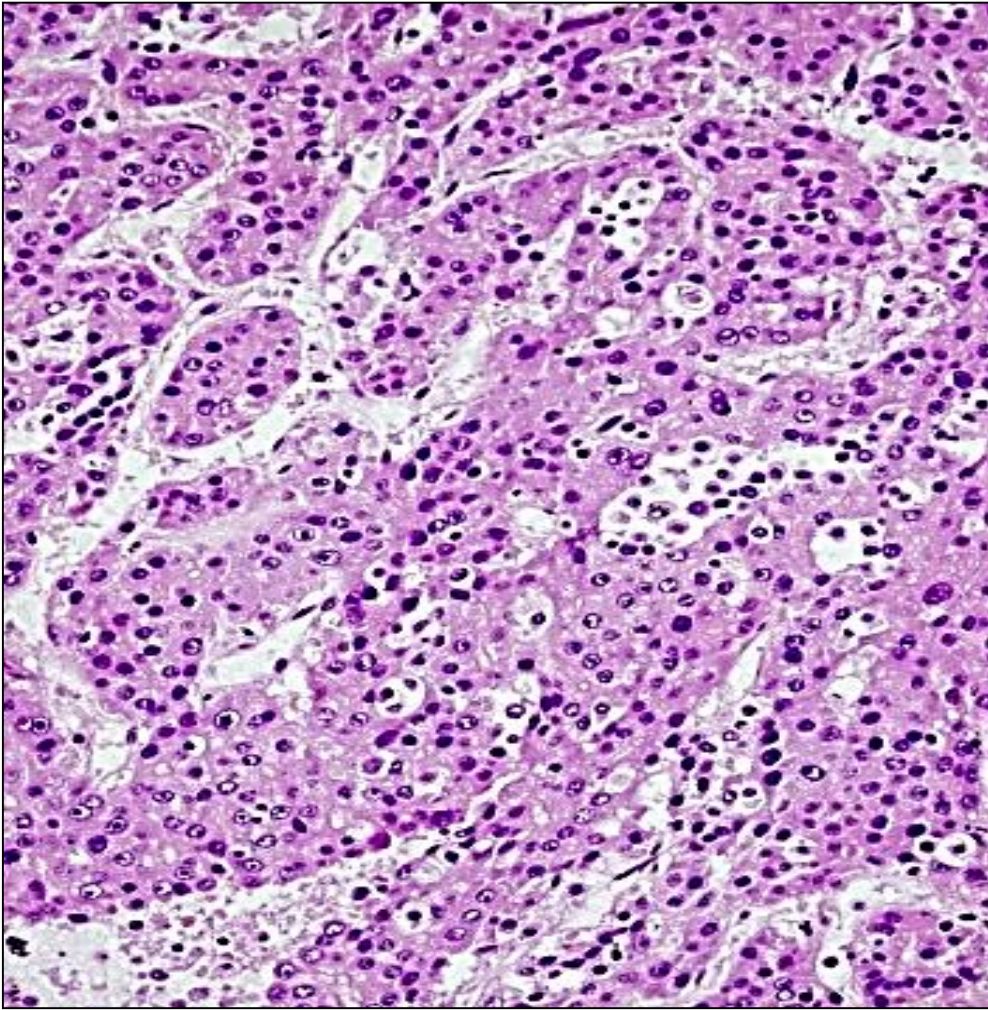
❖ EPITHELIÁLIS SZÖVETTANI TÍPUS

➤ Fetális szubtypus

A fetális HB-t 10-20 mikron átmérőjű sejtek építik fel, melyek elhelyezkedhetnek 1-2 sejtsor vastagságú kötegeket alkotva, vagy pedig nodulusokban, kisebb mezőkben helyezkedhetnek el. A sejteknek centrális, kerek, kis sejtmagja van, alig észrevehető a sejtmagvacska, jól körülhatárolódnak a plazma membránok, nagyon nehéz elkülöníteni a normál fetális hepatocytáktól ezeket a sejteket. A glikogén vagy lipid tartalomtól függően a citoplazma lehet világos vagy eosinophil. Gyakran láthatunk hemopoetikus prekurzor elemeket (extramedullaris vérképzés).

Az újabb, 2014-es klasszifikáció a fetális HB-t három csoportra bontja: tisztán fetális szubtypus alacsony mitotikus aktivitással; mitotikusan aktív fetális szubtypus; fetális pleomorf, rosszul differenciált szubtypus. Az elsőként leírt szubtypus felismerése nagy jelentőséggel bír, hiszen ez az egyetlen, ahol a komplett sebészi rezekció elégséges, nincs szükség kemoterápiára.

A hepatoblastoma fetális komponensét az *1. ábra* mutatja be.

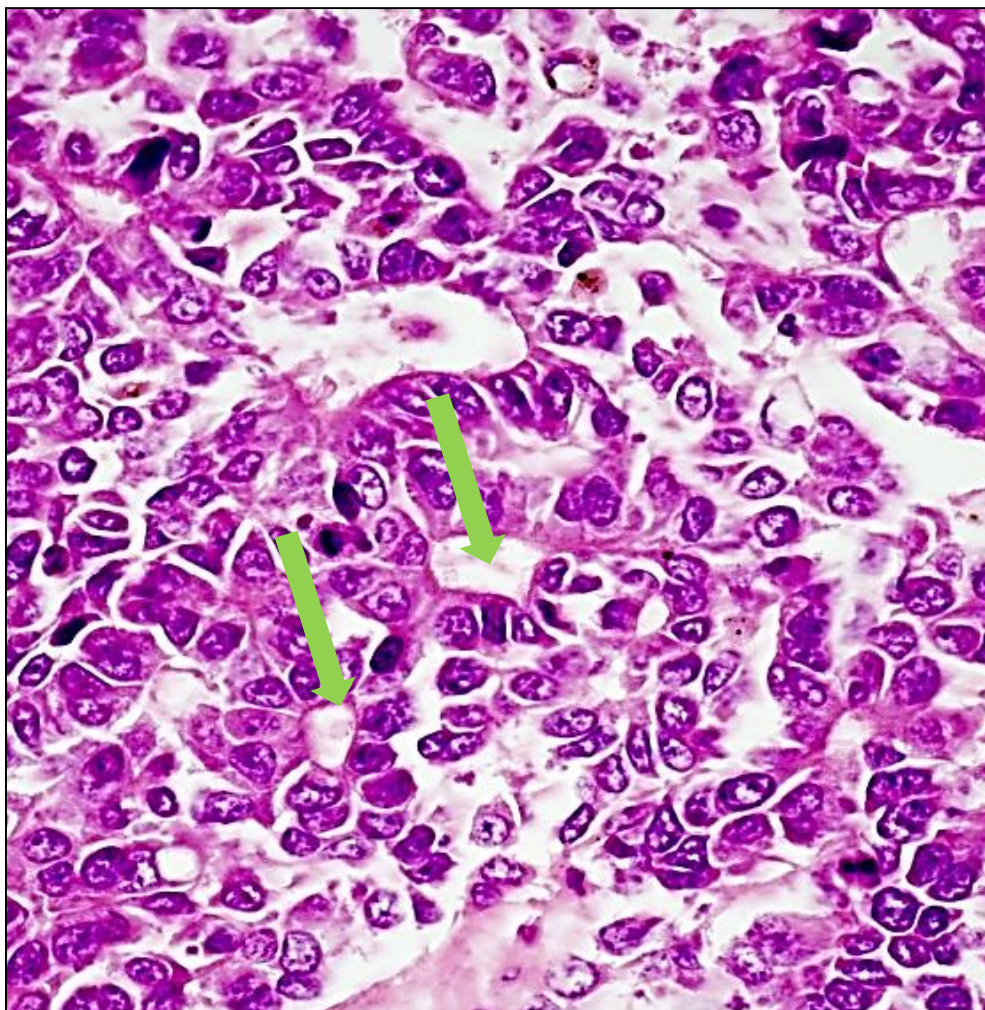


1. ábra. A hepatoblastoma epitheliális fetális komponensének szövettani képe. A tumort eosinophilén festődő sejtek építik fel, melyek nagymértékben hasonlítanak a hepatocytákra (Hematoxylin-eozin festés, 400x).

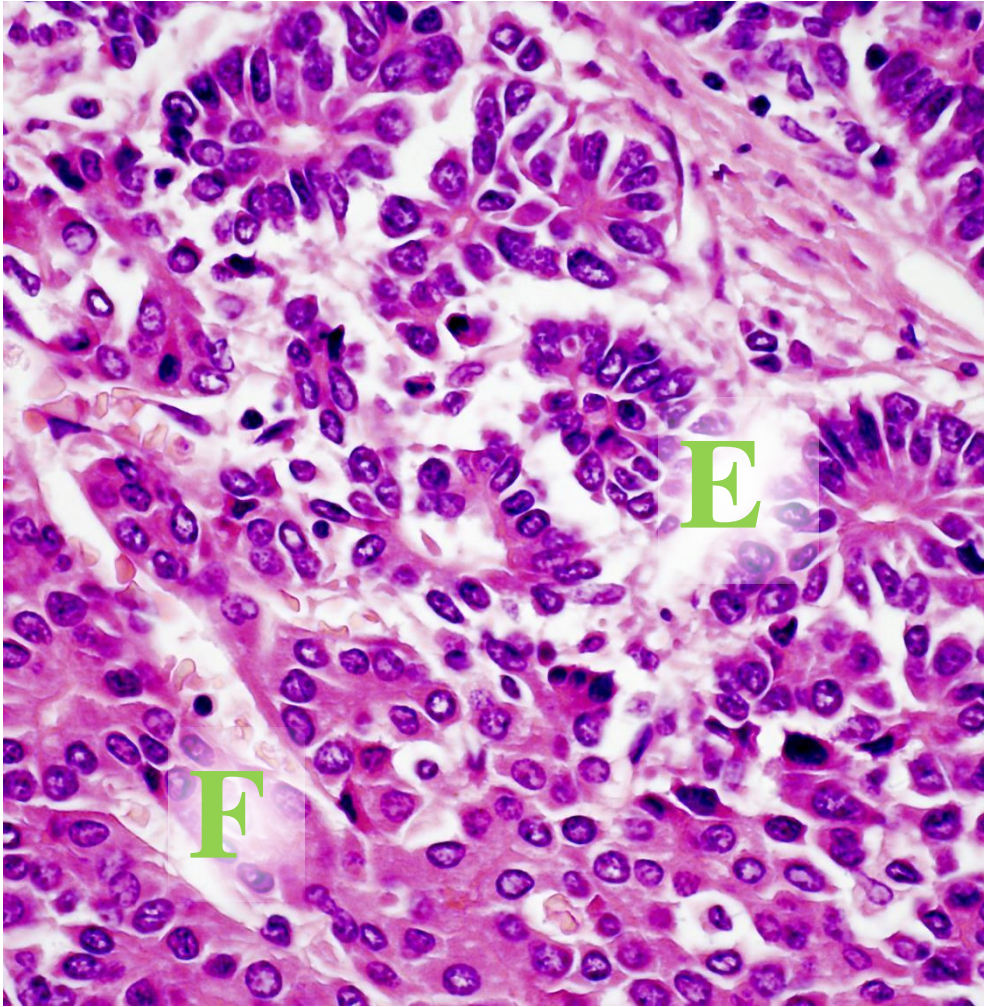
➤ Embrionális szubtypus

Az embrionális komponens sejtjei basophil festődésűek, elongált, ovoid alakúak, ritkábban kerek, sejtmagjai hosszúkásak és viszonylag nagyok, a sejtek kevés citoplazmát tartalmaznak. A sejtek 10-15 mikron átmérőjűek, az extramedullaris vérképzés elemeit gyakran láthatunk. A tumorsejtek gyakran úgynevezett pseudorozettákba tömörülnek, de noduláris elrendeződést is láthatunk. Ez a szubtypus a 6-8 hetes embrionális májra emlékeztet. A fetális és az embrionális komponens gyakran keveredik egymással, a HB-k 39% - ban, de legtöbbször a két komponens egymástól jól elkülönülten csoportokba vagy mezőkbe rendeződik. A hepatoblastoma embrionális

epitheliális komponensének szövettani képét a 2. *ábra* mutatja, a fetális/embriónális kevert hepatoblastoma képét a 3. *ábra* mutatja.



2. *ábra*. A hepatoblastoma embriónális komponensének szövettani képe. Jól láthatóak a tumorsejtek által képzett pszeudorozetták (nyíl) (Hematoxylin-eozin festés, 600x).



3. ábra. Fetalis/embrionális hepatoblastoma szövettani képe. A két komponens legtöbbször egymástól elkülönülten, kisebb-nagyobb csoportokba rendeződve található. F: fetalis komponens, E: embrionális komponens (Hematoxylin-eozin festés 600x).

❖ KEVERT (EPITHELIÁLIS ÉS MEZENCHYMALIS) TÍPUS

Sok embrionális tumorhoz hasonlóan a HB-k 20-30% - ban az epithelilais elemek keverednek strómális elemekkel, blastema sejtekkel, porc elemekkel, osteoiddal, izommal, így alkotva a kevert HB osztályát. Ennek a csoportnak a prognózisa még nem teljesen tisztázott.

❖ NEM OSZTÁLYOZHATÓ TÍPUS

Néhány tumornál lehet észlelni mind a HB-ra, mind pedig a hepatocellularis carcinomára jellemző szövettani eltéréseket, melyeket nem lehet egyértelműen egyik csoporthoz sem sorolni. Ennek a csoportnak adták a hepatocelluláris malignus neoplázia vagy korábban a nem osztályozható nevet (NOS) (Prokurat és mtsai 2002). Azt feltételezik, hogy ezek a tumorerő olyan sejtekből erednek, melyek a hepatoblast-hepatocyta átalakulási fázisánál szerepelnek.

3.2.4 Kezelési stratégia

Májtumorerő esetében (a rhabdomyosarcoma kivételével) a rezekabilitás kulcsfontosságú prognosztikus tényező, a HB-k közel 70%-a a diagnózis felállításakor nem rezekálható. Alapvetően kétféle kezelési stratégiát lehet elkülöníteni. A Children's Oncology Group (COG) a tumorerő elsődleges sebészi rezekcióját javasolja, és kemoterápia adását csak ezután kezdik, kivéve, ha jól differenciált HB-ról van szó. A jól differenciált tumorerő esetében, ha azt teljes egészében sikerül eltávolítani, akkor nem tartanak szükségesnek egyéb kezelést (Malogolowkin és mtsai 2011). A COG csoport különösen fontosnak tartja a primer rezekciós mintán a kissejtes komponens felismerését, melyet egy esetleges kemoterápia adása után nehezebb észrevenni. Ha nem lehetséges a rezekció, akkor diagnosztikus tumor biopsziát tartanak feltétlenül szükségesnek életkortól és AFP szinttől függetlenül (Meyers és mtsai 2009).

Európában a Gyermekkori májtumorerő nemzetközi stratégiai csoportja (SIOPEL) ajánlásait követik, vagyis kemoterápia adásának kell megelőznie a rezekciót. A SIOPEL álláspontja szerint minden HB-ra gyanús betegnél szükséges biopsziát venni, melyből a szövettani szubtípusnak diagnózisát meg kell adni, míg a COG csoport csak ott ajánl biopsziát, ahol nem lehetséges a rezekció. Sok esetben, mivel vaszkularizált tumorról van szó, vérzés gyakran előfordul a biopszia vétele közben. Von Schweinitz nemrégiben javasolta a HB diagnózis felállításának lehetőségét a következők teljesülése esetén: 6 hónap -3 éves gyermekről van szó, a képalkotó vizsgálatok jellegzetes, a hepatoblastomára jellemző képet adnak és az életkoruknak megfelelően szignifikánsan emelkedett AFP szintjük van (Goedeke és mtsai 2011).

A rezekabilitás megállapításához nemzetközileg elfogadott a PRETEXT (Pre-Treatment Extension of Disease) rendszer. A CT, hasi ultrahang és MRI vizsgálat alapján megállapítják a lebenyek érintettségét, a normál máj mennyiségét és lokalizációját a

tumoros részekhez képest, metasztázisok jelenlétét, hepaticus/portális vénák érintettségét és a nyirokcsomó státuszt. A PRETEXT I, II, III stádiumnak jó a prognózisa, komplett rezekciót lehet végezni, a standard kockázati csoportba tartoznak. A PRETEXT IV stádiumban az orthotópikus máj transzplantáció néhány esetben sikeres lehet, magas kockázatú csoport. A kissejtes szubtypus jelenléte és az extrém alacsony AFP szint (<100 ng/ml) rosszabb prognózist vetít elő. A kemoterapeutikumok bevezetése nagymértékben segítette a HB-s betegek túlélését, hiszen a neoadjuvánsan adott szerek miatt sok tumor rezekálhatóvá válik, az adjuváns terápia révén pedig a recidívák száma csökkenthető jelentősen (Roebuck és mtsai 2007). A SIOPEL ajánlása szerint a standard csoportban neoadjuvánsan és adjuvánsan Cisplatin adása javasolt, míg a magas kockázati csoportban Cisplatin+Carboplatin+Doxorubicin adása javasolt. Akár a COG csoport, akár a SIOPEL csoport ajánlását követve az 5 éves túlélés napjainkban 70% felett található (Perilongo és mtsai 2012).

3.3 Sejtkapcsoló struktúrák és TAMP fehérjék

A sejtkapcsolatok megváltozása a daganatok kialakulásának és a tumoros progresszióknak alapvető történése. A sejt-sejt és a sejt-extracelluláris matrix (ECM) kapcsolat megbomlása számos daganatban, kiemelten a hám eredetűekben különösen jellemző. Az epitheliális és endotheliális sejtek jellegzetes sejtkapcsoló struktúrákkal kapcsolódnak egymáshoz, melyek egyrészt elhatárolódást jelentenek a külvilág felé, de ugyanakkor ion- és méret szelektív barrierként is működnek. A sejtkapcsoló struktúrák közül legapikálisabban helyezkedik el a tight junction (TJ), majd az adherens junction (AJ), desmosoma, hemidesmosoma és végül a gap junction található. Az AJ, a TJ-hoz viszonyítva basolateráisan helyezkedik el és a desmosomával együtt a környező sejtekhez való kapcsolat kialakításában van szerepe, míg a TJ-k az intercelluláris kapcsolatok kialakításáért felelősek. A sejtkapcsoló struktúrák összetevőinek többsége integráns membrán fehérje, más részük citoplazmatikus, összeköttetésben állnak az aktin citoskelettonnal. A leginkább tanulmányozott struktúra a TJ, hiszen számos patológiai folyamatban, daganatképződés során leírták a TJ szerkezetének megváltozását, sőt összefüggésbe hozták a progresszióval, túléléssel, egyes daganat típusokkal (Borka és mtsai 2007, Halasz és mtsai 2006, Holczbauer és mtsai 2013, Korompay és mtsai 2012,

Lodi és mtsai 2006, Sobel és mtsai 2006). Lehetséges terápiás célpontként is használható bizonyos TJ fehérjék (claudin-3, 4) expressziója (Walther és mtsai 2012).

3.3.1 Tight junction

Az 1960-as években Farquhar és Palade írta le ezt az intramembránózus multiprotein komplexet. Ultravékony elektronmikroszkópos felvételeken látható, ahogy az ún. „kissing point”-oknál eltűnik az intercelluláris rés a kapcsolódó sejtek között, és helyükön a TJ integráns membránfehérjék kapcsolódnak a szomszédos sejtekkel. Innen ered a „tight” (=szoros) kifejezés. A TJ felépítését a 4. ábra mutatja. Csak a gerincesekben előforduló kapcsoló struktúra. Sokrétű feladatot látnak el: biztosítják a sejtpolaritást (kerítés funkció) az apikális és basolaterális membrán domének szeparálása révén, szemipermeábilis barrier a paracelluláris folyadék - és ion diffúzióban (barrier funkció). A barrier funkcióval hozható összefüggésbe szerepük a hasmenéssel, ödéma képződésével és sárgasággal járó kórképek kialakulásában. A kerítés funkció a tumorigenezisben játszik szerepet, amiben alapvető lépés a sejtek polaritásának elvesztése. Nemrég került az érdeklődés középpontjába a szignál transzdukciós folyamatokban való szerepük, szintén nemrég írták le szerepüket a veleszületett immunitásban (Kojima és mtsai 2009). Néhány, a TJ-t felépítő fehérje vírusok és extracelluláris stimulusok receptoraként szolgál, így számos humán megbetegedéssel hozhatóak összefüggésbe.

A tight junction felépítésében 50 különböző fehérje vesz részt, ezen fehérjéket összefoglalva a 3. táblázatban tüntettem fel. A későbbiekben részletesen csak az általunk vizsgált claudin és TAMP fehérjékről lesz szó.

3. táblázat. A tight junctiont alkotó fehérjék csoportosítása (Sawada 2013)

TIGHT JUNCTION FEHÉRJÉK
1. Transzmembrán fehérjék
Claudinok (CLDN-1, -27)
Tight junction asszociált MARVEL proteinek (TAMPs) (occludin, tricellulin, MARVELD3)
Immunoglobulin szupercsalád (JAM-A, B, C; CAR; ESAM)
Lipolízis stimulált lipoprotein receptor (LSR)
2. Citoplazmatikus fehérjék
a. PDZ doménnel rendelkező fehérjék: zonula occludens (ZO-)-1, 2, 3, MAGI-1,2; PAR-3,6; afadin, MUPP-1
b. PDZ doménnel nem rendelkező fehérjék: cingulin, symplekin, Rab fehérjék, merlin, angiomin

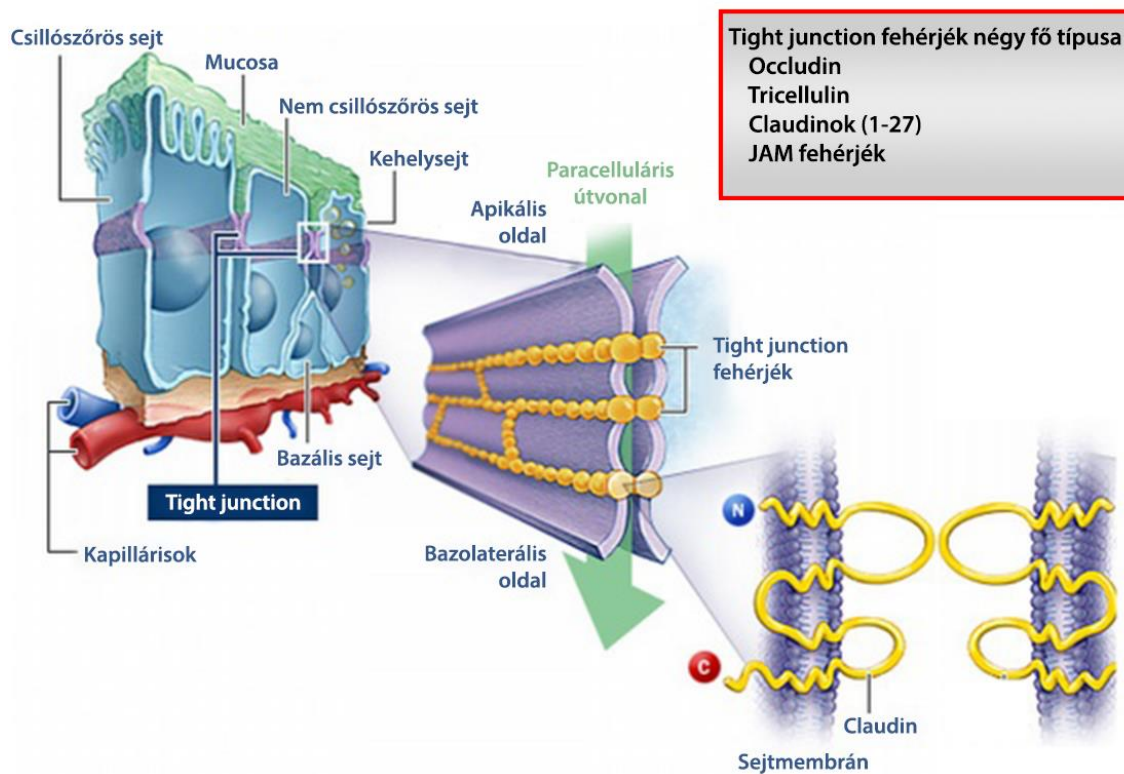
Transzmembrán fehérjék

Claudinok (CLDN): a legjelentősebb integráns membránproteinek, legfőbb szabályozói a paracelluláris barrier funkciónak, a polaritás kialakításának. Elsőként 1998-ban M. Furuse és S. Tsukita írta le a család elsőként azonosított tagját, a CLDN-1-t. Jelenleg emlősökben 27, emberben 26 tagja tagja ismert (Mineta és mtsai 2011), a CLDN-13-t emberben nem mutatták ki.

A CLDN-k 20-27 kDa nagyságú, négy transzmembrán doménnel rendelkeznek, két sejten kívüli hurokkal és sejten belüli C- és N-terminális doménnel. A C-terminális rész tartalmazza a PDZ kötő domént, melyen keresztül számos fehérjéhez kapcsolódik: MAGUK, ZO-1,2,3, PATJ fehérjék. Bizonyos szövetek, szervek specifikus CLDN mintázattal szerepelnek, például a vér-agy –gát fontos eleme a CLDN-5, a CLDN-11 az oligodendrocitákon mutatható ki nagy mennyiségben. A HB-ban is a CLDN-1 és -2 eltérő expressziója figyelhető meg a két epitheliális komponensben (Halasz és mtsai 2006).

Tight junction asszociált MARVEL proteinek (TAMPs): ide tartozik az elsőként 1993-ban Furuse által leírt TJ fehérje, az occludin, a tricellulin és a MARVELD3 fehérje.

A Tight junction asszociált MARVEL (MAL and related proteins for vesicle trafficking and membrane link) proteinek családjába három fehérje tartozik: az occludin (MARVELD1), a tricellulin (MARVELD2) és a MARVELD3. A család tagjai négytranszmembrán MARVEL doménnel rendelkeznek. Ez a domén a lipid-protein interakciókban játszik fontos szerepet. Elsőnek a mielinhez és limfocitákhoz asszociált fehérjékben (MAL) írták le, és jelenleg erről a MARVEL-domént tartalmazó proteinről tudunk a legtöbbet (Sanchez-Pulido és mtsai 2002). A MAL fehérjék elsősorban a sejtek apikális felszínén helyezkednek el, de folyamatosan vándorolnak a transz-Golgi készülék, a sejtmembrán és az endoszóma között. Fontos szerepük van az apikális transzport mechanizmusokban. A MARVEL domén olyan fehérjékben található, melyeknek a membránok rétegződésében és fúziós folyamatokban van szerepük, általában koleszterinben gazdag mikrodoménekben vannak jelen (Furuse 2014, Puertollano és mtsai 1999).



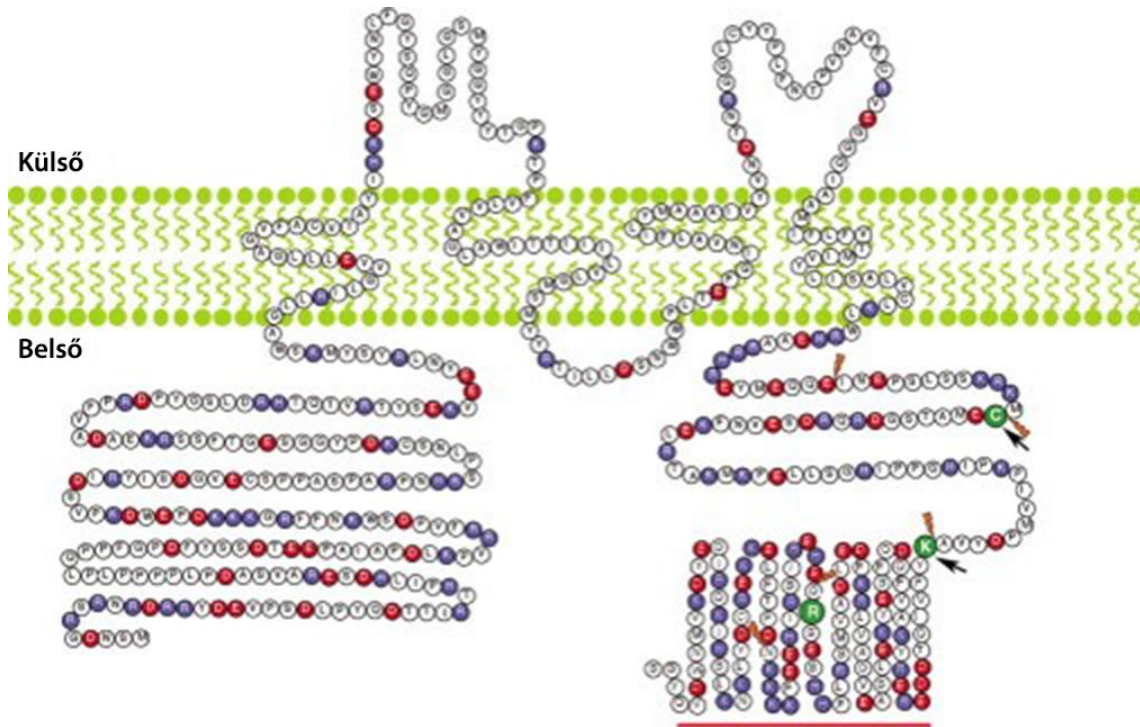
4. ábra. A TJ szerkezete. A struktúra transzmembrán (claudin, occludin, junkcionális adhéziós molekulák, tricellulin, lipolízis-stimulált receptor), citoplazmatikus (zonula occludens-1, 2, 3, cingulin, symplekin) és szignál transzdukciós fehérjékből áll (Schulzke és Fromm 2009).

3.3.2 Occludin (OCLN)

A TJ-k 1993-ban Furuse által patkányban elsőként felismert tagja az occludin (OCLN) volt. A legáltalánosabban előforduló TJ protein, és a legmegbízhatóbb immunhisztokémiai markere a TJ-nek (Tsukita és Furuse 1999, Westphal és mtsai 2010). Magas mRNS szintjét találták herében, vesében, tüdőben, májban, agyi epitheliális sejteken. Legújabban a HCV egyik receptoraként írták le (Benedicto és mtsai 2009).

3.3.3 Tricellulin (TRIC)

Mikroarray analízissel egér Eph4 epithelialis sejtvonalakat tanulmányozva 2005-ben Ikenouchi és mtsai leírtak egy, három epithel sejt találkozási pontjánál (tricelluláris TJ, tTJ) elhelyezkedő fehérjét, melyet TRIC-nak neveztek el (Ikenouchi és mtsai 2005). Ez volt a gerincesek tTJ-ben elsőként leírt fehérje. A TRIC a szervezetben általánosan előforduló fehérje, hasonlóan az OCLN-hoz, számos szervben és szövetben expresszálódik: emésztőrendszer, vese, epidermis, vesztibuláris és cochleáris epithelium, dendritikus sejtek, mikroglia sejtek (Mariano és mtsai 2011, Riazuddin és mtsai 2006, Schluter és mtsai 2007). Hasonlóan a MARVEL domént tartalmazó fehérjékhez, négy transzmembrán régióból, a 2-es és 3-as transzmembrán domén között található rövid intracelluláris hurokból és két extracelluláris hurokból áll. Az Ikenouchi által leírt egér TRIC 555 aminosavból álló, 63.6 kDa tömegű tetraspan doménből állt. Riazuddin 2006-ban írta le elsőként a humán TRIC jellemzőit (Riazuddin és mtsai 2006). Humán speciesben 558 aminosavból áll, az első extracelluláris hurok 40, a második 31 aminosavat tartalmaz. A C-terminális vég 32%-os homológiát mutat az OCLN ugyanezen részével, mely az OCLN-ELL doménjét tartalmazza. Jelenleg a fehérje négy izoformáját ismerjük (Riazuddin és mtsai 2006). A TRIC-a a leghosszabb, hét exonnal és az OCLN-ELL doménjével, TRIC-a1-ből hiányzik a 3-as exon, a TRIC-b pedig nem tartalmazza az OCLN-ELL domént, a TRIC-c pedig csak két transzmembrán régióval rendelkezik. Az OCLN-hoz hasonlóan a TRIC is foszforilált formában fordul elő a sejtekben, ugyanakkor a TRIC foszforilációs helyekről még meglehetősen kevés információ áll rendelkezésre (Dorfel és mtsai 2009). A protein kináz C útvonalon át a peroxiszóma proliferátor aktiváló receptor gamma agonisták humán nasalis epithel sejteken megnövelik a TRIC barrier funkcióját (Ogasawara és mtsai 2010).



5. ábra. A TRIC modellje. A piros vonal az OCLN-ELL doménjét jelzi, a nyilak a mutációk gyakori előfordulását mutatják (Riazuddin és mtsai 2006).

A TJ-ben való elhelyezkedésében mind a C-, mind az N-terminális fontos szerepet játszik, az előbbi a bazolaterális elhelyezkedésben, az utóbbi pedig a tricelluláris kapcsolatoknál való megjelenésben (Westphal és mtsai 2010). Westphal és mtsai a TJ fehérjék egymással való kapcsolatát vizsgálva leírták a heterometrikus OCLN-TRIC és a homometrikus TRIC-TRIC komplexek jelenlétét. Ezzel szemben, más vizsgálatok nem támasztják alá az OCLN és TRIC asszociációját, mivel ko-immunprecipitációval nem volt azonosítható a 2 fehérje. Az OCLN immunprecipitációs komplexében a MARVELD3 fehérje volt azonosítható (Raleigh és mtsai 2010). A TRIC kisebb mennyiségben megtalálható a bTJ-ben, az OCLN kiütése vagy nagymértékű kifejeződése révén- ahol az ionok transzportját modulálja (Furuse és mtsai 2014). Az LSR a TRIC mellett a tTJ-ben nagy mennyiségben előforduló fehérje, fontos szerepe van a tTJ kialakításában. Emlősökben leírtak két, a LSR-al nagyfokú hasonlóságot mutató fehérjét, az immunoglobulin-like domain-containing receptor (ILDR) 1-t és 2-t. Az ILDR 1 génjének mutációja familiáris non szindrómás süketiséget (DFNB42) okoz, és kimutatták, hogy szükséges az epitheliális sejtek barrier funkciójának működéséhez (Higashi és mtsai 2013). A TRIC C-terminális citoplazmatikus doménjével kapcsolódik a LSR

citoplazmatikus részével, és így a TJ vertikális szálát alkotják a tTJ-ben. A TRIC eltávolítása az OCLN újrendeződését váltja ki a bTJ-ben, mivel a könnycsepp-szerű elhelyezkedése révén közel áll a tTJ-höz.

A fehérje kiütése csökkenti a transzepitheliális ellenállást, és méret-szelektíven egy megnövekedett permabilitást eredményez, ami jelzi, hogy a tTJ nagyon fontos az epitheliális barrier kialakítása szempontjából, és a TRIC-nak ebben direkt szerepe van (Ikenouchi és mtsai 2008). Az OCLN kiütése MDCK II sejtekben a TRIC átrendeződését eredményezi a bTJ-be, vagyis a TRIC részben kompenzálja az OCLN némelyik funkcióját. A tumor nekrosis faktor (TNF) hatására a TRIC és MARVELD3 TJ-ben megnövekedett expresszióját lehet megfigyelni, amíg az OCLN szintje nem változott, ami jelzi, hogy ezeknek a fehérjéknek szerepük van a pro-inflammatórikus stimulusra adott epithelialis válasz kialakításában is (Raleigh és mtsai 2010). A bTJ-ben fizikálisan a TRIC jelenléte csökkenti a sejtek közötti hiányt, megnöveli a paracelluláris elektromos ellenállást, csökkenti az ionok és nagyobb oldott anyagok számára a permeabilitást, de nem változtat az ion szelektivitáson. A tTJ-ben az epithelialis sejtek találkozásánál lehetővé teszi makromolekulák transzportját, viszont az ionok átjutását nem engedi. (Krug és mtsai 2009). Ugyanakkor, humán nazális epithelialis sejteken a tricelluláris kapcsolatok találkozási pontjának lezárásával fontos szerepe van a belélegzett vírusok és antigének bejutásának megakadályozásában (Ohkuni és mtsai 2009). A TRIC bizonyított szerepe a belső fülben a Corti-féle szervben az epithel barrier kialakítása, mely szükséges a normál hallás fiziológiai folyamatához, korábban a CLDN-11 és -14 ilyen jellegű szerepét is leírták (Gow és mtsai 2004, Riazuddin és mtsai 2006). A TRIC génjének négy különböző recesszív mutációja süketséget okoz (DFNB49), a négy DFNB49 allél olyan fehérjéket kódol, melyek nem tudnak kapcsolódni a ZO-1, 2, 3 fehérjékkel, mivel hiányzik a C-terminálison lévő OCLN-ELL domén.

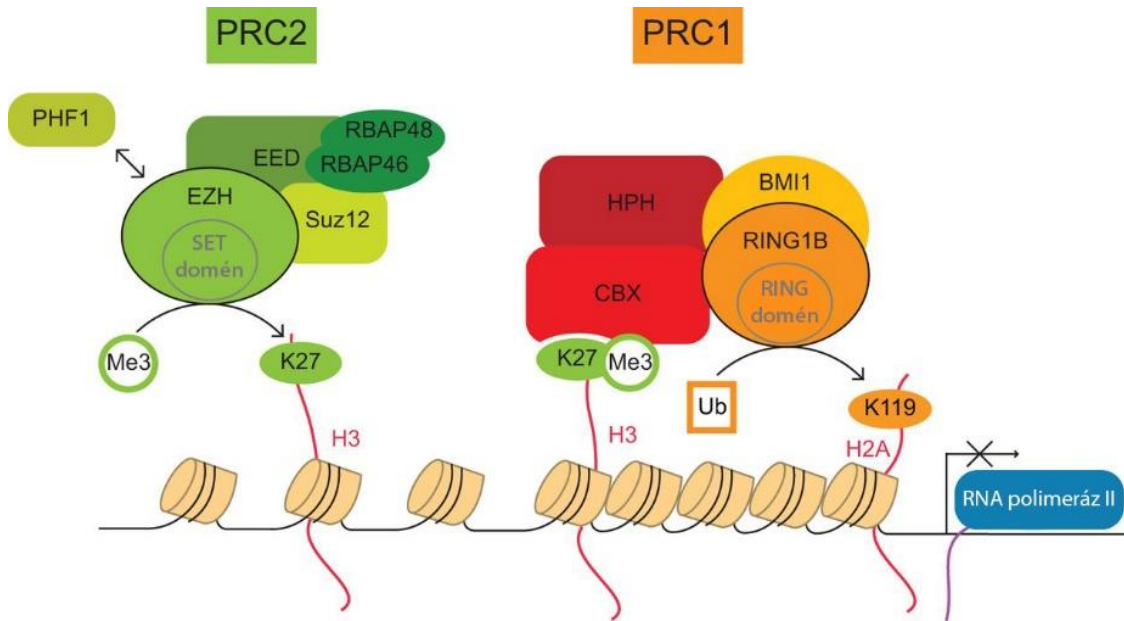
3.4 Epigenetikus reguláció

A sejtkapcsoló struktúrák megváltozásához hasonlóan az utóbbi időben előtérbe kerültek az epigenetikus szabályozó mechanizmusok, melyeknek egyre nagyobb és szerteágazóbb szerepet tulajdonítanak a daganatképződés során. A DNS és a hiszton fehérjék módosításain alapuló epigenetikai mechanizmusok fontos szerepet játszanak a

génexpresszió szabályozásában a szöveti differenciáció során (Berger 2007). A kromatin szerkezetét megváltoztató módosítások következtében a sejthalálban és a proliferációban résztvevő gének kifejeződése változik (Ballestar és Esteller 2008). A hiszton fehérjék állapotának megváltozása miatt pedig tumorszupresszor gének inaktiválódnak, az onkogének pedig aktiválódnak (Baylin és Ohm 2006). Korábban két fő szabályozási formát különítettek el a DNS metilációt, mely a DNS citozin- guanin dinukleotidjainak (CpG) citozinját érinti, valamint a hiszton modifikációkat, melyek hiszton fehérjék aminosav oldalláncainak acetilációja, metilációja, foszforilációja, ubiquitinációja és szumolációja lehetnek. A kis, szabályozó RNS-ek, a mikroRNS-eknek felfedezése óta kitűnt, hogy az ebbe a csoportba tartozóknak is jelentős szerepe lehet az epigenetikai szabályozó folyamatokban, mind a közvetlen transzkripcionális szabályozással, mind a transzkripciós faktorok transzlációjának, tehát mennyiségének szabályozásával. A polycomb represszor fehérje komplexek a géncsendesítésben játszanak szerepet, amiket szintén epigenetikus szabályozóknak tekintenek.

3.4.1 Hiszton modifikáció és EZH2 (enhancer of zeste homolog 2) szerepe

A hisztonok fontos funkciót látnak el, a kromatin struktúráját ellenőrzik, a rajtuk végbemenő módosítások általában az N-terminális farki rész lizin aminosavait érinti (Verdone és mtsai 2005). A módosítások leggyakrabban metilációt, acetilációt, ubiquitinációt jelentenek. Ezen módosításokat végző fehérjék komplexek formájában vannak jelen, melyek közül legfontosabb a polycomb represszor (PcG) és a trithorax (Trx) fehérje család. Az utóbbi családról kimutatták, hogy a transzkripciós aktivitást fokozzák a hármas hiszton 4-es lizin oldalláncának (H3K4me3) metilálásával, szemben a PcG-ek hármas hiszton 27-es lizin oldalláncának (H3K27me3) trimetilálásával, ami gátolja a transzkripciót (Nagarajan és mtsai 2013). A fent említett két hiszton modifikáció fontos szerepet játszik a proliferáció és differenciáció epigenetikus szabályozásában. A H3K27me3 trimetilációját a polycomb represszor komplex 2 (PRC2) végzi. A polycomb represszor komplex 1 a kettes A hiszton 119-es (H2AK119) lizin oldalláncának ubiquitinációját végzi, mely egy kompakt kromatin szerkezetet eredményez, gátolva a transzkripciót (6. ábra).



6. ábra. Polycomb repressor komplexek és aktivitásuk. Az EZH2 a SET doménjén át képes trimetilálni a H3K27-et, míg a RING1A-B a RING doménjével monoubiqutinálja a H2AK119-t, mely mindkét esetben a kromatin kondenzációjához vezet, és a transzkripció gátlását eredményezi (Vissers és mtsai 2012).

A PRC2 általi hiszton modifikációt követően a PRC1 monoubiqutinálása következik, melyek által az RNS polimeráz II általi transzkripciós elongáció és átíródás akadályozott lesz (Sauvageau és Sauvageau 2010). A gátolt gének számos celluláris folyamatban vesznek részt: apoptózis, sejtciklus ellenőrzése, sejt differenciáció és daganatképződés. Számos kutatás irányult az enzimatis aktivitással rendelkező EZH2 (más néven ENX 1) tag felé, melynek a tumorok keletkezésében és progressziójában fontos szerepet tulajdonítanak.

A humán EZH2 génje a 7q35 pozícióban található, 20 exonból áll, melyek 746 aminosavból álló fehérjét kódolnak. négy konzervált régióból épül fel: domén 1-2, ciszteinkin gazdag régió és a C-terminális végen található SET domén, melyhez a hiszton metiltransferáz aktivitás kötődik. Szabályozása megvalósulhat transzkripciós, poszt-transzkripciós és poszt-transzlációs szinten. Az EZH2 lehetséges regulátorait és targetjeit a 4 táblázatban foglaltam össze.

4. táblázat. Az EZH2 regulátorai, direkt targetjei és funkcióik (*Chang és mtsai 2011*).

Regulátor	Mechanizmus	Target	Target funkciója
E2F	transzkripciót aktivál	DKK1	Wnt inhibitor
EWS-FLI1	transzkripciót aktivál	INK/ARF	sejtciklus regulátor
SNF5	kromatin elnyomása	CDH1	EMT inhibitor
HIF1α	transzkripciót aktivál	DAB2IP	Ras inhibitor
miR-26/101	transzkripciót gátol	ADRB2	metasztázis inhibitor
AKT	foszforiláció	VASH1	angiogenezis inhibitor
CDK1/2	foszforiláció	RAD51	DNS repair

A szerzett EZH2 mutációk közül leggyakoribb a follikuláris és diffúz nagy B-sejtes limfómákban az Y641 aminosavban bekövetkező misszensz mutáció, mely a SET doménen belül helyezkedik el. Meglepő módon, az Y641 mutáció funkciónyeréssel jár (Morin és mtsai 2010). Mieloid daganatokban -mielofibrózis, mieloproliferatív szindrómák, mielodiszplázia- nem lehet egyértelmű mutációs forrópontot találni, gyakoriak a stop kodon és nonszensz mutációk, melyek a metiltranszferáz aktivitás csökkenésével járnak (Nikoloski és mtsai 2010). Mivel a daganatok keletkezésében az epigenetikus módosításoknak nagy szerepe van, így a célzott terápia néhány tumorban segíthet a gyógyulásban. Cutan T-sejtes limfómában elérhető a hiszton deacetiláz inhibitor vorinostat, mielodiszplastikus szindrómában pedig a DNS demetiláló azacitidin és decitabin (Fenaux és mtsai 2010, Olsen és mtsai 2007). Az EZH2 aktivitásának gátlására alkalmazzák a karbociklin adenzin analóg 3-deazaneplanocint (DZNep), mely a természetesen előforduló neoplanocin-A antibiotikum származéka. A

DZNep gátolja az S-adenozil-homocisztein hidrolázt, a molekula felszaporodása gátolja a metiltranszfer reakciókat. Megemlítendő a kurkuma kivonat -melyet a gyömbér fűszernövényből nyernek ki-, EZH2 szintet csökkentő hatása, a mitogén aktivált protein kináz útvonalon keresztül (Hua és mtsai 2010).

3.5 Az Argináz szerepe és jelentősége

Számos daganatban a sejten belüli metabolikus folyamatok zavara ismerhető fel, mely a kulcslépés a tumorok kialakulásában és fejlődésében. Jelenleg elérhető a Krebs ciklus elemeinek mutációs vizsgálata (fumarát hidratáz, szukcinát dehidrogenáz, izocitrát dehidrogenát-1,2), melyekből következtetni lehet a normál és tumoros sejteket felépítő cukrok, lipidek és aminosavak eltérő biokémiai jellemzőire (Schiffman és mtsai 2011). Az L-arginin aminosavat nagy érdeklődés övezi, hiszen terápiás célpontként használható fel. Ismert tény, az arginin önmagában is fokozza a tumorsejtek növekedését, ezt igazolták sejtvonalakon, in vivo tumor modellben, ex vivo tanulmányban is (Scott és mtsai 2000). Az arginin az urea ciklus egyik metabolitja, számos celluláris metabolikus útvonalban játszik szerepet, például a poliaminok, kreatin, nitrogén oxid, nukleotidok, prolin és glutamát bioszintézisében (Morris 2006). Az argináz (Arg) enzim hasítja az L-arginint L-ornitinné és ureává, melyből az ornitin-karbamoil transzferáz citrullint alakít ki. Az L-ornitin a poliaminok bioszintézisének prekurzora, melyek a sejtek növekedését stimulálják (Witte és Barbul 2003).

Az enzimnek két funkcionálisan és strukturálisan eltérő izoformája létezik, melyeket más-más gén kódol, és ezek a gének más kromoszómán helyezkedik el. Az Arg-1-t májspecifikusnak tekintik, legnagyobb mennyiségben itt található- a periportális hepatocyták citoplazmájában-, az ammónia lebontásában játszik szerepet az urea ciklus utolsó enzimeként. Génje a 6q23 pozícióban található. Az Arg-2 kisebb mennyiségben található a májban -a perivenozus hepatocyták mitokondriumaiban-, viszont magas szintjét mérhetjük extrahepatikus szövetekben, szervekben, így a vesében, prosztatában, pancreasban, vékonybélben és laktáló emlőállományban. Génje a 14q24.1-24.3 lokalizációban található. Szerepe az L-prolin és poliaminok szintézisében van. Az L-prolin a kollagén fontos alkotórésze, ennek a szintézise mellett a nitrogén-monoxid (NO) szintetizálásában is részt vesz (Toya és mtsai 2014).

Az enzimnek az elmúlt pár évben számos betegségben betöltött szerepéről számoltak be: vaszkuláris, pulmonális, infekciózus és daganatos elváltozásokat is beleértve (Mori 2007). Számos daganatban leírtak magas argináz expressziós szintet: gyomor, colon, emlő, prosztatata, tüdő és májtumorokban (Singh és mtsai 2000). Érdekes módon, gyomor carcinomás mintákban a diszplastikus és a daganatos sejtek is nagymértékben erős, citoplazmatikus mintázatot mutattak (Wu és mtsai 1996). A daganatok kialakulásában betöltött szerepe a növekedés segítésében van, hiszen az Arg poliaminokat szintetizál, illetve csökkenti a NO mediált tumor citotoxicitást (Bronte és Zanovello 2005). Az Arg-1-t nagyon szenzitív és specifikus hepatocytáknak tekintik. Mind a benignus-, mind a malignus hepatocytákban kimutatható, különösen az alacsonyabban differenciált HCC-k és a metasztatikus adenocarcinómák elkülönítésében van fontos diagnosztikai szerepe (Timek és mtsai 2012).

4 CÉLKITŰZÉSEK

A gyermekkori májtumrok világszerte növekvő incidenciát mutatnak, a hepatoblastoma is egyre gyakrabban kerül diagnosztizálásra. A hepatoblastoma öt éves túlélése a multiplex terápiának köszönhetően 70% felett van napjainkban. A hepatoblastoma kialakulásával kapcsolatban számos etiopatológiai tényezőt leírtak, de az etiológiája a mai napig sem teljesen tisztázott. A daganatok pathogenezisében fontos szerepet játszó sejtkapcsolatok megváltozását munkacsoportunk korábban számos daganatban leírta. Nincs viszont adat az újonnan felfedezett tight junction fehérje, a tricellulin expressziójára vonatkozóan a korábban már tanulmányozott hepatoblastomákban, illetve a tumor különböző differenciáltságú komponenseiben való expressziójára. Szintén nem rendelkezünk adattal a számos tumorban leírt epigenetikus szabályozó molekulának az EZH2 fehérjének a hepatoblastoma különböző szövettani típusaiban való kifejeződéséről és összefüggéséről egyes prognosztikai faktorokkal. Szintén nem szerepel adat a hepatocelluláris carcinomában nagy szenzitivitással és specifitással expresszálandó argináz-1 fehérje kifejeződéséről sem a hepatoblastomákban.

A fenti tényezők alapján a következő célkitűzéseket fogalmaztuk meg:

- Az újonnan felfedezett sejtkapcsoló fehérje, a tricellulin (TRIC) expressziójának vizsgálata humán epitheliális hepatoblastoma különböző differenciáltságú szövettani típusaiban.
- Az enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) expressziójának vizsgálata humán epitheliális hepatoblastoma különböző differenciáltságú szövettani típusaiban.
- Az argináz-1 fehérje kifejeződésének vizsgálata humán epitheliális hepatoblastoma különböző differenciáltságú szövettani típusaiban.
- A β -catenin expressziójának vizsgálata a két epitheliális komponensben.
- Az immunhisztokémiai vizsgálatokkal kapott eredmények és a túlélési adatok összevetése, elemzése, kiértékelése.
- A hepatoblastoma különböző differenciáltságú epitheliális komponenseinek tisztázatlan eredete vizsgálatának céljából tight junction proteinek (claudin-1 és TRIC) és EZH2 vizsgálata az egyedfejlődés különböző időszakaiban humán fetális májmintákon.

5 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

5.1 Betegek és szövetminták

Vizsgálatainkat a Semmelweis Egyetem II. számú Patológiai Intézetének és az I. számú I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetének archívumában 1995-2010 között megtalálható hepatoblastoma (HB) diagnózissal lezárt esetekből választottuk. A 21 eset formalin fixált, paraffinba ágyazott blokkjaiból retrospektív vizsgálatokat végeztünk a Semmelweis Egyetem Regionális Etikai Bizottságának engedélyével (#192). Az összes eset sebészi rezekátumból származott.

Kísérleteink további kiegészítése céljából a Semmelweis Egyetem I. és II. számú Nőgyógyászati Klinikájáról 2014.január-június hónapig bezárólag 57 spontán abortum formalin fixált, paraffinba ágyazott és -80°C-on tárolt, előzőleg folyékony nitrogénben rögzített mintáját is vizsgáltuk.

A 21 tumoros beteg életkora 3.6-189.8 hónap (átlagosan 45.9 hónap), a fiú/lány arány 11/10 volt. A 21 eset mindegyike a SIPOEL nemzetközi protokollnak megfelelően pre-operatív kemoterápián esett át. A standard kockázati csoportba tartozó betegek ciszplatin monoterápiában, míg a magas kockázati csoportba tartozók carboplatin és doxorubicin (PLADO) terápiában részesültek. A protokoll szerint ajánlott a kemoterápia megkezdése előtt a biopsziás mintavétel, és mindenféleképpen szükséges, ha hat hónapnál fiatalabb vagy három évnél idősebb gyermekről van szó, vagy ha normál AFP szint társul hozzá. A hat hónap- három éves korú gyermekek esetében, szolid hepatikus massa és emelkedett AFP szint jelenléte mellett nem szükséges a preoperatív mintavétel. Intézeteink archívumában nem állt rendelkezésre a biopsziás anyag, amire magyarázat, hogy a műtét előtti mintavételt nem Budapesten, illetve nem a fent említett két intézetben végezték. Így a betegek a megfelelő képalkotó vizsgálatok, az életkor és az emelkedett AFP szint alapján lettek beválasztva a vizsgálatba, és a kemoterápia utáni műtéti anyagokon hepatoblastoma diagnózist állítottunk fel. hét esetben lokális recidívát, hat betegnél tüdőbe adott metasztázist találtunk, melyeket egy eset kivételével a rezekció után észleltek. A vizsgálat lezárásának idején (2013. március) a 20-ból öt beteg meghalt. A betegek klinikai adatait az 5. táblázatban foglaltam össze.

5. táblázat. A vizsgált betegek jellemzői nem, kor, szövettani típus és klinikai paraméterek szerint. f: fiú, l:lány, F: fetális típus, E: embrionális típus, NT: nem tumoros környező máj.

Eset	Nem	Kor (év)	Domináló szövettani komponens	Környe- ző máj	Minta- szám	Oldal	Meta- sztázis	Recidíva	Halál	
1	f	0,36	F		1	jobb		igen	igen	
2	l	1,44	E	NT	2	jobb				
3	f	10,14	F		2	jobb		igen		
4	f	5,14	F		2	jobb, bal	tüdő	igen	igen	
5	l	5,44	F		2	jobb				
6	l	0,30	F		2	jobb				
7	f	6,45	F		2	jobb				
8	l	2,16	F	E	2	jobb				
9	f	3,12	F		2	jobb, bal				
10	f	2,40	E		1	jobb				
11	f	0,76	F		2	jobb				
12	f	0,98	F		2	jobb	tüdő	igen		
13	l	1,13	F	E	2	jobb				
14	f	7,66	F		2	jobb				
15	l	4,76	E		1	jobb	tüdő	igen	igen	
16	l	15,82	F		2	bal	tüdő	igen	igen	
17	f	0,39	F	E	3	bal				
18	l	1,19	E	NT	2	bal				
19	l	1,54	F		2	jobb	tüdő			
20	l	0,98	F	E	2	bal				
21	f	2,16	E	NT	3	jobb	tüdő	igen	igen	
Össze- sen			16	9	16	41		6	7	5

Az általunk vizsgált hepatoblastoma minták tisztán epitheliális típusúnak bizonyultak 12 fetális és kilenc embrionális/fetális típus megoszlásban. Az utóbbi kilenc esetből ötben a fetális komponens aránya kevesebb, mint 5% volt, míg négy esetben ez az arány elérte a 30-50%-ot. Az előbbi esetekből csak embrionális területet, míg az utóbbiakból mind embrionális, mind fetális területet tudtunk értékelni és a kiértékelésbe bevonni. Így összesen 16 fetális, 9 embrionális illetve 16 tumormentes, környező májminta állt rendelkezésünkre.

A fetális májak estében eltérő idő telt el az exitus és a boncolás megkezdése előtt, ez átlagban öt nap volt, így külön kezeltük azon eseteket, amelyeknél háromnál több, vagy kevesebb nap volt ez az idő. A magzatokat az abortusz elvégzése után +4 °C-on, hűtőkamrában tárolták a boncolás elvégzéséig. Az 57 abortum átlag kora 19 hét volt. A fetális májak életkorát a 6. 7. táblázatban tüntettem fel.

6. táblázat. Fetális májak, melyeknél négy-hat nap telt el a boncolásig (a boncolásig +4°C-n tárolva)

Terhességi hét	Mintaszám
14 hét	7
15 hét	3
16 hét	1
17 hét	3
18 hét	5
19 hét	3
20 hét	5
21 hét	7
22 hét	5
23 hét	8
Összesen	47

7. táblázat. Fetális májak, melyeknél három vagy annál kevesebb nap telt el a boncolásig (a boncolásig +4°C-n tárolva)

Terhességi hét	Mintaszám
18 hét	1
19 hét	2
20 hét	1
21 hét	4
22 hét	1
23 hét	1
Összesen	10

5.2 Szövetteni és hisztokémiai vizsgálatok

A beérkezett minták feldolgozása a rutin laboratóriumi protokoll szerint történt. A szövetmintákat beérkezésük után 10%-os, neutralis (pH 7,4) PBS-ben beállított formalinban fixáltuk 24 órán át szobahőmérsékleten, majd alkoholsorban (70%, 90%, 100%) és xylolban történő dehidrációt követően paraffinba ágyasztuk. A paraffin blokkba ágyasztott (FFPE) mintákból 3-5 µm-es metszetek készültek, amelyeket haematoxylin-eosinnal festettünk meg. Kiegészítésként picrosirius festést is alkalmaztunk a kötőszövetes átalakulás detektálására.

5.2.1 Immunhisztokémia

5.2.1.1 Immunhisztokémiai reakciók

Az immunreakciók elvégzéséhez a FFPE blokkokból frissen metszett, 3-5 µm vastagságú mintákat készítettünk *Superfrost UltraPlus®* (Thermo Fisher Scientific, Gerhard Menzel GmbH&Co., Braunschweig, Germany) tárgylemezekre. Az immunhisztokémiai reakciók során felhasznált primer antitestek jellemzőit, gyártóikat és az alkalmazott hígításait az 7. táblázatban tüntettem fel. A reakciókat HRP Multimer alapú biotin mentes detektálási technikával működő *Ventana Benchmark XT* (Ventana Medical Systems Inc., Tucson, AZ, USA) automatizált immunfestő automatában a gyártó protokolljának megfelelően állítottuk be. Az automatában a felhasznált reagenseket és a másodlagos antitestet a Ventana Medical Systems gyártó által ajánlott *UltraView Universal DAB Detection Kit* (LOT: B03403, REF: 760-500) tartalmazta. A gyártó leírása alapján a kit a következőket tartalmazza: 3% alapú DAB inhibitort, < 50 µg/mL HRP Multimert, 0,2% DAB-ot (3,3'-diaminobenzidine) chromogénként, 0,04% H₂O₂-t tartalmazó DAB és 5 g/L CuSO₄. Háttérfestésként hematoxylint (REF: 790-2208) és bluing (kékítő) reagenst (REF: 760-2037) alkalmaztunk.

8. táblázat. Elsődleges antitestek és jellemzőik

Primer antitest	Klonalitás species/	Gyártó	Hígítás	Pozitív kontroll	Katalógus szám
Argináz-1	poliklonális nyúl	Sigma	1:1000	hepatocelluláris carcinoma	B41533
β-catenin	monoklonális egér	Millipore	1:100	colorectális carcinoma	MAB2081
Claudin-1	poliklonális nyúl	Cell Marque	1:100	colorectális carcinoma	359A-16
EZH2	monoklonális egér	BD Transduction Laboratories TM	1:50	nyirokcsomó	612667
Tricellulin	poliklonális nyúl	Invitrogen	1:50	normál duodénum	488400

A negatív kontroll készítésénél kihagytuk a primer antitestek alkalmazását és helyette a primer antitestnek megfelelő hígításban nem-immun nyúl illetve egér savókkal inkubáltunk. Pozitív kontrollként a következő szöveteket alkalmaztuk: a β-catenin esetében colorectalis carcinoma, TRIC estében normál duodenum, EZH2 esetében nyirokcsomó és az Arg-1 esetében hepatocellularis carcinoma szolgált kontrollként. Az automatán végzett immunreakciók részletes lépéseit a 9. táblázat tartalmazza.

9. táblázat. A Ventana Benchmark XT automatában végzett immunreakciók részletei

Folyamat	Reagens	Időtartam, hőmérséklet
1. Paraffinos metszet, 3-5 µm		
2. Deparaffinálás	Ez Prep Concentrate (10X) REF: 950-102	76°C
3. Antigén feltárás	Proteáz-1 emésztés (TRIC esetében)	4'
	CC1 (cell conditioning)	pH 8.5, 100°C, 60'
4. Blokkolás	Inhibitor, 3% DAB REF:253-4291	
5. Primer antitest manuálisan pipettázva (100 µl)	Ventana Antibody Diluentben hígítva (251018)	42°C, 32', 40', 56'
6. Amplifikálás (csak a TRIC esetében)	Ventana Amplification Kit (Amplifier A+B) REF: 760-080	37°C, 8'
7. Előhívás	UltraView Universal DAB Detection Kit LOT: B03403, REF: 760-500	
8. Szekunder antitest	<50 µg/mL HRP Multimer-el konjugált REF: 253-4290	37°C, 8'
9. Vízuálizálás	0.04% DAB H ₂ O ₂ REF: 253-4293	8'
	5 g/L CuSO ₄ DAB Copper REF: 253-4294	8'
10. Magfestés, háttérfestés	Hematoxylin II REF: 790-2208	12'
	Bluing Reagent	4'

	REF: 760-2037		
11. Dehidráálás	Abszolút etanol I-II-III	5'-5'-5'	
	Xylol I-II	5'-5'	
12. Lefedés	Sakura Tissue TEC GLC		
	Mounting medium		
	REF: 1408		

5.2.1.2 Szöveti multiblokk (tissue microarray-TMA) készítése

A magzati májakon végzett immunhisztokémiai reakciókat 50 férőhelyes TMA blokkokon vizsgáltuk. A folyamat lépései: fénymikroszkóp segítségével történik a reprezentatív területek kijelölése a donor blokkokból készült HE metszeteken, majd ennek alapján a megfelelő szövethengerek kiszúrása és azok behelyezése az üres recipiens blokkba. Külön blokkokba kerültek azok az esetek, melyeknél az exitus és a boncolás között kevesebb, illetve több mint három nap telt el.

Vizsgálatunkban a 3D Histech (1122, Budapest, Hungary) cég automatizált TMA Master készülékét használtuk. A tumorszövetet tartalmazó paraffin ún. donor blokkból az automatizált technika segítségével két-két kettő mm vastag reprezentatív szövethengert, ún. core-t helyeztünk egy előre elkészített paraffin standard méretű 5x10 férőhelyes ún. recipiens blokkba, a core-k között 0.75 mm távolságot hagyva. Rögzítettük a koordinátákat, a könnyebb tájékozódás érdekében jelzőanyagot (agyat, nyálmirigyet) helyeztünk el a blokkokon előzőleg rögzített pozícióba. Ezután a multiblokkot 70-72°C-os folyékony paraffinban összeolvastottuk, így a core-k a megfelelő pozícióban rögzültek és kellő mértékben összeolvadtak a recipiens blokk paraffinjával. A szövet multiblokk ezután ugyanúgy kezelendő, mint az egyszerű szövetblokk. A multiblokkok összeállításánál minden TMA blokkba beépítettünk két-két core-t az alábbi mintákból: 11 hónapos, egy éves és három éves gyermek máj és normál felnőtt máj.

5.2.1.3 Sejtenyésztés

Immunfluoreszcens vizsgálatainkhoz négy sejtvonalat használtunk: Hep3B, HepG2, HEK-293 és HUH-7. A sejtek tenyésztése és kezelése az I. számú Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet Molekuláris Patológiai Laboratóriumában történt. A

sejtvonalak az American Type Culture Collection (Manassas, VA) cégtől származnak: Hep3B hepatocelluláris carcinoma (ATCC[®] HB-8064[™]), HepG2 hepatocelluláris carcinoma (ATCC[®] HB-8065[™]), HEK-293 embrionális vese (ATCC-1573) és HUH-7 (ATCC HB-8064) hepatocarcinoma sejtvonal. A sejtek mindegyike Dulbecco's Modified Eagle's médiumot (DMEM) használva nőtt, mely 10% FBS-t (fetal bovine serum), 100 U/ml penicillint és 100 µg/ml streptomycint (Sigma) tartalmazott. A sejteket közel 90%-os konfluenciánál tripszin-EDTA segítségével passzáltuk, majd hat férőhelyes plate-be helyeztük át a további immunfluoreszcens festések elvégzése céljából. A festéseket a plate-be történt áthelyezés után 24 óra múlva végeztük el.

5.2.1.4 *Az immunreakciók értékelése (szemikvantitatív analízis)*

Az immunreakciók erősségét és kiterjedését két, egymástól független vizsgáló értékelt. A TRIC ellenes antitesttel végzett vizsgálatokban a szemikvantitatív analízis a következők szerint zajlott: tíz random kiválasztott nagy nagyítású látótérben (400X) 100-100 sejtet vizsgáltunk. A reakciót lineáris vagy pontszerű membranózus festődés estében értékeltük pozitívként. Az EZH2 esetében tíz random kiválasztott nagy nagyítású látótérben (400X) 100-100 sejtet vizsgálva a nukleáris reakciót értékeltük. Hasonló módon vizsgálva az előzőekhez, a β-catenin esetében a nukleáris, illetve a citoplazmatikus kifejeződést is értékeltük. Az Arg-1 értékelésénél a nukleáris vagy citoplazmatikus festődést tekintettük pozitívként. Minden metszet kapott pontértéket, mely a pozitívan festődő sejtek százalékos arányából, illetve a festődés intenzitásának összegéből tevődött össze.

A reakcióerősség pontértékei a következők voltak: 0 pont – negatív reakció; 1 pont – gyenge reakció; 2 pont – közepes reakció; 3 pont – erős reakció. A pozitívan festődő sejtek százalékos arányát a következők szerint adtuk meg:

3 pont = 66-100%

2 pont = 31-65%

1 pont = 6-30%

0 pont = ≤ 5%.

Az összesített pontértékek (intenzitás+százalék) 0-6 között mozogtak. A 0 pontot negatívnak tekintettük immunhisztokémiai szempontból.

A minták elemzésekor a megelőző kemoterápia eredményeképpen fennálló nekrozist, esetleges vérzéseket és a nagymértékű kötőszövet jelenlétét nem értékeltük.

5.2.2 Immunfluoreszcens vizsgálatok

A HB mintákon a pontosabb detektálás érdekében tricellulin, a fetális májmintákon pedig a tricellulin és EZH2 primer antitestekkel fluoreszcens immunhisztokémiai vizsgálatot végeztünk. A minták a beérkezést követően azonnal feldolgozásra kerültek, a kivágás után folyékony nitrogénben (-147°C, Messer Hungarogáz Kft) rögzítettük őket, majd a feldolgozásig -80°C-on tároltuk a mintákat. A vizsgálathoz öt HB esetből (7, 11, 12, 13, 16) állt rendelkezésünkre minta. A magzati májak esetében tíz esetből végeztünk immunfluoreszcens vizsgálatot.

Fagyasztókamrás mikrotom készülékben (Shandon Cryotome® Cryostat, Thermo Electron Corporation, Waltham, Massachusetts, USA) -23°C -on 4-5 µm vastagságú metszeteket készítettünk. A metszeteket kiengedés után 70%-os etanolban szobahőn 10 percig fixáltuk, majd szárítottuk szobahőn öt percig. 3x5 perces, szobahőmérsékleten 10%-os PBS-el történő átmosás után a nem specifikus protein kötőhelyek blokkolása céljából Protein Block Serum-Free oldattal (Dako Cytomation, Glostrup, Denmark, kód: X0909) inkubáltunk szobahőn, 30 percig, nedves kamrában. A protein blokkoló oldatot nem mostuk ki, csak körbevitattuk a mintát. Ezután az 5. táblázatban leírt tricellulin és EZH2 antitestekkel - a leírt koncentrációkban Ventana Antibody Diluentben hígítva- egy éjszakán át (overnight), 4°C-on inkubáltuk a mintákat. 2x5 perces 10%-os PBS-s átmosást követően Alexa Fluor 488 (donkey anti mouse IgG, donkey anti rabbit IgG, Invitrogen, Eugene, Oregon, USA, LOT: 41225A, 556439) és Alexa 568 (goat anti rabbit IgG, goat anti mouse IgG, Invitrogen, Eugene, Oregon, USA, LOT: 633194, 84E1-1) jelölt antitesteket alkalmaztunk (1:200 hígításban) 45 percig szobahőmérsékleten. A magfestéshez és lefedéshez 4',6-diamino-2 phenylindole-t (DAPI) tartalmazó Mounting Medium for fluorescence with DAPI fedőanyagot alkalmaztunk (Vectashield, Vector Labs., Burlingame, CA, USA, LOT: H-1200). A reakciókat Leica DM-RXA széleslátóteres fluoreszcens mikroszkóp segítségével értékeltük és fotóztuk (Leica, Wetzlar, Germany), a képeket Leica CW4000 FISH Visualisation and Documentation Software (Leica Microsystems Imaging Solutions Ltd., Wetzler, Germany) segítségével dokumentáltuk.

A Hep3B, HepG2, HEK-293 és HUH-7 sejtvonalakon végzett immunfluoreszcens vizsgálatok lépései a fixálási lépéstől eltekintve megegyeznek a humán mintákon leírtakkal. A sejtek esetében négy különböző fixálási technikát alkalmaztunk a

legmegfelelőbb és legjobb eredményt adó technika kiválasztása érdekében: 70% etanol, metanol-propanol 1:1, metanol-ecetsav 1:1, metanol aceton 1:1 arányú keverékével.

5.3 Statisztikai módszerek

Mintáink nem követték a normál eloszlást, így a különböző csoportok (fetális, embrionális hepatoblastoma és a környező, nem tumoros máj) közötti immunhisztokémiai score értékek összehasonlítására a nem parametrikus Kruskal-Wallis ANOVA tesztet alkalmaztuk. Hasonló okból kifolyólag a hepatoblastoma minták (fetális és embrionális komponenst együtt értékelve) és a környező, nem tumoros minták közötti különbséget a Mann-Whitney U teszt segítségével értékeltük. A klinikai paraméterek vizsgálata esetén Fisher féle exact tesztet alkalmaztunk. A kilenc embrionális/fetális esetben négyben a fetális sejtek aránya 30-50% volt, így ezt a négy esetet nem vontuk be a túlélési analízisbe, hiszen nem lenne egyértelmű és mérvadó a szövettani besorolásuk. A teljes túlélésen (overall survival) a diagnózis felállításától 2013 márciusáig vagy a halál bekövetkezéséig eltelt időt vettük hónapokban kifejezve. Az eseménymentes túlélés (event free survival) alatt pedig a diagnózis és a recidíva/metasztázis kialakulásáig eltelt időt értjük. Ha nem következett be recidíva/metasztázis kialakulása, akkor az utolsó kontroll és a diagnózis felállítása között eltelt időt számítottuk hónapokban kifejezve. A túlélési analízist (teljes túlélés és eseménymentes túlélés) Kaplan-Meier módszerrel végeztük, a kapott túlélési görbék összehasonlításához log-rank tesztet végeztünk. A statisztikai analíziseket a STATISTICA 9.0 segítségével végeztük (StatSoft Inc., OK, USA). Az eredmények értékelésekor $p < 0,05$ változást tekintettünk statisztikailag szignifikáns különbségnek.

5.4 Egyéb módszerek

A hepatoblastoma minták vizsgálatának kezdetekor a manapság sokat vizsgált kis szabályozó RNS molekulák, a miRNS-ek expressziójáról humán hepatoblastomában kevés adattal rendelkezünk. Így külön indult vizsgálat a HB minták miRNS és immunhisztokémiai profiljának felderítése céljából. Ezen molekuláris vizsgálatok során magam a munkafázis egyes stádiumaiban vettem részt; így az anyaggyűjtésben, a minták

pontos szövettani diagnózisának átnézésében, RNS izolálásban, a kapott eredmények túléléssel való vizsgálatában és kiértékelésében. A disszertációmban eddig leírt immunhisztokémiai vizsgálatok képezték az alapját a már önállónak tekinthető munkámnak. A molekuláris módszertannal kapcsolatos közleményben, munkatársként vettem részt (Gyugos és mtsai 2014). Mivel az ezen cikkben ismertetett molekuláris patológiai vizsgálatokkal kapcsolatos munka a továbbiakban nem kerül a disszertáció során elemzésre, és értékelésre, bár alapját képezte a jelen munkának, az értekezésemben a Gyugos és mtsai (2014) cikkben részletesen ismertetett metodikai részletekre nem térek ki.

6 EREDMÉNYEK

6.1 Immunhisztokémiai vizsgálatok és statisztikai analízis eredményei

6.1.1 Argináz-1, β -catenin, EZH2 és tricellulin fehérjék expressziójának vizsgálata immunhisztokémiai módszerrel a tumormentes, környező májmintákon

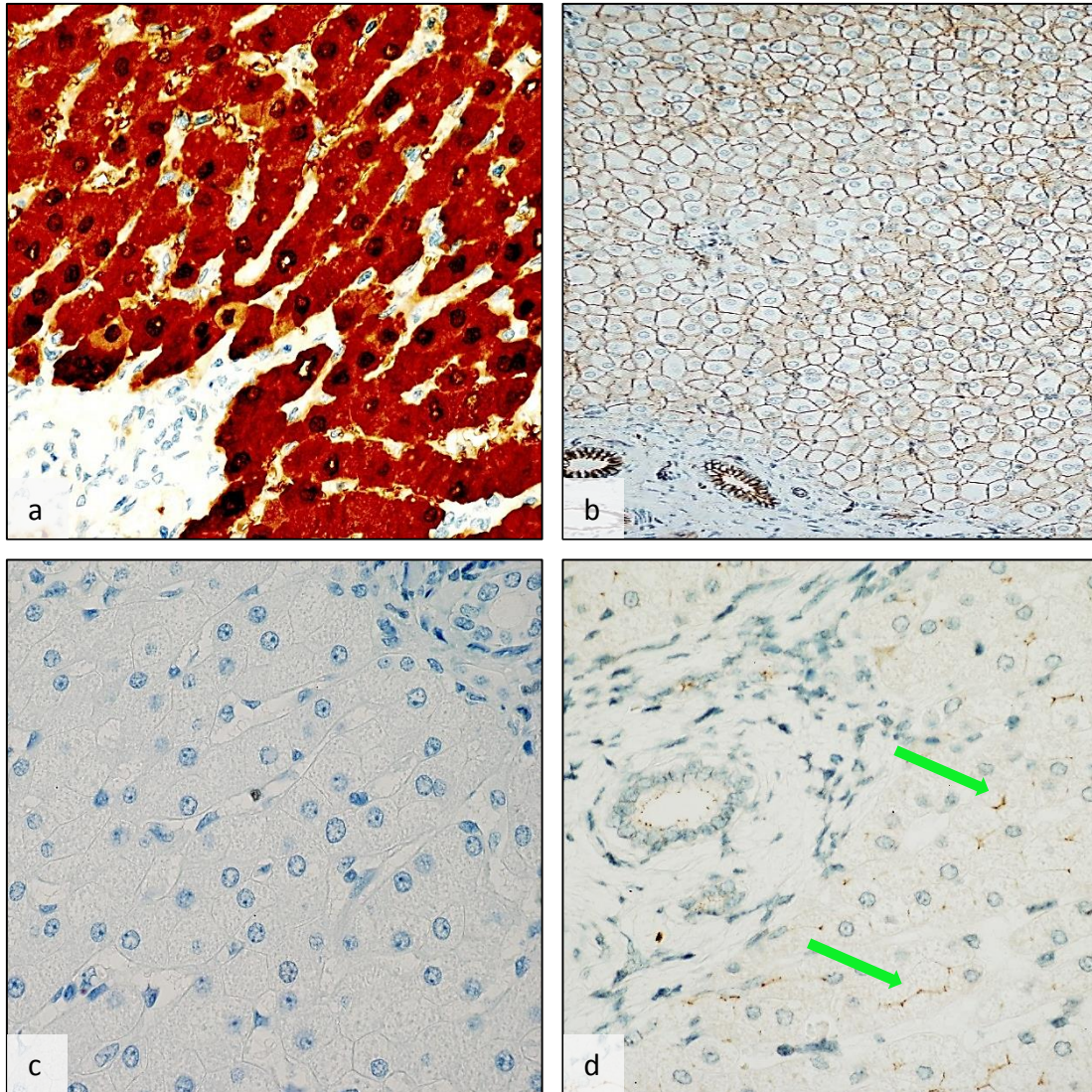
Az immunreakciónál a következő festődési mintázatot találtuk: az argináz-1 esetében nukleáris/citoplazmatikus, a β -catenin esetében membranózus, az EZH2-nél nukleáris, míg a tricellulinnál membranózus mintázatot találtunk. A vizsgált fehérjék expressziós mintázata hasonlónak bizonyult az irodalomban már korábban közölt adatokkal.

Az argináz-1 50-50%-ban mutatott erős nukleáris és/vagy citoplazmatikus festődést a hepatocyták 100%-ban, jelezve ezzel a nagymértékű specificitását ezen sejtekre. A portális traktus képletei (beleértve a biliáris traktust, artériákat és vénákat) nem mutattak festődést (7. a ábra).

A β -catenin a tumormentes környező májban nem mutatott nukleáris/citoplazmatikus festődést, a hepatocytákban és a biliáris képletekben egyforma erősségű membranózus expressziót láttunk (7. b ábra).

Az EZH2 elleni antitesttel sem a hepatocyták, sem a biliáris traktus képletei nem mutattak festődést az általunk vizsgált májminták egyikében sem (7. c ábra).

A tricellulin membranózus expresszióját a minták 100%-ban észleltük, leginkább pontszerű akkumulációként megjelenve három sejt találkozásánál. A tricellulin immunreakciók intenzitása változó volt a különböző tumormentes, környező májminták között. Ugyanakkor általában a hepatocyták apikális pólusa és a biliáris hámsejtek intenzívebb reakciót mutattak, így az epítói pozitívítást egyfajta belső kontrollként értékeltük és tekintettük a reakciók elemzésénél (7. d ábra).

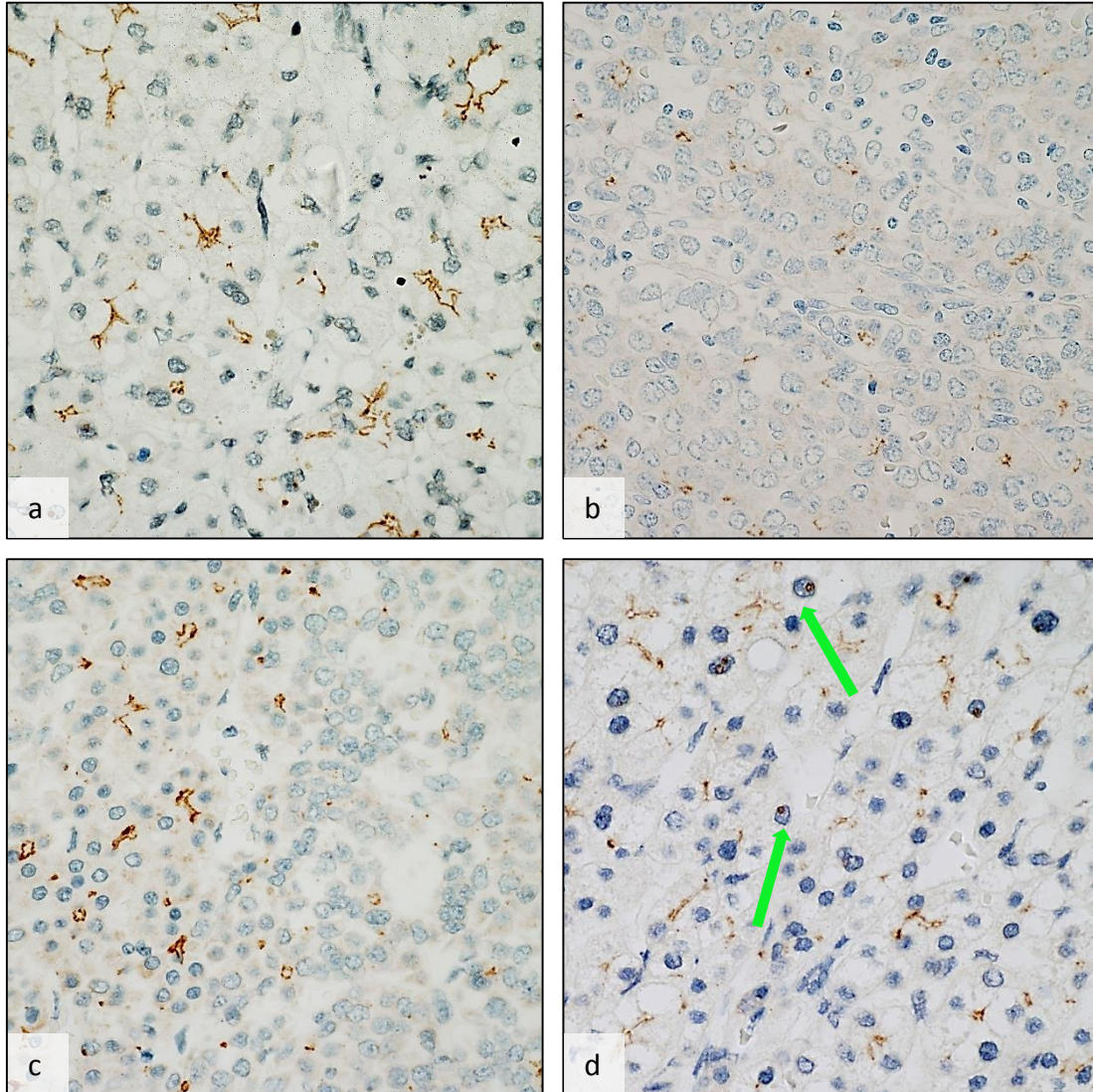


7. ábra. Argináz-1, β -catenin, EZH2 és tricellulin expressziója tumormentes, környező májmintákon. Intenzív nukleáris/citoplazmatikus Arg-1 (a), membranózus β -catenin (b), negatív EZH2 (c) és pontszerű TRIC (d) immunhisztokémiai festődése (600 \times).

6.1.2 **Tricellulin** expressziójának vizsgálata humán hepatoblastomában

Membranózus vagy pontszerű TRIC expressziót a minták 90%-ban találtunk (19/21 eset). A tumormentes, környező májminták mindegyike (16/16 eset) expresszálta különböző mértékben a fehérjét. A jól differenciált fetális szubtypus sejtjeiben intenzív és kiterjedt expressziót láttunk a tumorsejtek membránja mentén, néhol lineáris membranózus, máshol pedig pontszerű megjelenés formájában. Az embrionális komponens sejtjeiben kevésbé intenzív reakciót találtunk, illetve a festődő sejtek százalékos aránya is kevesebbnek bizonyult a fetális sejtek TRIC expressziójához képest.

Az embrionális sejteken pontszerű akkumulációként expresszáldott a fehérje, a festődés leginkább a sejtek által alkotott pszeudorozetták apikális pólusára terjedt ki. A TRIC expresszióját a hepatoblastoma különböző komponenseiben a 8. ábra szemlélteti.

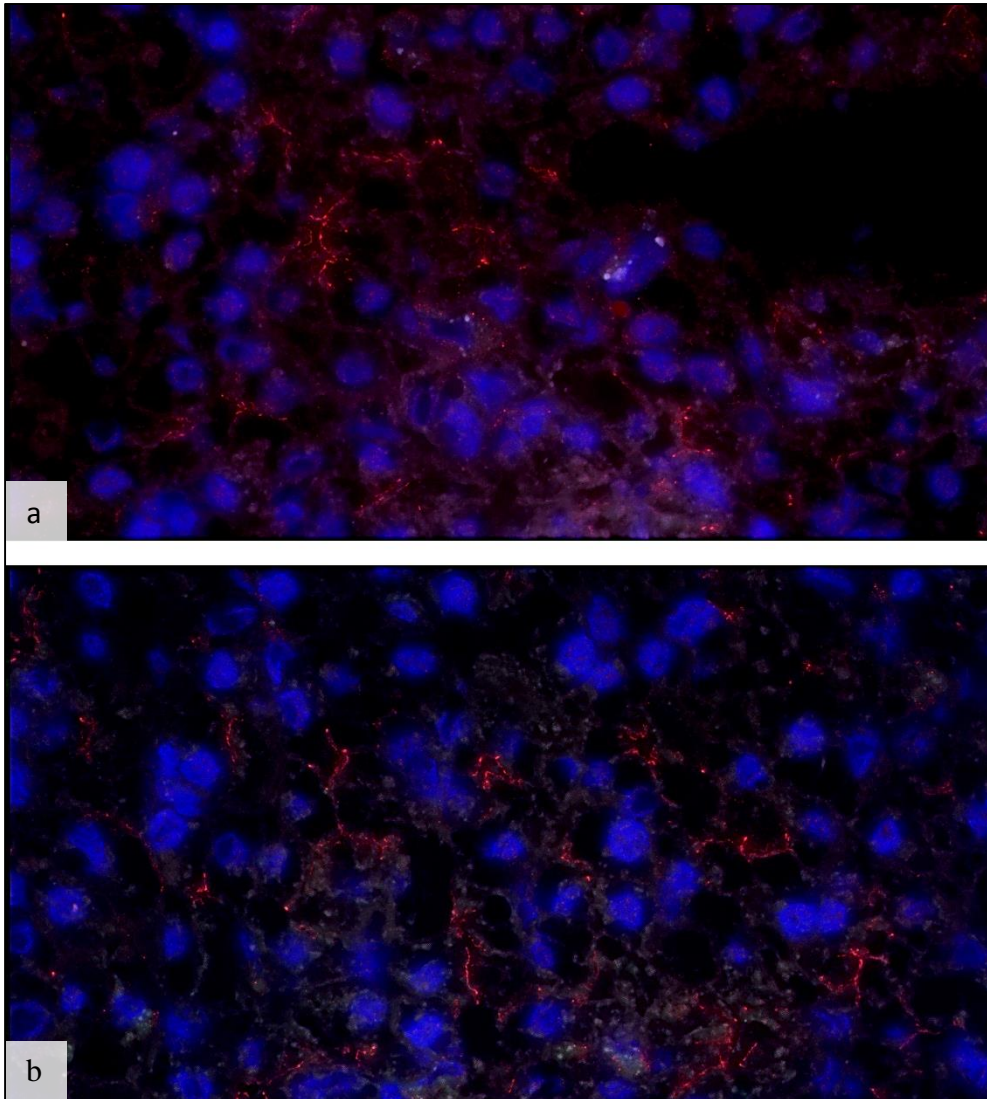


8. ábra. Tricellulin expressziója humán hepatoblastomában. A fetális sejtek (a) membránjuk mentén nagymértékben expresszálják a fehérjét, különösen az apikális pólus mentén. Az embrionális sejteken (b) pontszerű akkumulációként, a pszeudorozetták apikális pólusán fejezik ki a fehérjét. A két komponens eltérő TRIC expressziója (c) ábrán látható. A (d) ábrán jól látható a nukleáris TRIC expresszió (nyilak) (600x).

Megfigyeltük továbbá, hogy a 21 hepatoblastoma minta kis részében, 5 esetben (24%) az elvárt membranózus TRIC expresszió helyett a tumorsejtek 2-3%-ban nukleáris lokalizációt mutatkozott. A minták megoszlását tekintve négyfetális és egy embrionális

szubtípusúak voltak. Ezekben a sejtekben a nukleáris lokalizáció mellett általában nem mutattak membrános reakciót. A TRIC nukleáris lokalizációját a 8.d ábra mutatja.

A TRIC lokalizációjának pontosabb meghatározásához immunfluoreszcens festéseket végeztünk (9. a és b ábra). A rendelkezésre álló öt fagyasztott mintánk mind tisztán fetális szubtípusúnak bizonyult, a tumorsejtek membránjuk mentén, főleg az apikális póluson expresszálták a fehérjét.



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

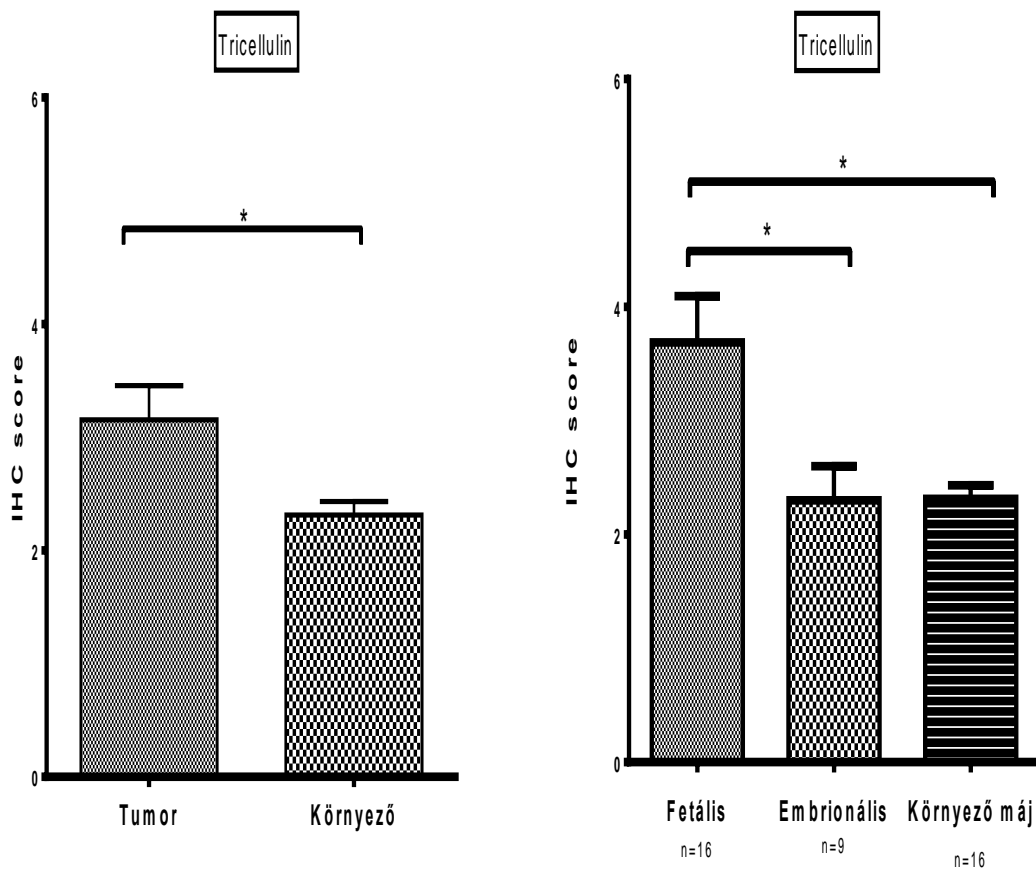
Az immunreakció intenzitása és festődő sejtek aránya is szignifikánsan magasabbnak ($p=0.04$) bizonyult a HB tumoros mintákban a tumormentes, környező májhoz

viszonyítva. A fetális szubtypus szignifikánsan ($p=0.023$) magasabb IHC score értéket mutatott az embrionális komponenshez képest. A tumormentes, környező májhoz képest is a fetális sejtek szignifikánsan magasabb ($p=0.001$) score értéket mutattak. Az embrionális komponens TRIC expressziója szignifikánsan nem tért el a tumormentes minták TRIC expressziójához képest. A statisztikai analízis eredményeit a *10. táblázat* szemlélteti.

10. táblázat. Tricellulin immunreakció szemikvantitatív értékelése. A megadott értékek az első három oszlopban a Kruskal-Wallis ANOVA teszt, az utolsó oszlopban a Mann-Whitney U teszt során kapott szignifikancia értékeket (p értéket) mutatja. A szignifikáns értékeket vastagon szedve jeleztem. vs= viszonyítva (versus).

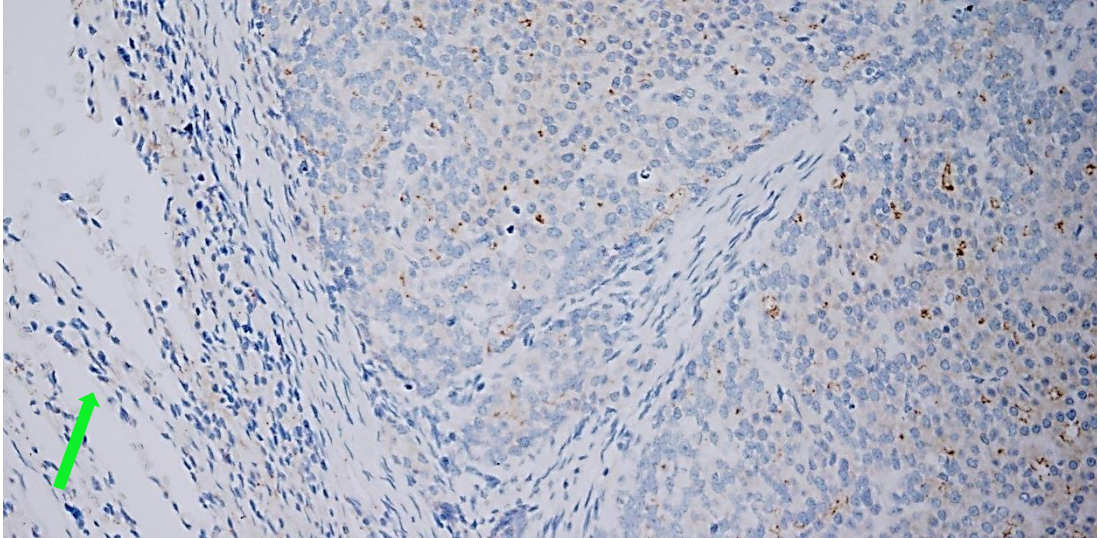
	Fetális vs embrionális	Fetális vs környező máj	Embrionális vs környező máj	Tumor vs környező máj
Tricellulin	0.023	0.001	>1 NS	0.04

Az TRIC expresszió vizsgálatának eredményeit hepatoblastoma mintákon grafikonok segítségével - a középérték és a standard hiba (SEM) megadásával- a *11. ábra* mutatja.



11. ábra. A tricellulin fehérje expressziójának vizsgálata hepatoblastoma fetális és embrionális komponenseiben a szemikvantitatív immunhisztokémiai pontrendszer függvényében. a), A tumormentes, környező májban szignifikánsan alacsonyabb ($p < 0.04$) score értéket kaptunk. b), A fetális komponensben szignifikánsan magasabb értéket ($p = 0.023$) kaptunk az embrionális komponenshez és a környező májhoz ($p = 0.001$) viszonyítva. Az embrionális komponensben nem találtunk szignifikánsan eltérő értéket a környező májhoz viszonyítva ($p < 0.001$). A * jelölés a szignifikáns különbséget jelzi. Mean és SEM

Az egyik hepatoblastoma eset rendelkezésünkre álló távoli, tüdő áttétjében is pozitív TRIC reakció mutatkozott (12. ábra). Az áttétes eset embrionális/fetális szubtypusnak bizonyult, a két komponens egymással nagymértékben keveredve fordult elő. Mindkét szubtypus sejtei pozitív reakciót mutattak TRIC elleni antitesttel, hasonlóan a primer tumorhoz.

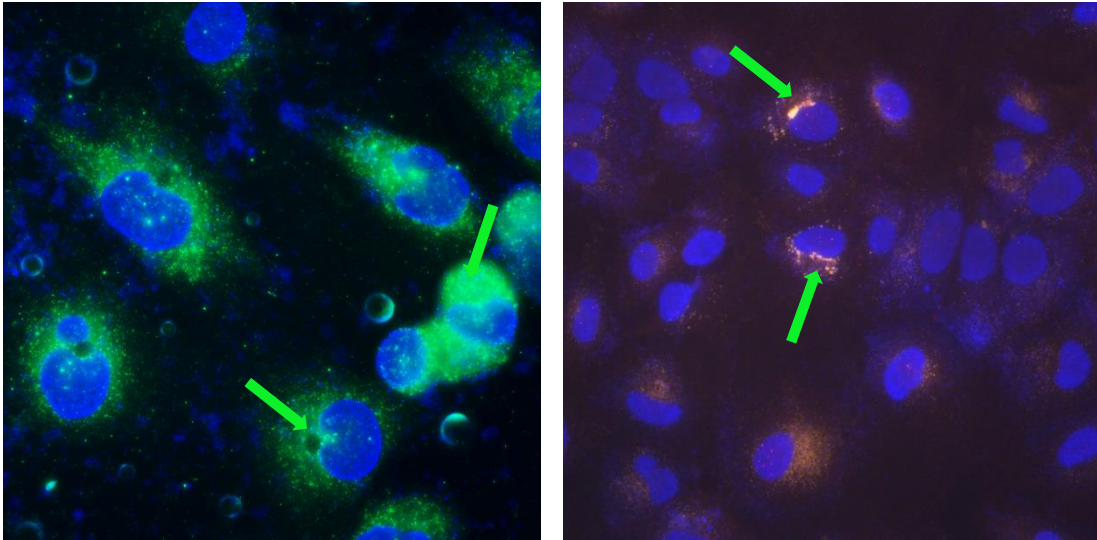


12. ábra. A Tricellulin expressziója hepatoblastoma tüdő áttétjében. fetális/embrionális szubtypusú daganatszövet sejtjei nagymértékben kifejezik a fehérjét. A daganatszövet mellett az alveolusok is látszódnak (nyíl) (200x).

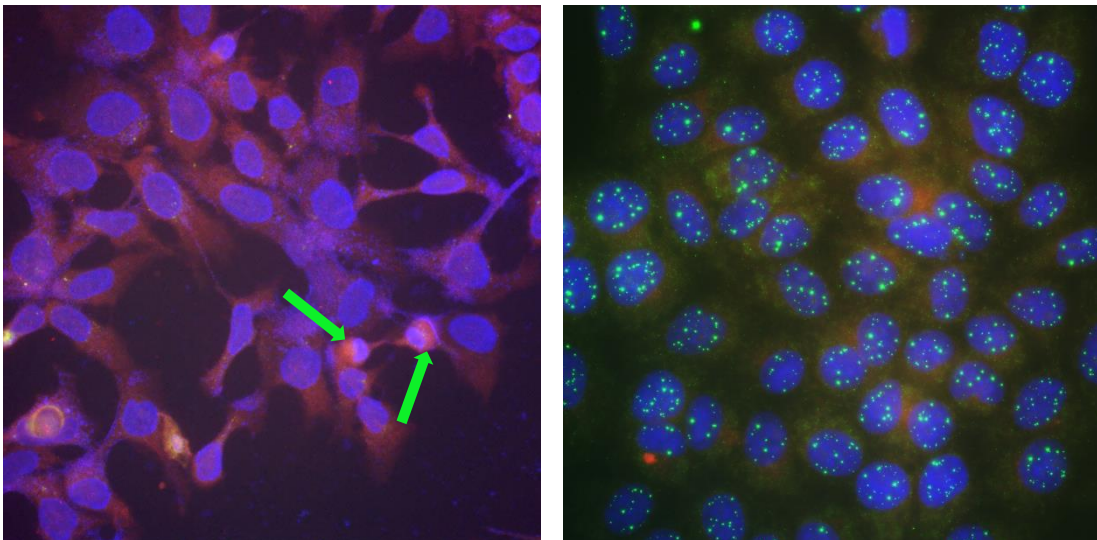
6.1.3 Tricellulin vizsgálata sejtvonalakban

A hepatoblastoma mintákban észlelt nukleáris TRIC lokalizáció további vizsgálata révén immunfluoreszcens festéssel vizsgáltunk négykülönböző sejtvonalat, melyekben jól ismert a tricellulin jelenléte. Az „Anyag és módszerek” fejezetben ismertetett módon a sejtvonalak különböző módon lettek fixálva minden esetben, de a különböző fixálási eljárások nem befolyásolták a reakciók kimenetelét, a festődés jellegét.

A HUH-7 és HEK 293 sejtekben nem találtunk erős TRIC membranózus festődést, leginkább gyenge, citoplazmatikus lokalizációt láttunk. A citoplazmatikus festődés a HEK 293 sejt vonal esetében erősebbnek bizonyult. A 13. ábra mutatja a HEK 293 és a HUH 7 sejtek TRIC expresszóját. A Hep3B hepatocelluláris carcinoma sejt vonalon szintén nem láttunk membranózus TRIC expressziót, a tumorsejtek citoplazmájukban expresszálták a fehérjét (14. a ábra). Ezzel szemben, a sokak által hepatoblastoma sejt vonalnak is mondott HepG2 sejteken a sejtek 100%-ban erős, diffúz, egyenletes intranukleáris TRIC festődést tapasztaltunk (14. b ábra).



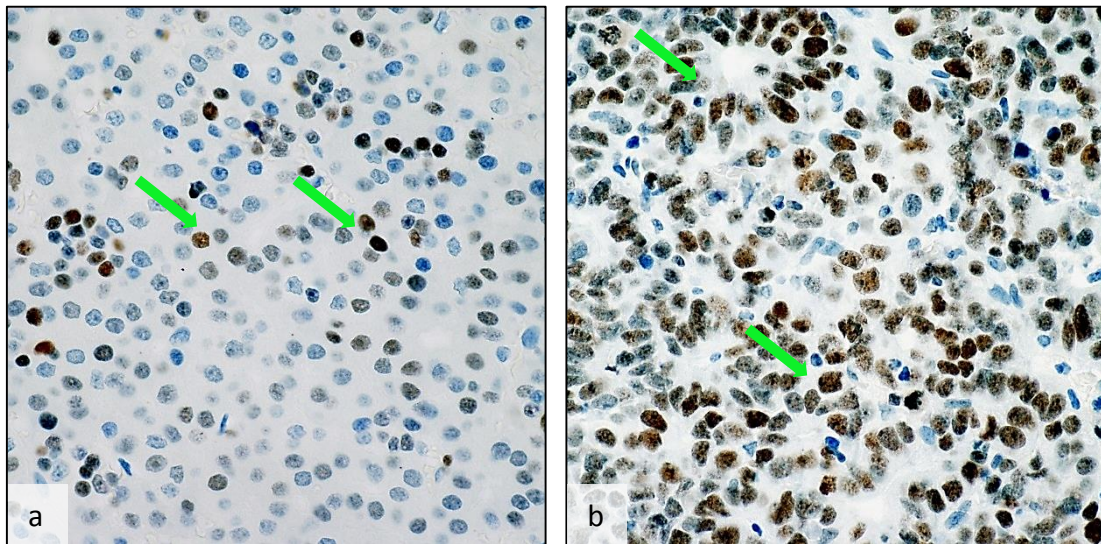
13. ábra. HEK 293 és HUH-7 sejtek TRIC expressziója. A HEK 293 sejtvonalt (a) erős citoplazmatikus és gyengébb nukleáris SpectrumGreen jelet adott. A HUH-7 sejtek (B) gyenge citoplazmatikus SpectrumRed jelet adtak (nyilak). Egyik sejtvonalt sem mutatott membránózus TRIC mintázatot. Alexa 488: SpectrumGreen (zöld); Alexa 568: SpectrumRed (piros); DAPI (kék) magfestés. Eredeti nagyítás 600x.



14. ábra. Hep3B és HepG2 sejtvonalt TRIC immunfluoreszcens festődése. A hepatocelluláris Hep3B (a) sejtvonalt citoplazmatikus SpectrumRed jelet adott a TRIC (nyilak). A HepG2 sejtvonalt (b) erős, pontszerű diffúz eloszlású nukleáris SpectrumGreen TRIC jelet mutatott. Egyik sejtvonalt sem mutatott membránózus TRIC mintázatot. Alexa 568: SpectrumRed (piros); Alexa 488: SpectrumGreen (zöld); DAPI (kék) magfestés. Eredeti nagyítás 600x.

6.1.4 EZH2 immunreakció humán hepatoblastomában

Nukleáris EZH2 reakciót mind az embrionális, mind a fetális sejtekben észleltünk, a hepatoblastoma minták mindegyikében (15. ábra) (21/21 eset). Mindkét komponensben a reakció intenzitása a közepes és nagyon intenzív között mozgott. Ugyanakkor, a tumormentes, környező májminták egyikében sem találtunk festődést az EZH2 elleni antitesttel. Ezekben a mintákban sem a portális triászt alkotó hepatikus artériákat és portális vénákat bélelő endothél sejtek, sem pedig a biliáris epithelilális sejtek nem mutattak festődést. Mind a festődő sejtek százalékos aránya, mind a festődés intenzitása szignifikánsan magasabb volt az embrionális sejtekben ($p= 0.047$) a fetális sejtekkel összehasonlítva. Mindkét tumor szubttípus szignifikánsan magasabb immunhisztokémiai score értéket mutatott a tumormentes, környező májhoz viszonyítva ($p< 0.001$). A statisztikai analízis eredményeit a 11. táblázat tartalmazza.

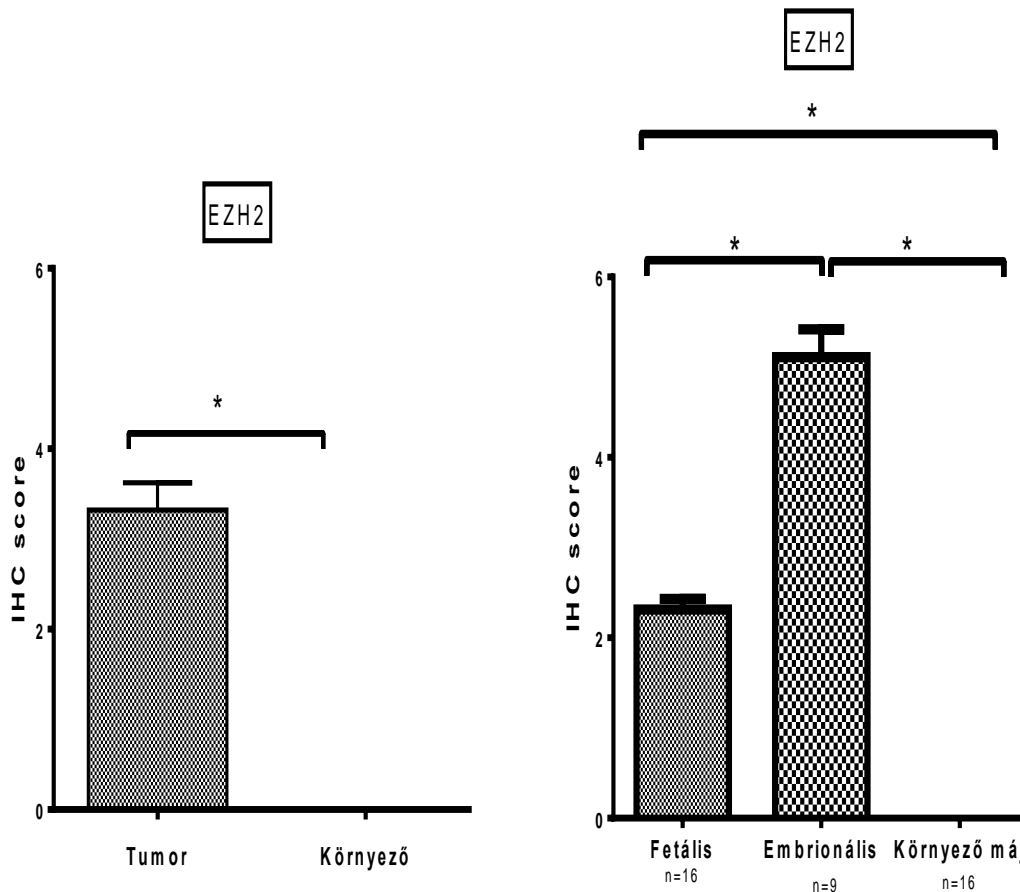


15. ábra. EZH2 immunreakció hepatoblastoma mintákon. A fetális (a) és embrionális (b) sejtek is nagymértékben expresszálják a fehérjét (600x).

11. táblázat. EZH2 immunreakció szemikvantitatív értékelése. A megadott értékek az első három oszlopban a Kruskal-Wallis ANOVA teszt, az utolsó oszlopban a Mann-Whitney U teszt során kapott szignifikancia értékeket (p értéket) mutatja. A szignifikáns értékeket vastagon szedve jeleztem. vs= viszonyítva (versus).

	Fetális vs embrionális	Fetális vs környező máj	Embrionális vs környező máj	Tumor vs környező máj
EZH2	0.047	<0.001	<0.001	<0.001

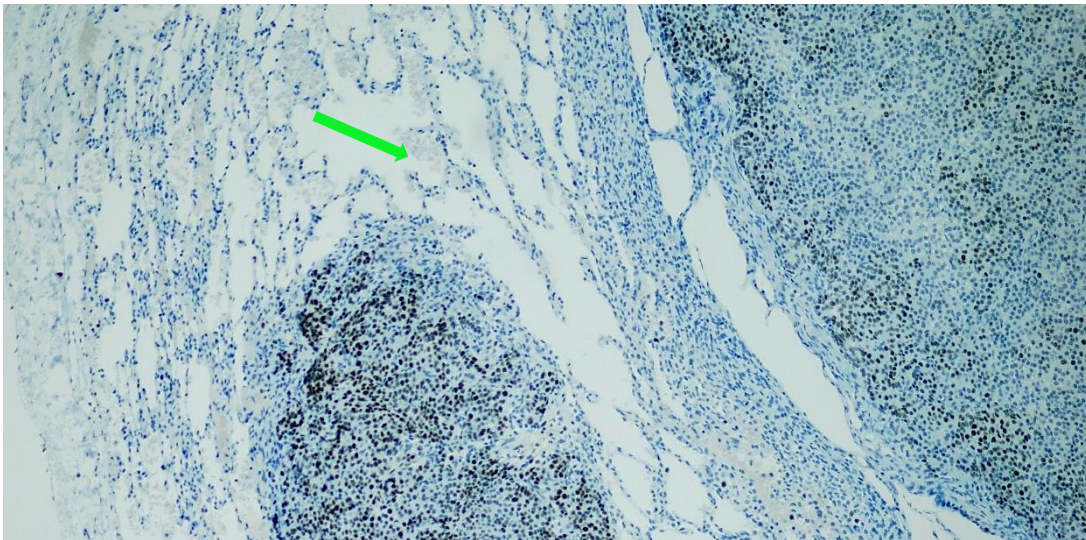
Az EZH2 expresszió vizsgálatának eredményeit hepatoblastoma mintákon grafikonok segítségével - a középérték és a standard hiba (SEM) megadásával- a 16. ábra mutatja.



16. ábra. Az EZH2 fehérje expressziójának vizsgálata hepatoblastoma fetális és embrionális komponenseiben a szemikvantitatív immunhisztokémiai pontrendszer függvényében. a), A negatív, tumormentes, környező májban szignifikánsabb alacsonyabb ($p < 0.001$) score értéket kaptunk. b), Az embrionális komponensben szignifikánsan magasabb értéket ($p = 0.047$) kaptunk a fetális komponenshez és a környező májhoz ($p < 0.001$) viszonyítva. A fetális

komponensben szintén magasabb EZH2 expressziós értéket kaptunk a környező mákhoz viszonyítva ($p < 0.001$). A * jelölés a szignifikáns különbséget jelzi. Mean és SEM

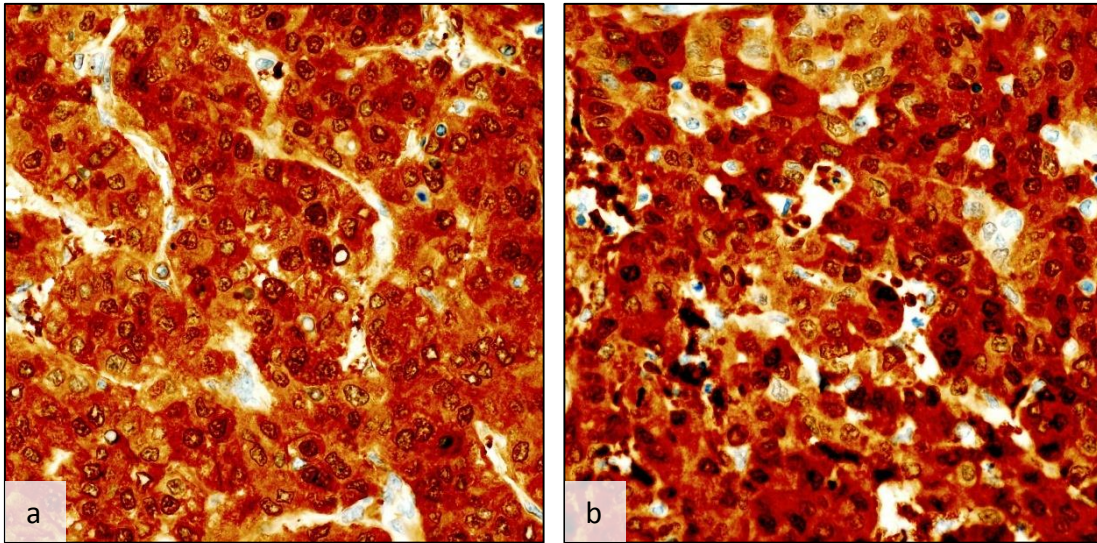
Az egyik hepatoblastoma eset rendelkezésünkre álló távoli, tüdő áttétjében is pozitív EZH2 reakció mutatkozott (17. ábra). Az áttétes eset embrionális/fetális szubtypusnak bizonyult, a két komponens egymással nagymértékben keveredve fordult elő. Mindkét szubtypus sejtjei pozitív reakciót mutattak EZH2 elleni antitesttel, hasonlóan a primer tumorhoz.



17. ábra. EZH2 reakció hepatoblastoma tüdő áttétjében. A fetális/embrionális szubtypusú daganatszövet sejtjei nagymértékben kifejezik a fehérjét. A daganatszövet mellett az alveolusok is látszódnak (nyíl) (100x).

6.1.4.1 EZH2 és nukleáris β -catenin asszociációja

Elemmezve a fent említett két fehérje expresszióját a hepatoblastoma különböző epitheliális szubtypusaiban, a következő megállapításokat tehetjük. Az EZH2 expresszióját a HB minták 100%-ban, míg nukleáris β -catenin expressziót a minták 81%-ban találtunk. Mindkét fehérje esetében a terület százalékos pozitivitás és a festődés intenzitása is az embrionális komponensben mutatkozott magasabbnak. Mindkét esetben a fehérjék expressziója szignifikánsan magasabb volt a jól differenciált fetális komponenshez viszonyítva. Szintén hasonló módon, egyik fehérje sem mutatott festődést a tumormentes, környező májban. A két fehérje együttes expresszióját a 18. ábra szemlélteti.



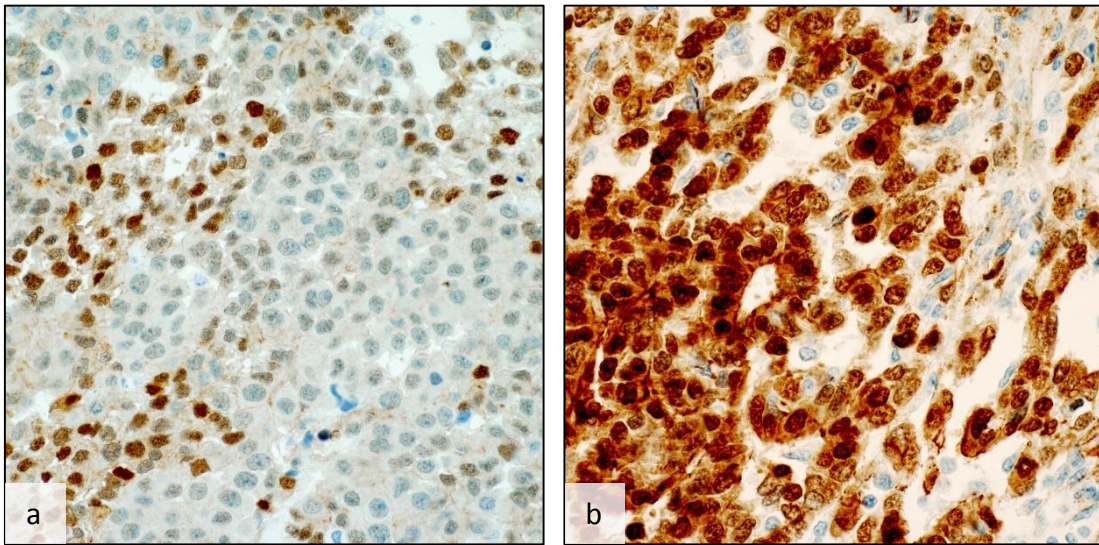
19. ábra. Intenzív argináz-1 festődés hepatoblastomában. Nem mutatkozott különbség a nukleáris/citoplazmatikus festődés tekintetében a fetális (a) és embrionális (b) szövettani szubtypusban (600x).

12. táblázat. Argináz-1 immunreakció szemikvantitatív analízise A megadott értékek az első három oszlopban a Kruskal-Wallis ANOVA teszt, az utolsó oszlopban a Mann-Whitney U teszt során kapott szignifikancia értékeket (p értéket) mutatja. vs= viszonyítva (versus), NS= nem szignifikáns.

	Fetális vs embrionális	Fetális vs környező máj	Embrionális vs környező máj	Tumor vs környező máj
Argináz-1	>1.00 NS	0.67 NS	0.15 NS	0.17 NS

Citoplazmatikus és/vagy nukleáris **β -catenin** expressziót a minták 95%-ban (20/21 eset) találtunk, szemben a tumormentes, környező májmintákkal, ahol csak membranózus reakciót tapasztaltunk (20. ábra). Csak nukleáris festődést a minták 81%-ban (17/21) találtunk. A nukleáris β -catenin expresszió tekintetében szignifikáns eltérést találtunk a két komponens között: az embrionális komponens sejtek szignifikánsan magasabb ($p= 0.016$) immunhisztokémiai pontértékkel (nagyobb százalékos pozitivitással) rendelkeztek a fetális sejtekhez viszonyítva. Mindkét komponensben

diffúz citoplazmatikus festődés is észlelhető volt a nukleáris festődés mellett, az embrionális tumor sejtek nagyobb arányban és intenzitással expresszálták citoplazmájukban is a β -catenint, ugyanakkor statisztikai analízissel nem találtunk szignifikáns különbséget. Mivel a tumormentes, környező májmintákban nem találtunk a β -catenin mutációját jelentő citoplazmatikus vagy nukleáris festődést, így érthető a szignifikáns különbség jelenléte a normál májminták és a tumoros komponensek között ($p < 0.001$ és $p = 0.006$). A statisztikai analízis eredményeit a 13. táblázatban tüntettem fel.

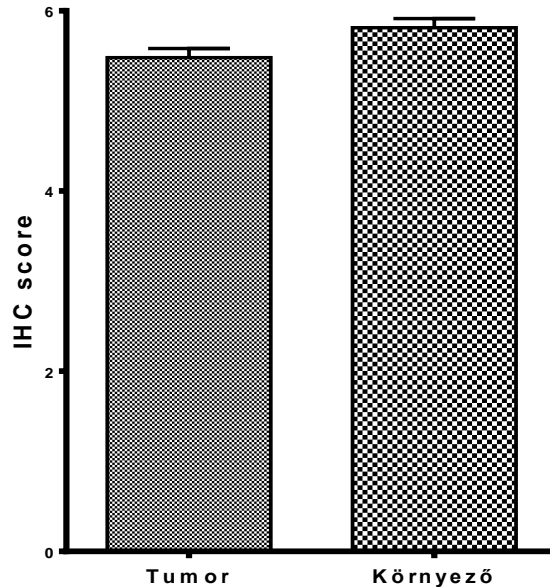


20. ábra. β -catenin fehérje expresszió humán hepatoblastomában. A fetális (a) és embrionális (b) tumorsejtek is expresszáltak nukleáris/citoplazmatikus β -catenint. A nukleáris festődés szignifikánsan magasabbnak mutatkozott az embrionális komponensben (600x).

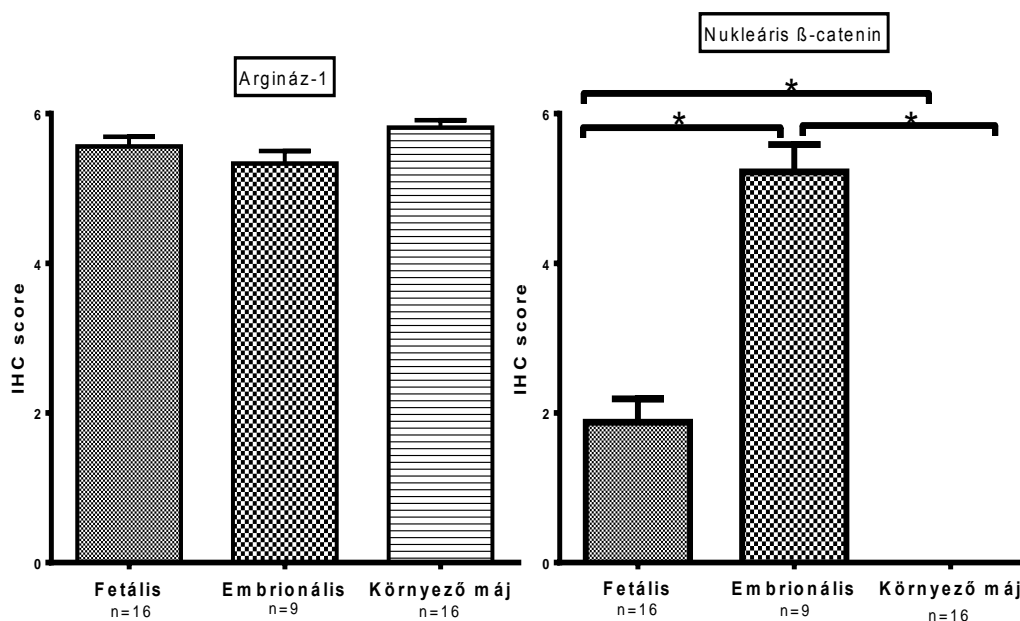
13. táblázat. β -catenin immunreakció szemikvantitatív értékelése. A megadott értékek az első három oszlopban a Kruskal-Wallis ANOVA teszt, az utolsó oszlopban a Mann-Whitney U teszt során kapott szignifikancia értékeket (p értéket) mutatja. A szignifikáns értékeket vastagon szedve jeleztem. vs= viszonyítva (versus), NS= nem szignifikáns.

	Fetális vs embrionális	Fetális vs környező máj	Embrionális vs környező máj	Tumor vs környező máj
Nukleáris β-catenin	0.016	0.006	<0.001	<0.001

Az argináz-1 és β -catenin expresszió vizsgálatának eredményeit hepatoblastoma mintákon grafikonok segítségével - a középérték és a standard hiba (SEM) megadásával - a 21. és 22. ábra mutatja.



21. ábra. Argináz-1 fehérje expressziója tumoros mintákon és tumormentes, környező májon az immunhisztokémiai score értékek függvényében. Nem mutatkozott szignifikáns különbség a két csoport között, közel azonos mértékű score értékeket kaptunk a két vizsgált csoportban. Mean és SEM



22. ábra. Argináz-1 és β -catenin fehérjék expressziója humán hepatoblastoma fetális és embriionális komponensében az immunhisztokémiai score értékek

függvényében. Az Arg-1 esetében nem találtunk szignifikáns eltérést a két epitheliális komponens, illetve a tumormentes, környező májminták között. A β -catenin esetében az epitheliális komponensben szignifikánsan magasabb ($p=0.016$) score értéket kaptunk a fetális komponenshez viszonyítva. A tumormentes, környező májmintákon nem találtunk abnormális β -catenin expressziót, mindkét tumor komponens nukleáris β -catenin expressziója szignifikánsan magasabb volt ($p=0.006$ és <0.001) a mintákon a tumormentes, környező májhoz képest. A * jelölés a szignifikáns különbséget jelzi. Mean és SEM

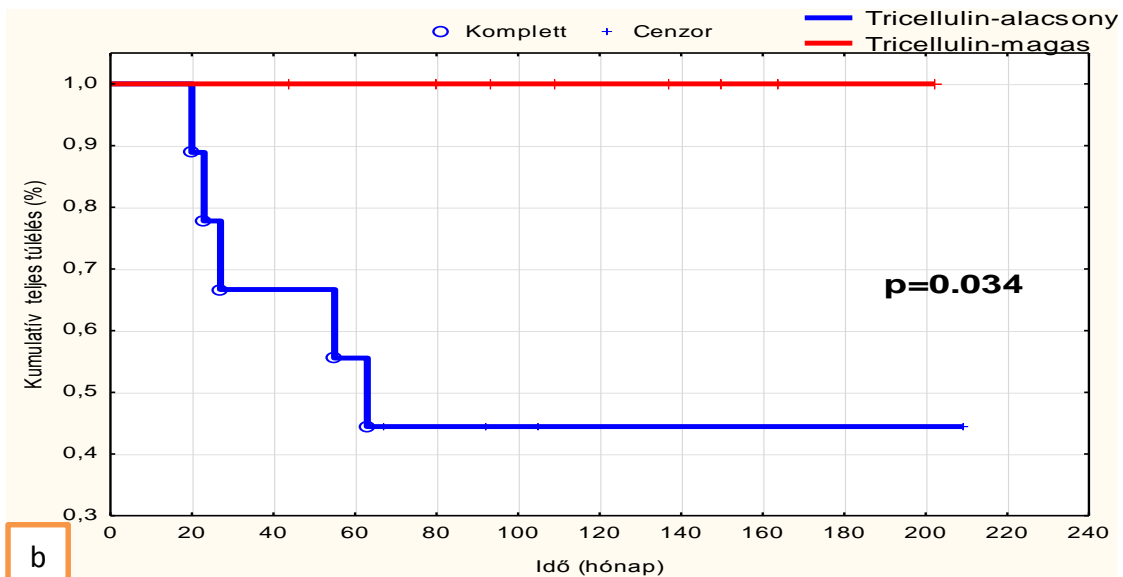
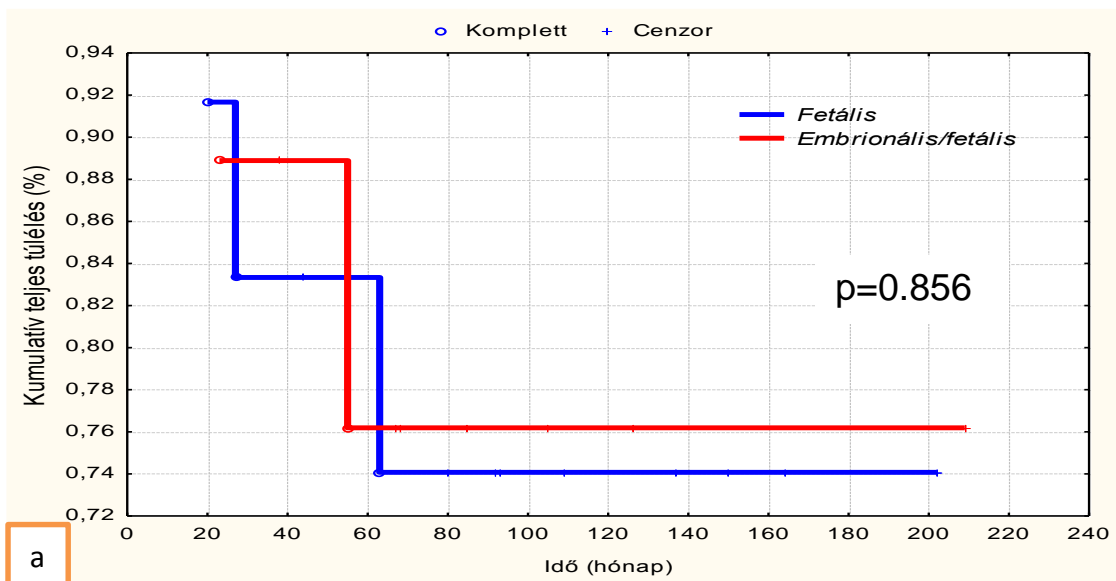
6.1.6 Hepatoblastoma esetek utánkötése

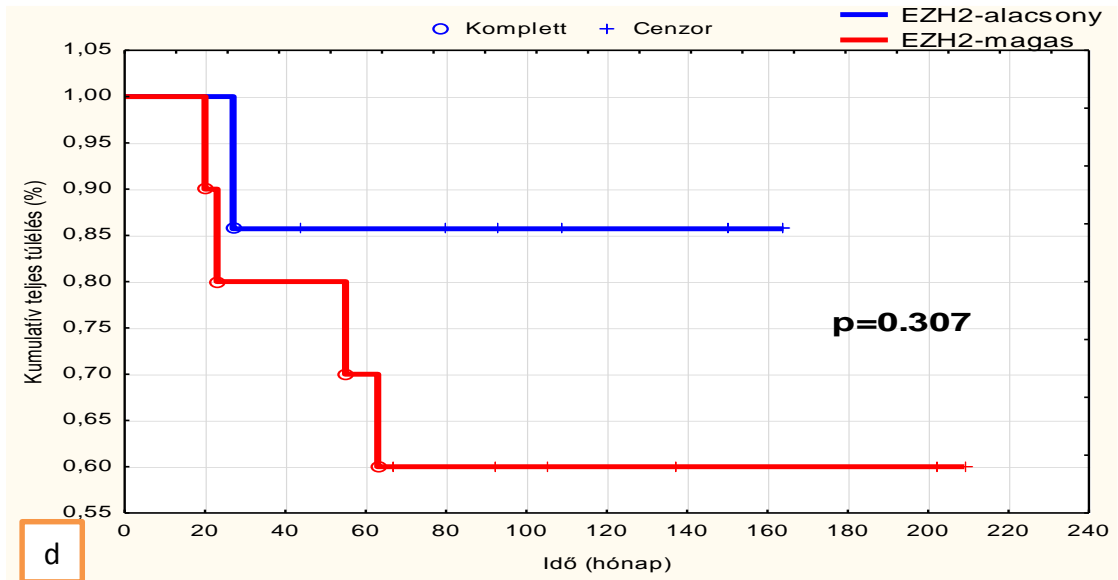
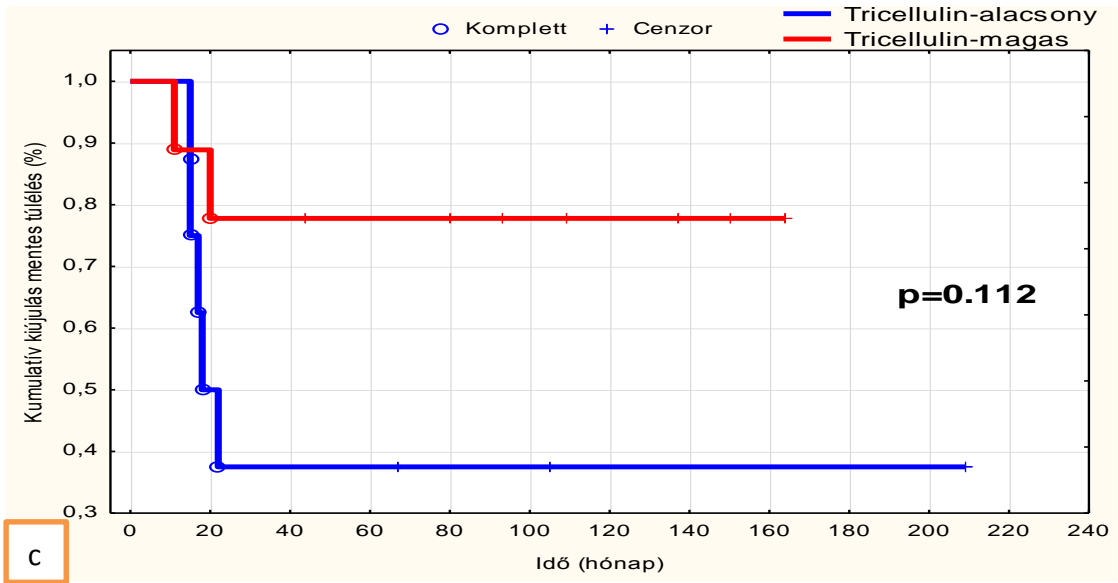
A 21 betegből a vizsgálatunk lezárásának időpontjáig öt beteg (24%) hunyt el, minden betegnél a betegség progrediálását állapították meg a halál okaként. A túlélési analízisbe a 21 betegből 17 esetet vontunk be, mivel a kilenc embrionális/fetális esetből a fetális komponens aránya négy esetben 30-50% között volt. Ezt a négy esetet nem vontuk be a túlélési analízisbe, hiszen félrevezető lenne vagy csak a fetális, vagy csak az embrionális IHC score eredményeket figyelembe venni. Így 12 tisztán fetális és öt embrionális/fetális eseten végeztük el a túlélési analízist. Csak a szövettani típust tekintve, nem volt szignifikáns különbség a fetális ($n=12$) és az embrionális/fetális ($n=5$) esetek teljes túlélésében (OS) és az eseménymentes túlélés (EFS) tekintetében sem (23. *a* ábra). Az átlag OS 97.35 hónapnak (20-209 hónap), az EFS 76.29 hónapnak bizonyult (11-209). Recidívát hét esetben (33%), míg távoli metasztázist hat esetben (28%) találtunk.

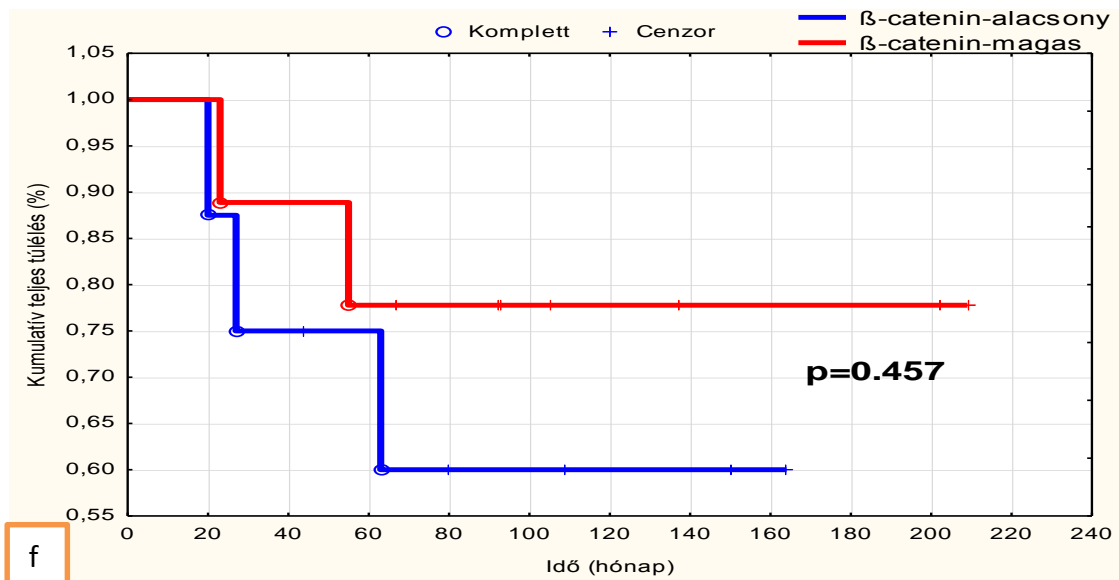
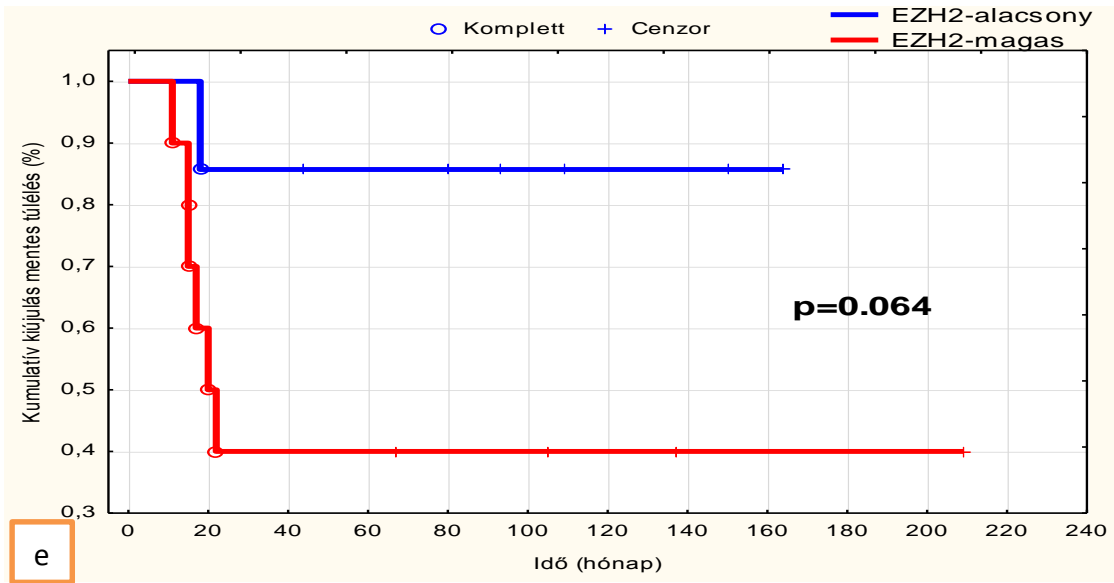
A Kaplan-Meier módszerhez az egyes csoportokat kettéválasztottuk az argináz-1, β -catenin, EZH2 és tricellulin expresszió alapján: az egyik csoport, amelyik magasan, a medián fölött expresszálja a fent nevezett fehérjéket, míg a másik csoport, amelyik alacsonyan, a medián alatt expresszálja a négy vizsgált fehérjét.

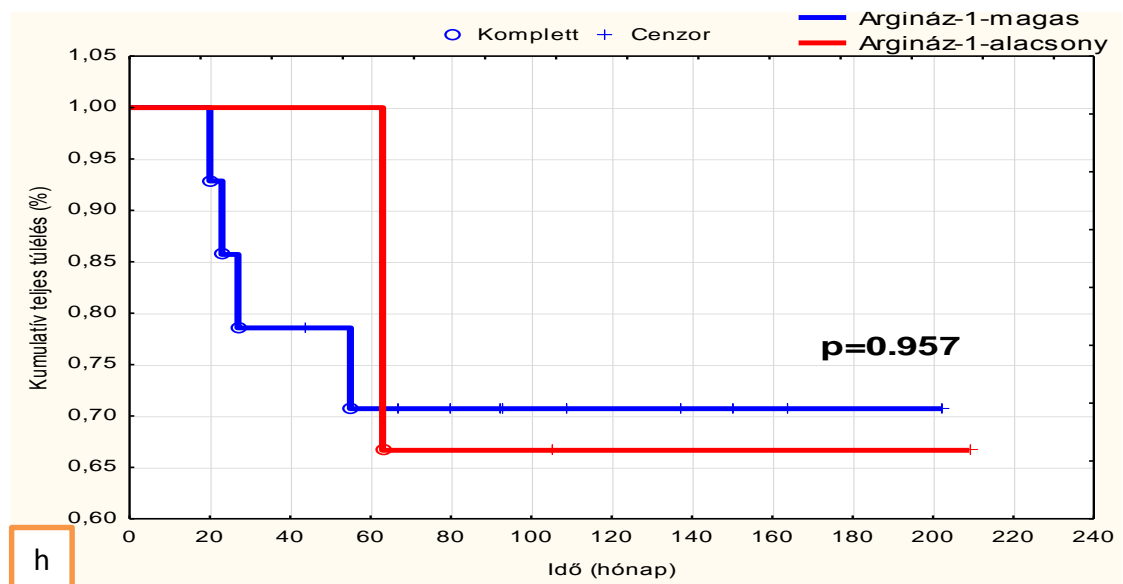
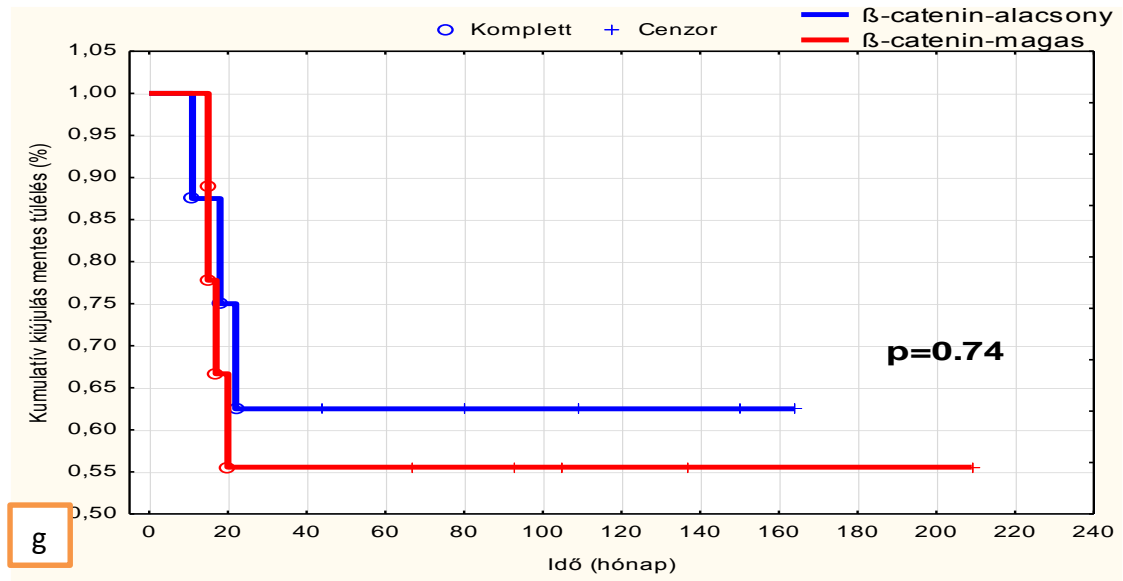
A tricellulint alacsonyan, azaz a medián alatt expresszáló hepatoblastoma esetek szignifikánsan rövidebb OS-el rendelkeznek Kaplan-Meier analízisben (log-rank teszt, $p=0.034$) a tricellulint magasan, a medián fölött expresszáló esetekhez képest (23. *b* ábra). A TRIC-t magasan expresszáló esetekben az átlag OS 122.37, míg a TRIC-alacsony csoportban 75.11 hónapnak bizonyult. A TRIC-magas csoportban továbbá nem történt halálozás, az EFS tekintetében nem bizonyult különbség a két csoport között (log-rank teszt, $p=0.112$). Az argináz-1, β -catenin és EZH2 expresszió nem mutatott összefüggést az OS-el és az EFS-el sem (23. *d-i* ábra).

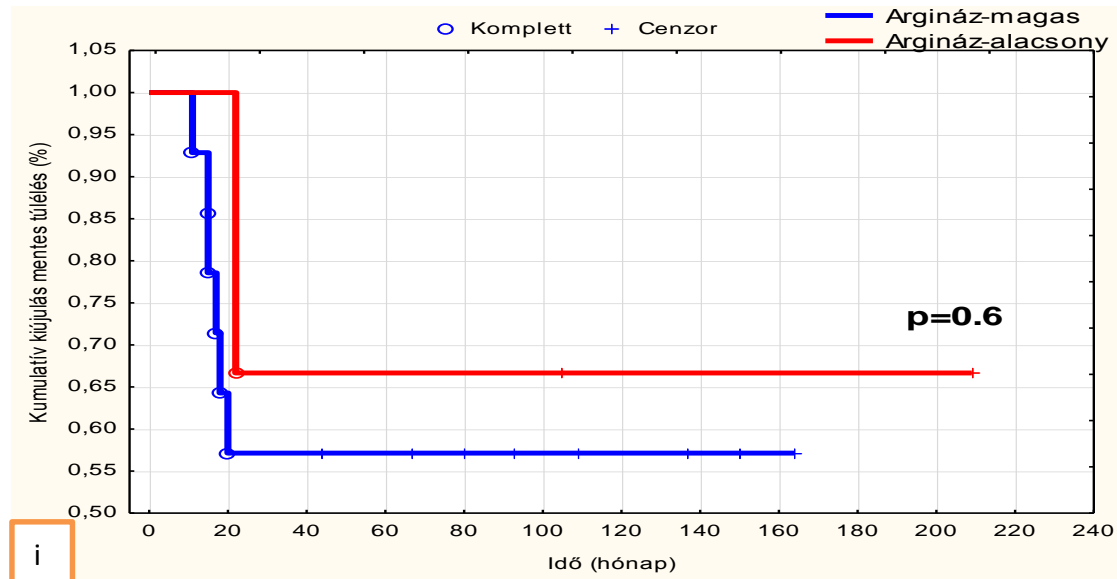
Az EZH2-magas csoportban az OS 87.14, az EFS 63.98 hónap volt, míg az EZH2-alacsony csoportban az OS 98.88, míg az EFS 94 hónapnak bizonyult, a különbség nem bizonyult szignifikánsnak (log-rank analízis, $p=0.307$). Fisher-féle exact teszttel vizsgálva a magasabb (medián feletti) EZH2 értékek és a távoli metasztázis jelenléte között kapcsolat áll fenn ($p= 0.013$). A többi, általunk vizsgált fehérje nem mutatott összefüggést a klinikai paraméterekkel.











23. 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. d), e), Nem volt összefüggés az EZH2 és a vizsgált túlélési paraméterek közt. f), g), Nem volt összefüggés a β -catenin és a vizsgált túlélési paraméterek közt. h), i), Nem volt összefüggés az Arg-1 és a vizsgált túlélési paraméterek közt. *Komplett esemény:* a páciens meghalt vagy recidíva alakult ki. *Cenzorált esemény:* a beteg egyéb okból kifolyólag elhunyt, vagy véget ért az utánkövetési időszak.

6.2 Fetális májak immunhisztokémiai és immunfluoreszcens vizsgálata

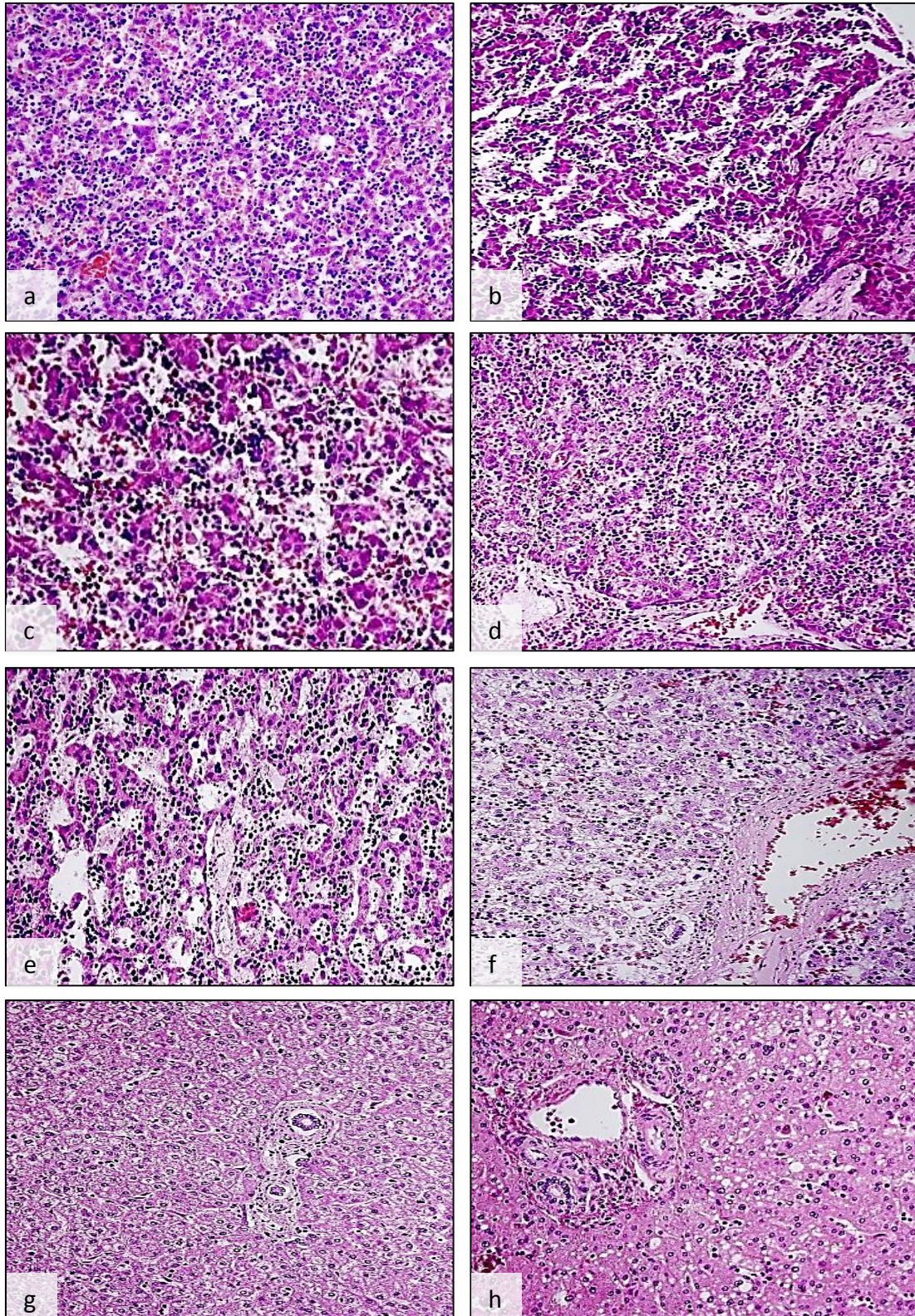
Az 57 vizsgált fetális májmintában TMA multiblokkokon vizsgáltuk a claudin-1, tricellulin és EZH2 expressziót, nézve az említett fehérjék expressziós mintázatát a gesztáció különböző heteiben. A különböző korú magzati májak HE képe a 24. ábrán látható.

A claudin-1 fehérje esetében minden mintánkban a 14. héttől kezdődően erős, illetve közepes festődési intenzitású membranózus festődést kaptunk, a fetális májakban is az epeutak és a hepatocyták apikális pólusa kifejezetten erősen festődtek az antitesttel. A reakció kiterjedésében nem mutatkozott különbség a különböző idős foetus-okban, a CLDN-1 minden esetben lineárisan körülrajzolta a hepatocytákat, annak „lépesszerű” mintázatot adva. A boncolásig eltelt idő nem befolyásolta a fehérje kifejeződését. A vizsgált felnőtt normál májakban és a kisgyermek májakban is minden esetben lineáris membranózus reakciót tapasztaltunk. A magzati májminták CLDN-1 expressziójával

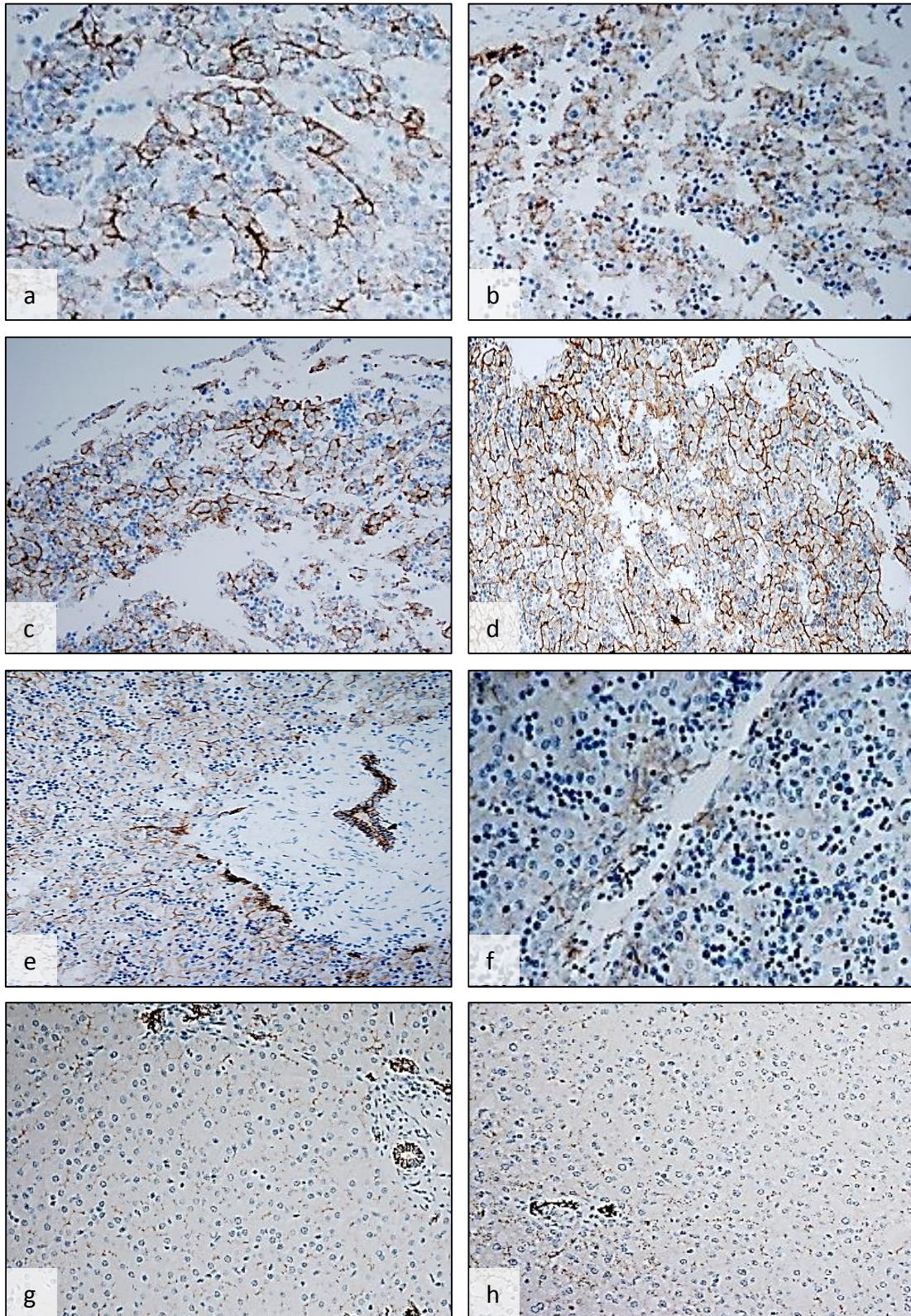
kapcsolatosan nem végeztünk morfometriás vizsgálatokat. A különböző korú magzati májak CLDN-1 expresszióját a 25. *ábra* szemlélteti.

Az EZH2 megjelenése a legkorábbi, 14 hetes mintában is már megfigyelhető volt, a hepatocyták és a hemopoetikus sejtek is nagymértékben kifejezték a fehérjét. A boncolásig eltelt idő nem befolyásolta az EZH2 fehérje kifejeződését. A fetális májmintákban –hasonlóan a gyermek és felnőtt májakhoz- nem mutattak festődést az epüti képletek. Egy 15 hetes mintánk negatívnak bizonyult az antitesttel, ez valószínű technikai hiba miatt lehetett, hiszen a hemopoetikus sejtek sem mutattak festődést. Megfigyelhető volt a 23 hetes mintákban a pozitívan festődő hepatocyták számának csökkenése. A felnőtt és gyermek májak teljesen negatívnak bizonyultak az antitesttel. A magzati májminták EZH2 expressziójával kapcsolatosan nem végeztünk morfometriás vizsgálatokat. A különböző korú magzati májak EZH2 expresszióját a 26. és 27. *ábra* szemlélteti.

Sikerült kimutatni a TRIC membranózus mintázatát a 14, 18, 19, 20, 21, 22 és 23 hetes foetus-okban, függetlenül a boncolásig eltelt időtől, mely nem befolyásolta a fehérje expresszióját. A legkorábbi mintáktól kezdve mind a hepatocyták, mind az epüti képletek expresszálták a fehérjét. A magzati minták tricellulin expressziójával kapcsolatban morfometriás vizsgálatokat nem végeztünk. A különböző korú magzati májak tricellulin expresszióját a 28. és 29. *ábra* szemlélteti.

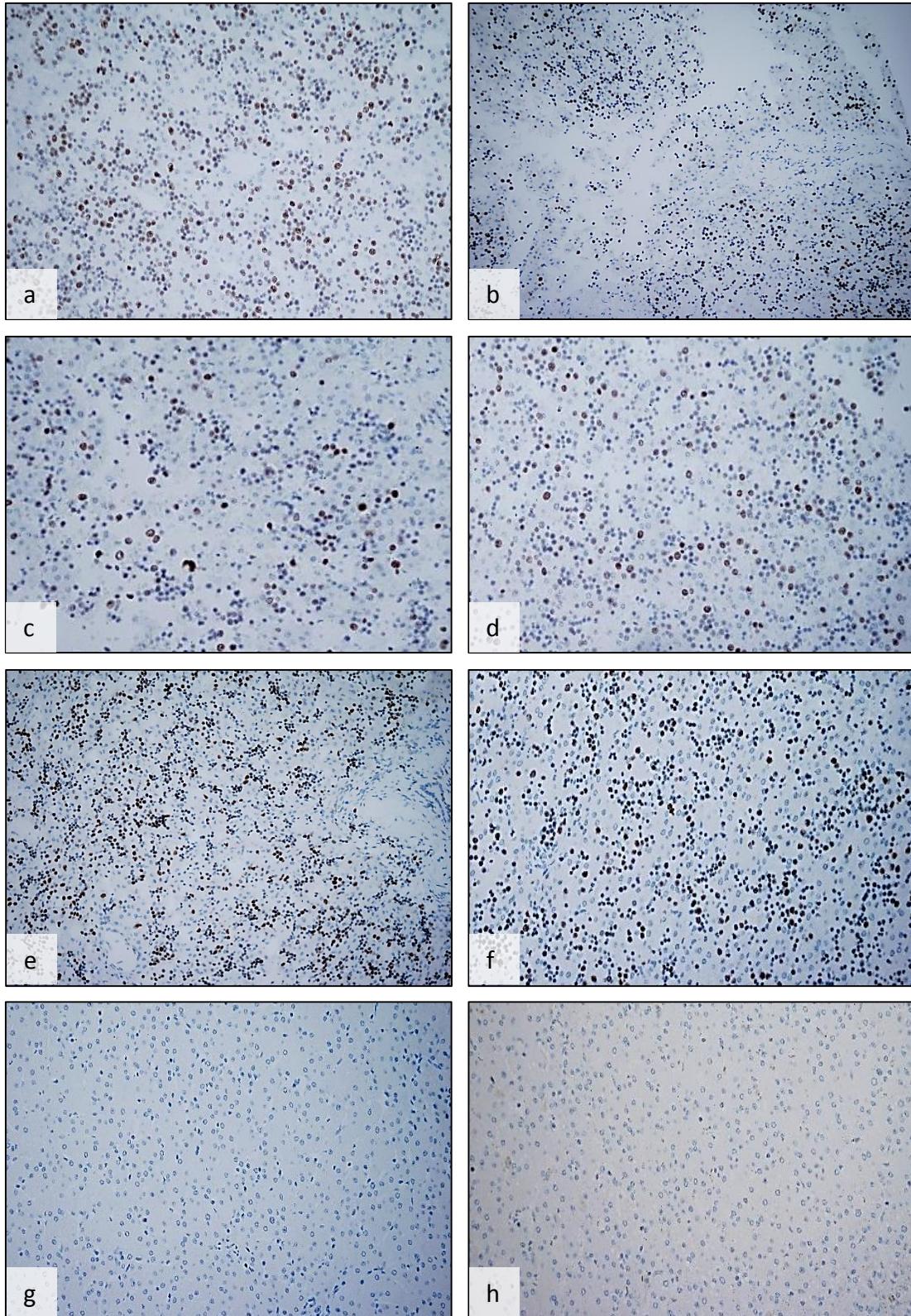


24. ábra. Különböző korú magzati normál májak. A minták szerkezete jól megtartott, jól látszik a nagymértékű hemopoézis jelenléte a (a) 14 hetes, (b) 15 hetes, (c) 16 hetes, (d) 18 hetes, (e) 20 hetes, (f) 23 hetes humán abortumok és (g) 1 éves és (h) 3 éves gyermekek májmintáiban (400x).



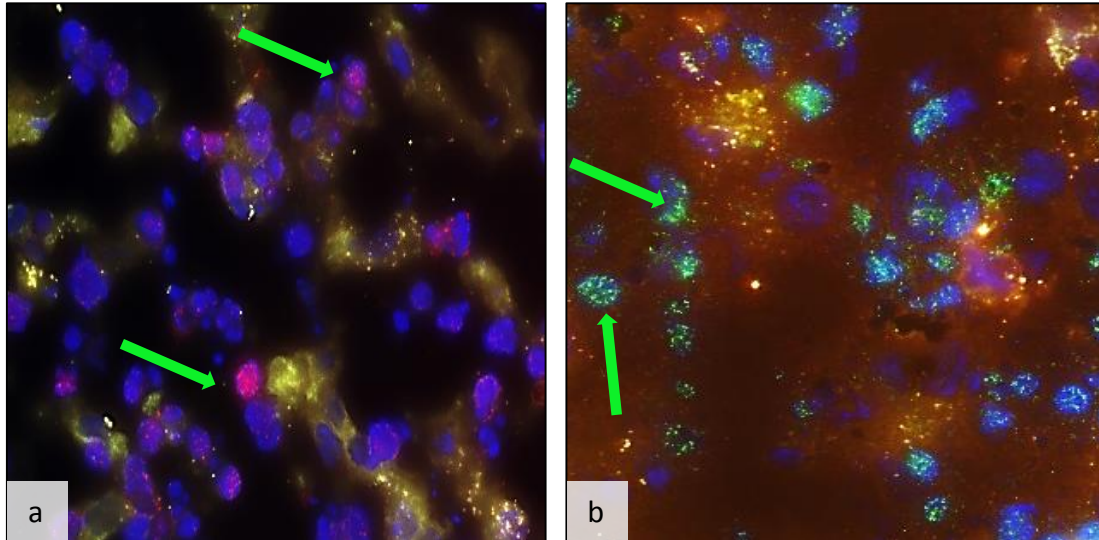
25. ábra. Claudin-1 expressziója humán abortumok májmintáin. Erős festődés látszik a 14 hetes (a) mintától kezdve, a reakció intenzitása legerősebb az apikális póluson. Hasonlóan erős expresszió látható a (b) 15 hetes, (c) 16 hetes, (d) 18

hetes, (e) 20 hetes, (f) 23 hetes humán abortumok és (g) 1 éves és (h) 3 éves gyermekek májmintáiban A gyermek májmintákon kevésbé kiterjedt a reakció intenzitása (400x).

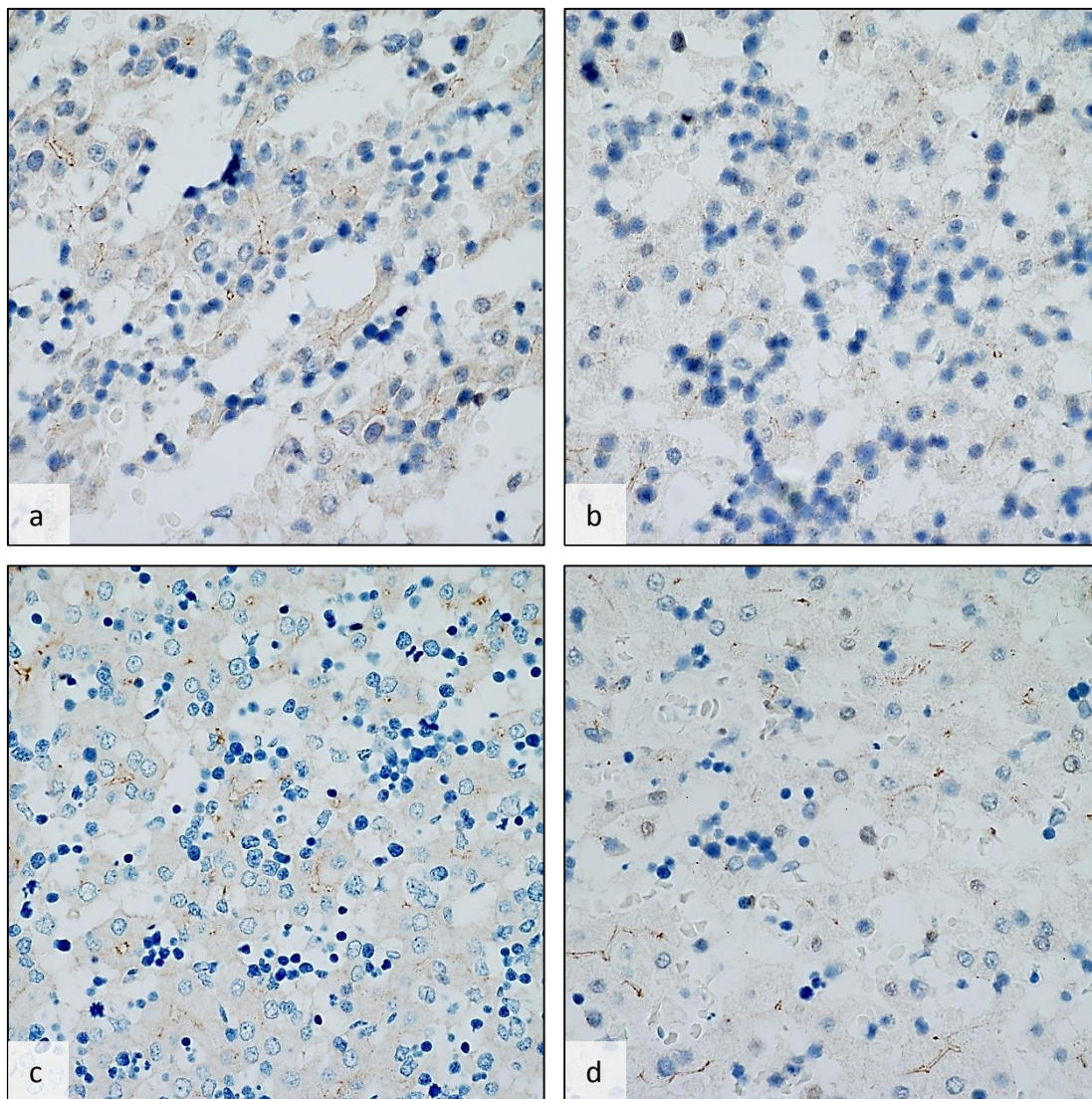


26. ábra. EZH2 reakció humán abortumok májmintáin. A fehérje kimutatható volt minden mintán a vizsgáltak közül, a gyermek májminták azonban negatívnak bizonyultak. Erős/közepes nukleáris reakciót találtunk a (a) 14 hetes, (b) 15 hetes, (c) 16 hetes, (d) 18 hetes, (e) 20 hetes, (f) 23 hetes humán abortumok májmintáin.

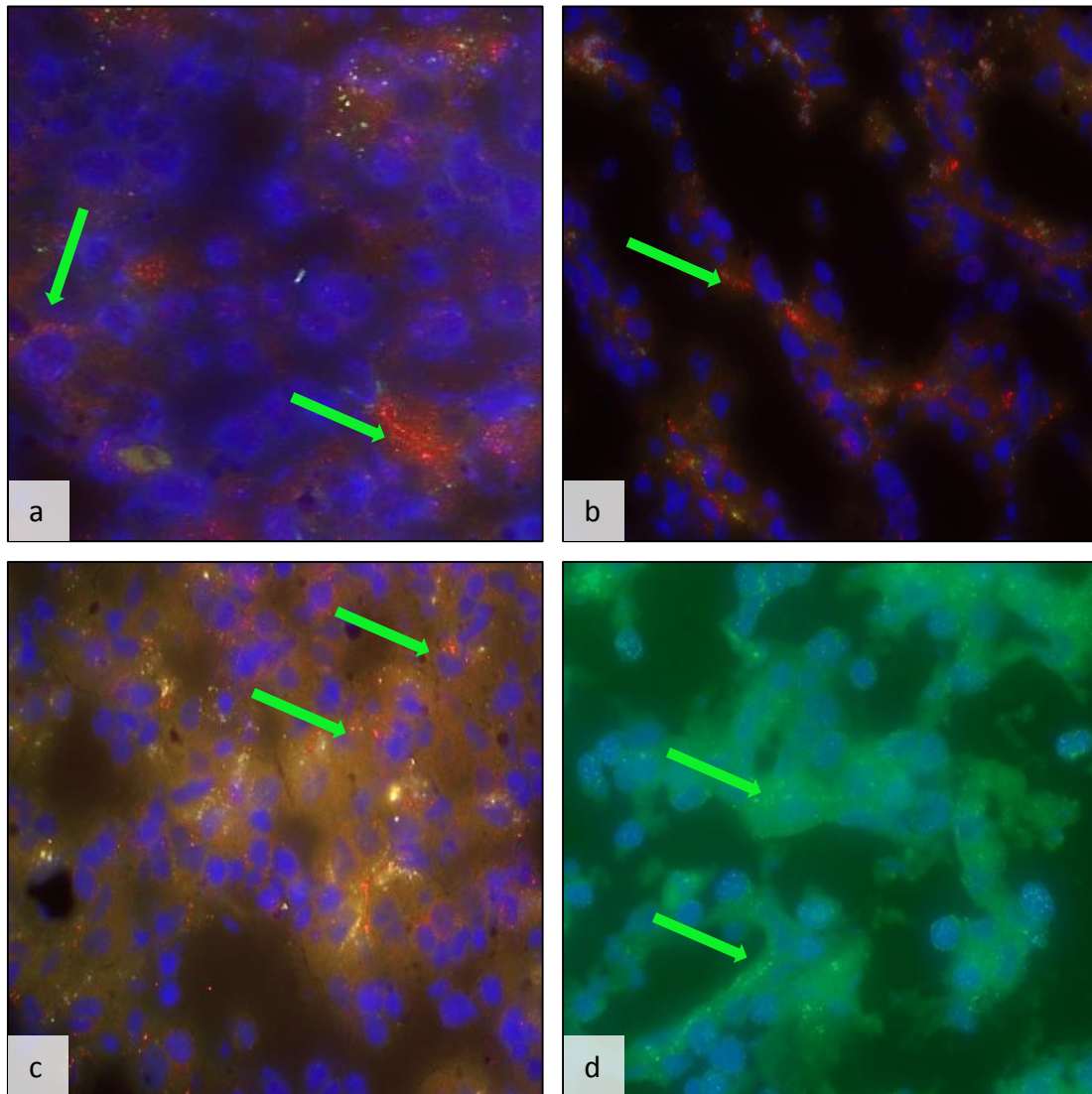
Negatívnak bizonyultak az (g) 1 éves és (h) 3 éves gyermekek májmintái. (400x).
A humán abortumok májmintáin az eputak nem mutattak festődést (400x).



27. ábra. Immunfluoreszcens EZH2 reakció humán abortumok májmintáin. A 16 (a) és 22 hetes (b) májmintákon jól látszik a fehérje egyenletes eloszlása a nucleusban SpectrumRed és SpectrumGreen jelöléssel. Alexa 568: SpectrumRed (piros); Alexa 488: SpectrumGreen (zöld); DAPI (kék) magfestés. Eredeti nagyítás 600x



28. ábra. Tricellulin kimutatása humán abortumok májmintáin. A fehérje membranózus expressziója a 14 (a), 18 (b), 20 (c) és 23 (d) hetes májmintákon. A hepatocyták között kiterjedt volt a reakció. (600x).



29. ábra. Tricellulin fluoreszcens festődés humán abortumok májmintáin. Látható a TRIC membranózus megjelenése SpectrumRed jellel a 20 (a, b), 21 (c) és SpectrumGreen jellel a 22 hetes (d) magzati májmintákon (nyilak). Alexa 568: SpectrumRed (piros); Alexa 488: SpectrumGreen (zöld); DAPI (kék) magfestés. Eredeti nagyítás 600x

7 MEGBESZÉLÉS

Az elmúlt 30 évben amerikai, japán és európai munkacsoportok is évről-évre jelentősebb növekedést írtak le a hepatoblastoma incidenciájában (Czauderna és mtsai 2014).

Napjainkban számos adattal rendelkezünk a tight junction fehérjék bizonyított prognosztikus szerepéről humán daganatokban (MA, Kyunt, Virman, bouchagier, shi). A tight junction fehérje család nemrégén felfedezett tagjáról, a tricellulinról nem rendelkezünk adattal a HB-ban való expressziójáról. Munkacsoportunk korábban vizsgálta a sejtkapcsoló struktúrák, **a tight junction fehérjék expresszióját a hepatoblastoma különböző epitheliális komponenseiben** (Holczbauer és mtsai 2013). Magasabb claudin-1 és 2 fehérje és mRNS szintet találtak a fetális komponensben az embrionálishoz képest. A tight junction fehérje család nemrégén felfedezett tagjáról, a tricellulinról nem rendelkezünk adattal a HB-ban való expressziójáról. Így célul tűztük ki a TRIC vizsgálatát HB mintákon, különösen az egyes hámkomponensekben.

Hepatoblastomában elsőként írtuk le a tricellulin expresszióját. Tanulmányunkban megállapítottuk, hogy a vizsgált 21 tumoros eset egy kivételével expresszálta a fehérjét. A TRIC fehérje expressziójának mértéke jelentős eltérést mutatott a hepatoblastoma fetális és embrionális komponense között. **A TRIC az érettebb fetális komponensben szignifikánsan magasabb expressziót mutatott az embrionális komponenshez képest. Az embrionális komponens a festődő sejtek százalékos arányában és a festődés intenzitásában is alacsonyabb score értékeket mutatott. A tumoros mintákban szignifikánsan magasabb értéket kaptunk a környező, tumormentes mintákhoz viszonyítva.** Az immunhisztokémiai vizsgálatok eredményeit immunfluoreszcens vizsgálatunkkal is megerősítettük, a vizsgált mintákban detektálható volt a fehérje. Túlélési vizsgálatainkban **a TRIC-t nagymértékben expresszáló tumorok szignifikánsan jobb teljes túléléssel rendelkeztek, mint a fehérjét alacsonyan expresszáló csoport.** Az eseménymentes túlélést vizsgálva nem találtunk különbséget a két csoport között. Mivel a teljes túlélés nem mutatott összefüggést a szubtypusokkal, így a **TRIC expresszió mértéke előre vetítheti a betegség kimenetelét, és befolyásolhatja a prognózist az epitheliális hepatoblastomában.** Tanulmányunkban a hepatoblastoma egyéb szövettani típusait nem vizsgáltuk.

A TRIC az egyetlen olyan TAMP fehérje, melyet mind a bicelluláris-, mind a tricelluláris TJ-k felépítésében megtalálunk (Furuse és mtsai 2012, Takasawa és mtsai 2013). A tTJ-ben a fehérje kiütése a transzepithelilális rezisztencia csökkenésével, és megnövekedett paracelluláris transzporttal jár együtt (Ikenouchi és mtsai 2005). A fehérje overexpressziója a tTJ-ben a makromolekuláris permeabilitást csökkentette, míg a bTJ-ben ionok (Na^+ és Cl^-) transzportját csökkentette (Krug és mtsai 2009). Ismert, hogy a TJ fehérjék másik nagy csoportja, a claudinok szerv-és szövetspecifikus módon expresszálódnak, és nagy szerepük van a differenciáció és sejtproliferáció szabályozásában is (Escudero-Esparza és mtsai 2011). Ez a jellegzetes mintázat általában megfigyelhető a daganatos elváltozásokban is. A TRIC ilyen jellegű expressziójáról azonban kevés adattal rendelkezünk. A TRIC epithelilális sejtekben való expressziójáról az intesztinális traktusban, a gyomorban és a vesében először Ikenouchi és mtsai közölt adatokat. Ezután beszámoltak egyéb szövetek epithelilális sejtjeinek TRIC expressziójáról: így leírták jelenlétét az epidermisz, a pancreas exocrin és nazális epithelilális sejteken (Kojima és mtsai 2010, Korompay és mtsai 2012, Schluter és mtsai 2007). Ismert a TRIC mRNS jelenléte humán köldökzsínór véna endothel sejtjein, dendritikus sejteken, mikroglia sejteken, asztrocitákon és neuronokon ((Beese és mtsai 2010, Mariano és mtsai 2013). Az agyi erek endothel sejtjein a TRIC kolokalizációt mutatott a CLDN-5 fehérjével (Mariano és mtsai 2013).

Tonsilláris squamous sejtes carcinómában a TRIC szintje alacsonyabbnak bizonyult a normál mucosa epitheliumához viszonyítva, a különböző grade-t összevetve a carcinomák között nem találtak eltérést TRIC expresszió tekintetében (Kondoh és mtsai 2011).

Hat különböző gyomor carcinoma sejtvonalat és humán carcinoma mintákat is elemezve írtak le lecsökkent TRIC expressziót a kevésbé differenciált tumorokban, míg magasabb szintet a jól differenciált mintákban észleltek (Masuda és mtsai 2010). A HSC-45 sejtvonalban (rosszul differenciált típus) a gyenge TRIC expresszió mellett annak citoplazmatikus lokalizációját is leírták, a membranózus festődés hiánya mellett. A tricelluláris kapcsolatok felbomlása tehát magyarázza a tumor agresszív viselkedését és a rosszabb kimenetel lehetőségét. Az epithelilális-mezenchymális tranzíció (EMT) kulcsfontosságú a carcinogenezis során, ilyenkor az epithel sejtek polarizációja megszűnik, a sejtek elvesztik apiko-bazális polaritásukat, az E-cadherin által kialakított

sejtkapcsoló struktúrák megszűnnek, az aktin citoskeleton átszerveződik, a sejtek migrációs és inváziós képességre tesznek szert (Bryant és mtsai 2012). Masuda és mtsai megállapították gyomor carcinoma esetében, hogy az EMT szoros korrelációban van a TRIC szintjének csökkenésével és diszlokalizációjával, melyet a Snail transzkripciós faktor indukál. mRNS szinten igazolták a Snail indukált TRIC csökkenést, melyhez a vimentin expressziójának megnövekedése társult. Korompay és mtsai leírták a TRIC expresszióját normál és tumoros exocrin pancreasba, ugyanakkor az endogén pancreasban nem találtak expressziót (Korompay és mtsai 2012). Tovább vizsgálva 44 pancreas ductalis adenocarcinoma (PDCA) esetet, a differenciálatlan esetekben szignifikánsan alacsonyabb TRIC expressziós szintet találtak a jól differenciált esetekhez képest. mRNS szinten vizsgálva is látszott a tendencia, a csökkenő TRIC expresszió és a növekvő grade között. A TRIC-t nagymértékben kifejező grade 1 esetekhez szignifikánsan jobb túlélés is társult. A TRIC különböző expressziós mintázata utalhat az exocrin és endokrin pancreas különböző fejlődési útvonalára, és potenciális targetként funkcionálhat jól differenciált PDCA esetében.

A TRIC különböző májtumorokban való lokalizációjáról kevés irodalmi adat áll rendelkezésre. Somorác és mtsai 32 HCC-t vizsgálva megállapították, hogy a magasan és közepesen differenciált tumorokban magasabb TRIC expresszió mérhető (Somoracz és mtsai 2014). A TRIC-magas esetekhez szignifikánsan rövidebb teljes túlélés társult. Összességében a HCC-s esetekben magasabb TRIC expressziót mértek a környező, nem tumoros májmintákhoz képest. 20 cholangiocarcioma (CC) esetet vizsgálva pedig fordított eredményt kaptak a HCC-ben látottakkal szemben. Itt a TRIC-magas esetekhez -hasonlóan a hepatoblastomához- jobb teljes túlélés társult. A grade I CC esetekben szignifikánsan magasabb értéket kaptak a grade III esetekhez képest. Az epitheliális HB-s mintákban szignifikánsan magasabb TRIC expressziót találtunk a környező, nem tumoros májmintákhoz képest. Számos közlemény bizonyítja, hogy a tight junction proteinek overexpressziója, vagy down-regulációja is egyaránt bekövetkezhet a carcinogenezis, így a hepatocarcinogenezis folyamatában is (Higashi és mtsai 2007, Huang és mtsai 2011). Patonai és mtsai mRNS szinten magasabb TRIC expressziót írtak le HCC-s mintákon, míg 11 fibrolamelláris HCC (FLC) esetben alacsonyabb TRIC expresszióról számoltak be normál májhoz viszonyítva (Patonai és mtsai 2011). A tumoros mintákban látott magasabb TRIC expresszió arra következtetett, hogy a HB

carcinogenezise a TRIC megnövekedett expressziójával társul. A TRIC expressziójának csökkenése felbontja az intracelluláris kapcsolatokat és megváltoztatja a paracelluláris permeabilitást, és eredményezheti a dedifferenciált tumorkomponens kialakulását. Pancreas ductális adenocarcinoma és cholangiocarcinoma esetében tapasztalt TRIC expresszió csökkenést a dedifferenciáltsággal együtt is feltételezhetően ezzel magyarázható. Pozitív TRIC expresszió mutatkozott egy hepatoblastoma esetünk tüdőáttétjeiben.

Külön érdekes azon megfigyelésünk, **hogy öt tumoros mintában nukleáris TRIC expressziót találtunk**, melyekben az érintett tumorsejtekben nem találtunk –vagy csak nagyon gyenge- membranózus festődést. Ezek az esetek nem függték össze a szövettani típussal, nemmel, életkorral, és a kimenetellel sem. Hasonló megfigyelést tettünk munkacsoportunk egy korábbi TRIC-ról szóló tanulmányában, ahol szintén a minták pár százalékában a HCC-s eseteknek nukleáris TRIC expresszió volt megfigyelhető (Somoracz és mtsai 2014). Egy másik tight junction protein, a CLDN-1 szintén nukleáris akkumulációt mutatott FLC-s és HCC-s minták pár százalékában (Patonai és mtsai 2011). **Az általunk vizsgált HepG2 sejtvonalonban a tumorsejtek 80%-a intranukleáris TRIC immunfluoreszcens festődést mutatott, a hepatocelluláris Hep3B és HUH-7 sejtvonalakban pedig gyenge citoplazmatikus festődést láttunk.** Neurális vaszkuláris endotheliális sejteken immunfluoreszcens vizsgálattal és Western blottal megfigyelték a membranózus expresszió mellett a nukleáris és perinukleáris régióban is a TRIC kifejeződését (Mariano és mtsai 2013). Megfigyeléseik szerint, a sejtek többségében a lokalizáció nukleáris és perinukleáris volt. A tight junction fehérjék közül többről is ismert nukleáris diszlokalizációja. Humán melanomákban nukleáris CLDN-1 festődést a primer tumorban és a dermális metasztázisok mutattak, míg a subcutan és viscerális metasztázisban a citoplazmatikus festődés dominált, így összefüggést találtak a fehérje lokalizációjára és a metasztatizáló képességre vonatkozóan. A kisebb metasztatikus potenciállal rendelkező melanomákban vagy lecsökkent, vagy nem volt nukleáris CLDN-1 volt detektálható (Leotlela és mtsai 2007). Melanoma mintákban a diszlokalizáció létrejöttét foszforilációs módosításokkal hozták összefüggésbe, feltehetőleg PKC aktiválódása okozza, különösen az α , β és γ izoformák. (French és mtsai 2009). Vastagbél tumorokban is leírtak CLDN-1 nukleáris és citoplazmatikus festődést a máj metasztázist adó minták 58%-nál, illetve a nyirokcsomó

áttétet adó minták 35%-nál (Dhawan és mtsai 2005). Legújabb adatok szerint a CLDN-2 nukleáris lokalizációja és az ezzel járó fokozott proliferációs készség is kimutatható tüdő adenocarcinomákban (Ikari és mtsai 2014). A CLDN-2 a sejtmagban ZONAB és cyclin D1 fehérjékkel kapcsolódik a sejtmagban, mely fokozott sejtproliferációt eredményez. A ZO-1 és -2 TJ fehérje nukleáris lokalizációja révén onkogénként működnek és a sejtproliferációt segítik elő (Islas és mtsai 2002). A TJ proteinek kulcsszerepet bírnak az epitheliális mikrokörnyezet szabályozásában, ami számos folyamatban, mint például a sejt proliferációban kritikus jelentőséggel bír (Tsukita és mtsai 2008). Ezen kívül, számos TJ fehérjének kettős szerepe van: strukturális komponensei az intracelluláris kapcsolatoknak, illetve szignál transzdukciós folyamatokban is részt vesznek, melyek az epitheliális sejtek proliferációját, gén expressziót, differenciációt és a morfogenezist is befolyásolják (Bauer és mtsai 2011). Mivel a TJ fehérjék kapcsolatban állnak az extracelluláris mátrixal, ezért annak bármilyen okból történő megváltozása a fehérjék lokalizációjának megváltozását jelentheti. A TRIC több munkacsoport által is leírt nukleáris lokalizáció sugallja, hogy a fehérjének –az intercelluláris junctionok felépítésén kívül- számos más funkciója is felderítésre vár.

Munkánkban kimutattuk a tight junction fehérje, tricellulin eltérő expresszióját a fetális és embrionális komponensben, igazolva, hogy a különböző szövettani szubtypusok által meghatározott HB molekuláris heterogenitásához a TJ fehérjék eltérő expressziója is társul.

A hepatoblastomás eseteket vizsgálata -melynek során eltérő differenciáltságú embrionális és fetális típusú daganatsejteket vizsgáltunk- felvetette, hogyan alakul a TRIC és a TJ fehérjék legtöbbet tanulmányozott tagja; a CLDN-1 expressziója a májfejlődés egyes szakaszaiban. Ennek figyelembevételével és HB ismeretlen eredetének tisztázása céljából fetális májmintákat vizsgáltunk, spontán abortus során boncolásra került esetekből.

Munkánk során kimutattuk a különböző gesztációs korokban a májsejtekben észlelt tricellulin expresszióját, melyre vonatkozóan eddig nem rendelkezünk adatokkal. Megállapítottuk, hogy már a fejlődés korai szakaszában, a 14. gesztációs héten megjelenik a TRIC a hepatocyták között és az epe canaliculosokban; membránósz/pontszerű reakciót adva. Ezzel igazoltuk a TJ proteinek fontos szerepét a vér-biliáris gát kialakításában és a májfunkciók megfelelő fenntartásában. A CLDN-1

fehérje tüdőbeli expressziójának vizsgálatakor humán abortumokon leírták a 12 hetes abortum bronhusok és nagyobb bronchiolusok epitheliumában való kifejeződését (Kaartenaho és mtsai 2010). A CLDN-1 epitheliumban való expressziója a 12-36. gesztációs hét között megfigyelhető volt. Ugyanakkor, az alveolusokban a vizsgált mintákban semmilyen időpontban nem volt detektálható. Magunk is kimutattuk a CLDN-1 fehérje expresszióját humán abortumok májában. A fehérje már a 14 hetes foetusban nagymértékben expresszáldott, és minden általunk vizsgált gesztációs héten hasonló intenzitással detektálható volt. A reakciót a hepatocyták és az epeúti képletek is mutatták. Ez jelzi a CLDN-1 kiemelten fontos szerepét a máj normális fejlődése során, a megfelelő milliő biztosítása végett. Ismert, hogy a CLDN-1 mutációja az étellel összeegyeztethetetlen, ichthyosissal járó neonatalis sclerotizáló cholangitishez vezethet, mely a jellegzetes bőr mellett az epeutak gyulladásával és különböző mértékű sclerosisával jár (Hadj-Rabia és mtsai 2004).

A hepatoblastoma prognózisa szempontjából rosszabb kimenetelt jelent a PRETEXT IV stádium, metasztázis jelenléte, alacsony AFP szint, multifokális, makrovaszkuláris invázió, extrahepatikus kiterjedés, magasabb életkor (Maibach és mtsai 2012). Napjainkban már számos elváltozást leírtak, melyek a fent említett klinikai paramétereken kívül megfigyelhetőek hepatoblastomában, és hatással vannak a kimenetelre. A sejtek magasabb PAS tartalmát jobb túléléssel hozták összefüggésbe. Hasonlóképpen, a DNS ploiditás is befolyásolja a túlélést, a diploid sejtek szignifikánsan jobb túlélést mutattak (Chopra és mtsai 2010). A PLK1 onkogén RT-PCR vizsgálattal mért magasabb expressziója hepatoblastomában rosszabb túléléssel járt (Yamada és mtsai 2004). A DNS metilációs állapotát real-time kvantitatív metiláció-specifikus PCR-el (OMSP) vizsgálva megfigyelték hepatoblastomában az MT1G gén promoterének hipermetiláltságát, és az ehhez társuló szignifikánsan rövidebb OS-t (Sakamoto és mtsai 2010). Az MT1G gén egy metallothionein fehérjét kódol, melynek a réz, vas és egyéb nehéz fémek megkötésében van szerepe. Fehérje szinten vizsgálva, alacsonyabb MT1G szintet találtak hepatoblastoma tumorokban, mint normál májakban (Nagata és mtsai 2003). Leírták a Cyclin D1 és a Ki-67 prognosztikus szerepét is hepatoblastomában (Purcell és mtsai 2011). Mikroarray adatok alapján Cairo és mtsai leírt egy 16 gént magába foglaló szignalizációs útvonalat, melyek expressziója jelzi a prognózist és előre vetíti a tumor agresszív viselkedését (Armengol és mtsai 2011).

A klinikai stádium, illetve a fent említett prognosztikus faktorok jelenléte mellett a mai napig **a szövettani besorolásnak alapvető szerepe van a prognózist és kezelést illetően. Az epitheliális komponensek aránya meghatározza a hepatoblastoma differenciáltsági fokát.** A hepatoblastomák 7% a tisztán, jól differenciált fetális epitheliális típusba tartozik, 100%-os esemény mentes túlélés érhető el megfelelő kezeléssel (Malogolowkin és mtsai 2011). Ebben a szubtypusban nincs szükség kemoterápia adására, a komplett sebészi rezekció képezi egyedül a kezelést. Ugyanakkor, a fetális szubtypus leggyakrabban a másik epitheliális komponenssel, az embrionális szubtypussal keveredve jelenik meg. **A két, eltérő kimenetellel járó szubtypus morfológiai elkülönítésére azonban jelenleg is kevés marker áll a rendelkezésünkre.** A Sal-like fehérje 4 (SALL4) transzkripciós faktort leírták az embrionális szubtypusú HB-ban, ugyanakkor a fetális és mezenchymális elemek negatívnak bizonyultak (Gnemmi és mtsai 2013). A HepPar 1 erős festődést mutat a fetális szubtypusban, míg az embrionális és a mezenchymális szubtypusban negatív, hasonlóan a CEA és glutamin szintetáz is nagyobb mértékben expresszálódik a fetális szubtypusban (Armengol és mtsai 2011) A heparán-szulfátot tartalmazó proteoglikánok csoportjába tartozó glipikán 3 eltérő festődési mintázatot mutat az epitheliális komponensekben: a jól differenciált fetális sejtek granuláris, citoplazmatikus festődést adnak, míg a mitotikusan aktív fetális sejtek, és az embrionális szubtypus durva, rögös, diffúz citoplazmatikus rajzolatot mutatnak (Lopez-Terrada és mtsai 2014). A festődés szignifikánsan magasabb mértékű a fetális szubtypusban. A glipikán 3 génjében történő mutáció eredményeképpen kialakuló Simpson-Golabi-Behmel szindrómában pedig az esetek 10-20%-ban társul embrionális malignitás, így HB is (Zynger és mtsai 2008). A PCNA és a Bax apoptotikus fehérje nagyobb mértékű expressziója mutatható ki az embrionális szubtypusban, míg a Bcl-xL apoptotikus fehérje a fetális szubtypusban expresszálódik nagyobb mértékben (Chopra és mtsai 2010). Chopra és mtsai leírták a CK-19 fokális citoplazmatikus festődését embrionális sejtekben, ahol a konvencionális szövettani megjelenés helyett duktuláris formációt mutattak a sejtek. A korábban említett PLK1 fehérje is eltérő mRNS expressziós szintet mutatott a két komponensben: a kevésbé differenciált szövettani típusban magasabb expressziós értéket mutatott (Yamada és mtsai 2004). Nemrégiben számoltak be egy nonhiszton high mobility kromoszómális fehérjének, a high mobility group AT-hook 2 (HMGA2) hepatoblastomában való expressziójáról. A fehérjének

kulcsszerepe van a kromatin re-modellingben, és géntranszkripció szabályozásában. Onkogénként funkcionál, számos humán tumorban leírták overexpresszióját (Mahajan és mtsai 2010, Wang és mtsai 2011). A Lee és mtsai által vizsgált 16 HB eset 100%-an pozitívan festődött, nem volt különbség a két szubtípus festődését illetően. (Lee és mtsai 2013). Több proliferációs marker expressziója is eltér a két szubtípusban: magas TGF- α és alacsony PCNA, illetve cyclin A expresszió jellemzi a fetális sejteket (Kiss és mtsai 1998). Sejt felszíni markerek tekintetében az E-cadherin fokozott expresszióját találták a fetális komponensben (von Schweinitz és mtsai 1996).

Nem rendelkezünk adattal az epigenetikus szabályozó mechanizmusok szerepéről a HB kialakulásában. Így célul tűztük ki az EZH2 fehérje expressziójának vizsgálatot humán HB mintákon. Tanulmányunkban elsőként írtuk le az epigenetikus modulátor EZH2 expresszióját humán epitheliális hepatoblastoma különböző szubtípusaiban. A minták mindegyike nagymértékben expresszálta a fehérjét, ugyanakkor a környező, tumormentes máj teljesen negatívnak bizonyult. Egy másik tanulmányunkban 31 hepatoblastoma esetet vizsgálva megállapítottuk, hogy az epitheliális elemek nagymértékben festődtek, míg a mezenchymális elemek negatívnak bizonyultak (Hajosi-Kalcakosz és mtsai 2012). Egyéb vizsgált embrionális tumorok (Wilms tumor, neuroblastoma, embrionális rhabdomyosarcoma) is erős festődést mutattak EZH2-vel. Tovább vizsgálva jelen munkánk során megállapítottuk, hogy az éretlenebb sejteket tartalmazó embrionális szubtípusú sejtek EZH2 expressziója szignifikánsan magasabb volt a fetális szubtípushoz képest. Számos hám- és nem-hám eredetű daganatban leírták az EZH2 nagymértékű kifejeződését: elsőként hormonterápia rezisztens metasztatizáló prosztatatrákból és emlő tumorban (Kleer és mtsai 2003, Varambally és mtsai 2002). Gyomor tumorban, májtumorokban, húgyhólyag tumorokban, tüdő tumorokban, limfómákban, vastagbél tumorokban, endometriális tumorokban, pancreas tumorokban, Ewing sarcomában is emelkedett EZH2 szintet találtak (Arisan és mtsai 2005, Bachmann és mtsai 2006, Dukers és mtsai 2004, Matsukawa és mtsai 2006, Richter és mtsai 2009, Sudo és mtsai 2005, Wang és mtsai 2010). Nemcsak a primer tumorokban mutat magas szintet a fehérje, hanem az expressziója korrelál az agresszív fenotípussal, a metasztázis kialakulásával és rosszabb kimenetellel. Kísérleti modelleken is bizonyították onkogén hatását: emlő H16N2 sejt vonalon tumorigenezist és érinvázio kialakulását váltotta ki in vitro (Kleer és mtsai 2003). Egér embrionális fibroblasztok proliferációt eredményezi

(Bracken és mtsai 2003). Ugyanakkor, normálisan a centrum germinativumban nagy mennyiségben expresszálódik felnőttekben, a B-limfociták normális fejlődését irányítja a hisztonok metilációján és az immunglobulin nehéz lánc módosításán keresztül (Su és mtsai 2003). Így érthetővé válik fontos szerepe a limfómák kialakulásában is. Bizonyítottan fontos szerepet játszik a hematopoetikus és központi idegrendszer normális fejlődésében.

Több munkacsoport is beszámolt HCC-s mintákban mért magasabb EZH2 szintről a normál mintákhoz viszonyítva (Sudo és mtsai 2005) (Cheng és mtsai 2011). A portális és távoli inváziók jelenléte asszociált az EZH2-magas szintjével. Ezekből a tanulmányokból arra következtethetünk, hogy az EZH2 szintje szoros összefüggést mutat a hepatocarcinogenezissel. Az EZH2 a PRC rendszer tagjaként regulátora a sejtciklusnak, így állandó aktivációja abnormális proliferációhoz és a sejtek malignus transzformációjához vezet. HepG2 sejtvonalat vizsgálva megállapították, hogy a csökkent EZH2 szint csökkenti a sejtek növekedésének mértéket, csökkenti a malignus proliferációs rátát, gátolja a sejtek migrációs képességét (Zhao és mtsai 2013). Az EZH2 gén tehát egy jövőbeli, lehetséges terápiás célpontnak tűnik a májtumorok kezelése tekintetében (Melnick 2012, Popovic és mtsai 2013).

Összefüggést találtunk az EZH2-t nagymértékben expresszáló tumorok és a távoli metasztázis jelenléte között. Az egyik esetünk ismert távoli, tüdő áttétjében is kimutattuk az EZH2 expresszióját. Az áttétben a fehérje expressziós mintázata megegyezett a primer tumorban látottakkal melyben az embrionális sejtek nagyobb mértékben fejezték ki a fehérjét. Orális squamous sejtes carcinomában is hasonló összefüggést kaptak a magas EZH2 expresszió és a metasztázisok kapcsolata tekintetében (Wang és mtsai 2013). Wang és mtsai túlélési vizsgálatokkal megállapították, hogy az EZH2 overexpressziója szignifikánsan rövidebb túléléssel társul. Eredményeinket elemezve **nem kaptunk szignifikáns különbséget az EZH2-magas és alacsony csoportban, ugyanakkor a túlélési görbéken látszik a tendencia, miszerint az EZH2-alacsony esetekhez jobb túlélési adatok tartoznak.** Az EZH2-magas esetekben négy halálozás, illetve hat recidíva történt. Az EZH2-alacsony esetekben ugyanakkor egy-egy halálozás és recidíva. Az EZH2 egyike lehet azon géneknek, melyek a máj (esetlegesen egyéb szövetekben, szervekben is) carcinogenezis során elősegíti inváziót és a metasztázisok kialakulását. Orális squamous sejtes carcinomában az EZH2 és E-cadherin szintje fordítottan változott,

a nyirokcsomó metasztázist adó esetekhez magas EZH2 és alacsony E-cadherin társult (Wang és mtsai 2010). Ezt magyarázza az EZH2 overexpressziója esetén létrejövő hiszton trimetiláció általi E-cadherin tumor szupresszor génjének csendesítése. In vitro vizsgálatokban az EZH2 kiütése révén normál E-cadherin expressziót találtak (Fujii és Ochiai 2008). Az EZH2 sejtek migrációjára való hatása tehát részben az E-cadherin szintjére gyakorolt hatással magyarázható. Ugyanakkor, az EZH2 direkt blokkolása siRNS-el sejtvonalakban minimális hatással volt a sejtek migrációjára és inváziójára. Ez utal arra, hogy az E-cadherin szintjének csökkentésén kívül más EZH2 által regulált faktorok is részt vesznek a migráció szabályozásában.

Az EZH2 számos, a daganatok progressziójában fontos szerepet játszó útvonallal, így a Wnt, Ras, NF- κ B, BMP és Notch útvonallal kapcsolatban áll (Tsang és Cheng 2011). Molekuláris és funkcionális vizsgálatokkal megállapították és igazolták HCC-s mintákban és sejtvonalakban is a Wnt/ β -catenin útvonal antagonistáinak EZH2-mediált transzkripció gátlását, mely által aktívvá válik az útvonal, és a hepatocarcinogenezis során nagy szerepe van az EZH2 általi sejtproliferáció kiváltásában (Cheng és mtsai 2011). Továbbá, leírták a β -catenin és EZH2 ko-expresszióját is 179 humán HCC-s mintán, mely az esetek 34%-ban jelen volt. Mindkét fehérje a kevésbé differenciált mintákban mutatott erősebb expressziót, és egyik fehérje sem volt kimutatható a környező vagy a normál májmintákban. Tovább vizsgálva a ko-expressziót mutató eseteket, megállapították, hogy CTNNB1, AXIN1 és AXIN2 génekben mindössze két esetben (25 esetet vizsgáltak) találtak misszensz mutációt. Ez arra utal, hogy a HCC-s mintákban a Wnt útvonal aktiválódása nem genetikai mutáció eredménye, hanem lehet az EZH2 általi epigenetikus módosítás eredménye. Hasonló ko-expressziót emlő tumorokban is leírtak (Li és mtsai 2009). A HB etiopatogenezisében a Wnt útvonal aktiválódása az esetek 70-90%-ban kimutatható. Ugyanakkor, mutációt magában a CTNNB1 génben, vagy az AXIN1, AXIN2 és APC génben csak az esetek 22-33%-ban lehet találni (Zimmermann 2005). Ez alapján a HB kialakulása során is feltehetőleg más mechanizmusok is részt vesznek a Wnt útvonal aktiválódásában. Munkánkban **kimutattuk az abnormális (nukleáris/citoplazmatikus) β -catenin jelenlétét a mintáink 95%-ban. A nukleáris β -catenin és az EZH2 fehérjék együttes expressziója a minták 81%-ban megfigyelhető volt. Mindkét fehérje szignifikánsan magasabb szintet mutatott a differenciálatlanabb embrionális komponensben, és egyik fehérje sem volt**

kimutatható a környező, tumormentes májmintákban. Ezen eredményünk –az irodalmi adatokkal egybevágóan- alapján felvethetjük a HB kialakulásában is egy EZH2 általi epigenetikus módosítás szerepét és jelentőségét a Wnt/ β -catenin útvonal aktiválódásában. Ez a megállapítás még további molekuláris és funkcionális vizsgálatokat igényelne.

Az EZH2 expressziójának tanulmányozásával igazoltuk az epigenetikai szabályozó mechanizmusok szerepét a HB kialakulásában. Ugyanakkor, az eltérő expressziós szint a két szubítusban igazolja a HB molekuláris heterogenitását és a két szubtípus eltérő kimenetelét is magyarázhatja.

Elsőként kimutattuk az EZH2 fehérje expresszióját humán abortumok májmintáin. Az EZH2 a PCG komplex részeként fontos szerepet játszik a sejtek identitásának kialakításában, expressziója domináns az embrionális fejlődés során, míg szintjének csökkenése figyelhető meg bizonyos differenciált szövetekben. Mintáinkban leírtuk fehérje jelenlétét az embrionális fejlődés kezdeti időszakában, hiszen alapvető funkciója a kromatin állapotának kialakítása, a növekedésben fontos szerepet játszó gének regulálása, a hematopoetikus sejtek fejlődésének, differenciálódásának és az X-kromoszóma inaktivitásának ellenőrzésében van (Lessard és Sauvageau 2003). A fehérje nélkülözhetetlen a fetális hemopoézis során, ugyanakkor a csontvelőben jelen lévő hemopoetikus őssejtek önmegújulási képességére nincs hatással (Mochizuki-Kashio és mtsai 2011). A normál hemopoézis során szerepe bizonyos hemopoetikus stem cell gének, így az Evi1 és Ntrk3 gének regulálásában van. Az EZH2 null egerekben letális anémia fejlődik ki, illetve a korai B-sejtek differenciációjában blokádnak alakul ki, a T-sejtek differenciációjában is károsodik a thymusban a CD4⁺ CD8⁻ állapotban (O'Carroll és mtsai 2001). A fehérje deléciója a felnőtt csontvelőben nincs hatással az eritropoézis folyamatára, felnőtt egerekben az EZH2 deléciója fokozza a thrombocyta képződést. A megakariocytás differenciációnak a csontvelőben ugyanakkor negatív regulátora. A fehérje génje a 7-es kromoszómán található, melynek deléciója számos hematológiai kórképben, mint myelodiszpláziás szindrómában vagy myeloproliferatív neopláziákban kimutatható. Myelodiszpláziás szindrómában vagy myeloproliferatív neopláziákban funkcióvesztő mutációját írták le, ami arra utal, hogy a fehérje nem csak onkogénként, hanem tumorszuppresszorként is viselkedhet (Nikoloski és mtsai 2010).

A két epithelilális szubttípus elkülönítése céljából vizsgáltuk a hepatocytá specifikus argináz-1 fehérje expresszióját is.

Kimutattuk a hepatocytá specifikus marker, az argináz-1 expresszióját humán epitheliális HB mintákon. A tumoros minták 100%-a expresszálta a fehérjét, nem mutatkozott különbség a 2 szubttípus expressziójának tekintetében. A tumormentes, környező májminták mindegyike expresszálta a fehérjét, nem volt különbség ezen minták, és a tumoros minták Arg-1 expressziója tekintetében. Ez utal arra, hogy **az Arg-1 expresszió mértéke nem függ a szövettani szubttípustól, illetve nem tekinthető differenciációs markernek a HB-k diagnosztikájában.** Az Arg-1 mind a benignus, mind a malignus hepatocyták szenzitív és specifikus markere (Taylor és Haque 2011). Számos, a HCC-k diagnosztizálására használt markerek (AFP, HepPar-1, glypican-3) közül az Arg-1 bizonyult a legspecifikusabbnak és legszenzitívebbnek (Yan és mtsai 2010). 1222 mintát elemezve mindösszesen 1 prosztata adenocarcinoma volt Arg-1 pozitív. Timek és mtsai ugyanakkor 1250 különböző eredetű -nem hepatocellularis - sebészi rezekciós mintát vizsgálva egyben sem találtak pozitív Arg-1 festődést (Timek és mtsai 2012). 61 metasztatikus adenocarcinómát vizsgálva 3 esetben találtak pozitivitást: pancreas, colorectalis és emlő eredetű adenocarcinómákban (Fujiwara és mtsai 2012). A HCC-k egy ritka formájában, a schirrhusus HCC-ben is leírták az Arg-1 expressziót, a 20 minta 85%-ban (Klings és mtsai 2013). Hiláris és perifériás intrahepatikus cholangiocarcinómában (ICC) is leírták Arg-1 kifejeződést, függetlenül a szövettani típustól (Iida és mtsai 2011). A perifériás ICC-s esetekben a kevésbé differenciált adenocarcinómák és a közepesen-és jól- differenciált tubuláris adenocarcinómák vagy papilláris adenocarcinómák is egyaránt, különbség nélkül kifejezték a fehérjét. A hiláris ICC-k esetében ugyanakkor a pozitivitást adó esetek mindegyike közepesen vagy jól differenciált tubuláris vagy papilláris adenocarcinómának bizonyult.

Mintáinkban **nem találtunk összefüggést az Arg-1 expressziós szintje és a betegség kimenetele közt.** Mao és mtsai HCC-s mintákat vizsgálva megállapították a magasabb Arg-1 szint és az ehhez társuló portális és mikrovaszkuláris invázió ritkább előfordulását (Mao és mtsai 2013). A magasabb Arg-1 szinthez alacsonyabb TNM státuszt, és jobban differenciált szövettani felépítést asszociáltak. Túlélési analízissel a fehérje magasabb szintje és az alacsonyabb kiújulási ráta és megnövekedett túlélés között találtak kapcsolatot. Ez a fehérje lehetséges tumorszupresszor szerepére utalhat.

Eredményeinket összegezve számos megállapítást tehetünk. Vizsgálatainkkal igazoltuk, hogy a HB eltérő szubtípusaiban a TJ fehérjék, illetve az epigenetikus regulátor fehérjék expressziója is megváltozott. Egy újonnan leírt, kevésbé tanulmányozott tight junction fehérje, a tricellulin jellegzetes mintázatát először írtuk le humán hepatoblastomában. Kimutattuk a fehérje, ezáltal a TJ eltérő szerkezetét a két epitheliális szubtípusban, mely különbség a túlélésben is kimutatható volt. Összefüggést mutattunk ki a fehérje expressziós szintje és a túlélés között. Mintáinkban és egy általunk vizsgált sejtvonalban sikerült kimutatni a tricellulin nukleáris lokalizációját, ennek jelentősége további vizsgálatokat igényel.

Elsőként írtuk le az epitheliális hepatoblastoma két komponensének eltérő EZH2 expressziós mintázatát.

Szintén elsőként írtuk le a hepatocytá specifikus marker, argináz-1 nagy specificitású kifejeződését hepatoblastoma mintákon.

Igazoltuk és kimutattuk humán magzati májmintákon a claudin-1, tricellulin és EZH2 fehérjék jelenlétét.

8 KÖVETKEZTETÉSEK

1. Elsőként mutattuk ki a TJ fehérje; a tricellulin (TRIC) expresszióját humán epitheliális hepatoblastomában.
2. Igazoltuk, hogy a TRIC fehérje a HB két eltérő differenciáltságú fetális, és embrionális szubtypusában is expresszálódik, a fetális szubtypusban szignifikánsan magasabb expressziós szintet mutatott az embrionális szubtypushoz viszonyítva. Ez arra utal, hogy a TRIC fehérje a két epitheliális szubtypus differenciációs markerének tekinthető.
3. A TRIC-t fokozottan expresszáló esetkhez szignifikánsan jobb teljes túlélés társult a TRIC-t alacsony mértékben expresszáló mintákhoz képest. Így a TRIC expressziós szintje segíthet a prognózis előrejelzésében.
4. Kimutattuk a nukleáris TRIC jelenlétét humán hepatoblastoma mintákon, és hepatocelluláris sejtvonalon.
5. Elsőként mutattuk ki az EZH2 fehérje eltérő expressziós szintjét a fetális, és az embrionális szubtypusban. Az embrionális sejtek szignifikánsan magasabb mértékben fejezték ki a fehérjét, mely az EZH2-nek az epigenetikus szabályozó mechanizmusokban betöltött szerepét hangsúlyozza. Az EZH2 a két epitheliális szubtypus differenciációs markerének tekinthető.
6. Más szerzőkhöz hasonlóan a β -catenin abnormális expresszióját észleltük HB eseteinkben, mely megerősíti és igazolja mintáinkban is az ismert Wnt/ β -catenin útvonal károsodását, mint jellegzetes molekuláris eltérést. A β -catenin nukleáris expressziójában különbséget találtunk a HB két szubtypusai között, mely szignifikánsan magasabb volt az. embrionális sejtekben.
7. Észleltük a nukleáris β -catenin és EZH2 fehérjék együttes expresszióját a minták nagy százalékában. Ez jelezheti és utalhat a Wnt/ β -catenin útvonal epigenetikus reguláció miatt bekövetkező aktivációjára hepatoblastoma mintákban.
8. Elsőként írtuk le az argináz-1 fehérje igen magas expresszióját a fetális és az embrionális szubtypusban. Nem találtunk különbséget a fehérje kifejeződésében a két szubtypus tekintetében, így ez a fehérje nem alkalmas a két szubtypus elkülönítésére. Ugyanakkor, hasznos marker lehet a hepatoblastoma diagnosztizálásában.

9. Elsőként írtuk le humán foetusok májmintáin a tight junction fehérje claudin-1 és tricellulin expresszióját. Mindkét fehérje a magzati fejlődés korai időszakában, a 14. gesztációs héten már kimutatható. Ez jelzi mindkét fehérje fontos funkcióját a máj normális fejlődésének biztosításában.
10. Elsőként írtuk le az EZH2 humán foetusok májmintáiban való expresszióját. A fehérje is az egyedfejlődés korai, 14 hetes időszakában már megjelenik.

9 ÖSSZEFOGLALÁS

A hepatoblastoma (HB) a gyermekkori malignitások 1%-t teszi ki, 5 éves kor alatt diagnosztizálják leggyakrabban (átlagosan 18 hónapos korban). A tight junction fehérjék differenciál-diagnosztikai és prognosztikai szerepe számos humán daganatban bizonyított, ezentúl ezen fehérjék terápia célpontként is szolgálhatnak.

Célunk a nemrég leírt tight junction protein, a tricellulin (TRIC) expressziójának immunhisztokémiai vizsgálata humán hepatoblastoma mintákon. Leírtuk a TRIC expressziós mintázatát humán HB mintákon, szignifikáns különbséget mutattunk ki a TRIC-t nagymértékben expresszáló fetális epitheliális szubtípus, és azt kisebb mértékben expresszáló embrionális szubtípus között. Immunfluoreszens vizsgálattal is igazoltuk a fehérje expresszióját. Kimutattuk, hogy a TRIC-t magasan expresszáló esetekhez szignifikánsan jobb kimenetel társul, mint az azt kis mértékben expresszáló esetekhez. Ezek alapján megállapíthatjuk, hogy a TRIC differenciációs markernek tekinthető, és hasznos marker lehet a prognózis előrejelzésében. Leírtuk a TRIC expressziós mintázatát humán abortumok májmintáin. A fehérje az egyedfejlődés 14. hetében már expresszálódott, és szintén kimutattuk a 23. gesztációs héten is. Ez jelzi a TRIC fontos szerepét a normál májfejlődés során. Hasonlóképpen, leírtuk a claudin-1 fehérje expresszióját is humán abortumokon.

Kimutattuk, hogy az epigenetikus regulátor fehérje, az EZH2, a hepatoblastoma embrionális típusú sejtjeiben szignifikánsan magasabb mértékben expresszálódik, mint a fetalisban és így a két epitheliális szubtípus differenciációs markerének tekinthető. Leírtuk az EZH2 expressziós mintázatát humán abortumok májszövetében. A fehérjét a 14-24. gesztációs hétig végig kimutatható.

A hepatocytá specifikus argináz-1 kifejeződését vizsgálva kimutattuk, hogy a hepatoblastoma minták mindegyikében expresszálódó fehérje nem mutatott különbséget a két epitheliális komponens között.

Összefoglalva elmondhatjuk, hogy a TRIC és EZH2 fehérjék eltérő módon expresszálódnak a két epitheliális komponensben, így azok differenciációs markerének tekinthetők. A két fehérje szintén hasznos, segítő marker lehet a mindennapi rutin diagnosztikában a prognózis és kimenetel előrejelzése szempontjából.

10 SUMMARY

Hepatoblastoma (HB) is the most frequent malignant primary liver tumor in infancy and early childhood, representing approximately 1% of paediatric solid tumours. Expression pattern of tight junction (TJ) proteins might be an ancillary tool in case of many human cancers as regards the differential diagnosis and prognosis.

Based on these data, we aimed to investigate the expression of a newly described member of the TJ family, tricellulin (TRIC), in different epithelial types of HB. Fetal epithelial type cells expressed higher TRIC IHC score than the embryonal epithelial cells. Moreover, tricellulin expression was investigated by immunofluorescent staining. Our study proved that high TRIC expression is associated with a considerably more favourable overall survival of HB patients as compared with low TRIC expression. Based on these data TRIC might have role in the differentiation, progression, aggressiveness. Investigating 57 spontaneous abortions we concluded that TRIC is expressed in the developing human liver from week 14 to week 23. These results indicate that TRIC has a major role in the normal development of the liver. Similarly to TRIC, Claudin-1 (CLDN-1) expression was investigating in developing liver from week 14 to week 23.

Enhancer of zeste homologue 2 (EZH2) -histonemethyl-transferase - was detected in both embryonal and fetal cells in 100% of HB cases. The expression of EZH2 was significantly higher in the embryonal component when compared with the fetal component. EZH2 might be an ancillary marker available for the morphological distinction between fetal and embryonal subtypes. We concluded that EZH2 is strongly expressed in the developing human liver from week 14 to week 23.

Our further aim was to explore the highly hepatocyte specific marker Arginase-1 (Arg-1) expression in HB samples. All cases of hepatoblastomas showed immunoreactivity for Arg-1 with strong, diffuse positivity. No significant differences were detected between fetal and embryonal subtypes.

Taken together, this is the first report describing the expression of TRIC in HB and based on the significant differences found in the expression patterns of TRIC and EZH2 in both fetal and embryonal compartments, the proteins can be considered to be differentiation markers of these two components. TRIC and EZH2 might well be ancillary tools for the detection of HB and the prediction of survival of patients treated for HB.

11 IRODALOMJEGYZÉK

Al-Jumaily U., Sammour I., Al-Muhaisen F., Ajlouni F. and Sultan I. (2011) Precocious puberty in an infant with hepatoblastoma: a case report. *J Med Case Rep*, 5: 422.

Allan B. J., Wang B., Davis J. S., Parikh P. P., Perez E. A., Neville H. L. and Sola J. E. (2014) A review of 218 pediatric cases of hepatocellular carcinoma. *J Pediatr Surg*, 49: 166-71; discussion 171.

Arisan S., Buyuktuncer E. D., Palavan-Unsal N., Caskurlu T., Cakir O. O. and Ergenekon E. (2005) Increased expression of EZH2, a polycomb group protein, in bladder carcinoma. *Urol Int*, 75: 252-7.

Armengol C., Cairo S., Fabre M. and Buendia M. A. (2011) Wnt signaling and hepatocarcinogenesis: the hepatoblastoma model. *Int J Biochem Cell Biol*, 43: 265-70.

Baade P. D., Youlten D. R., Valery P. C., Hassall T., Ward L., Green A. C. and Aitken J. F. (2010) Trends in incidence of childhood cancer in Australia, 1983-2006. *Br J Cancer*, 102: 620-6.

Bachmann I. M., Halvorsen O. J., Collett K., Stefansson I. M., Straume O., Haukaas S. A., Salvesen H. B., Otte A. P. and Akslen L. A. (2006) EZH2 expression is associated with high proliferation rate and aggressive tumor subgroups in cutaneous melanoma and cancers of the endometrium, prostate, and breast. *J Clin Oncol*, 24: 268-73.

Ballestar E. and Esteller M. (2008) Epigenetic gene regulation in cancer. *Adv Genet*, 61: 247-67.

Bauer H. C., Traweger A., Zweimueller-Mayer J., Lehner C., Tempfer H., Krizbai I., Wilhelm I. and Bauer H. (2011) New aspects of the molecular constituents of tissue barriers. *J Neural Transm*, 118: 7-21.

Baylin S. B. and Ohm J. E. (2006) Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nat Rev Cancer*, 6: 107-16.

Becker K., Furch C., Schmid I., von Schweinitz D. and Haberle B. (2015) Impact of postoperative complications on overall survival of patients with hepatoblastoma. *Pediatr Blood Cancer*, 62: 24-8.

Beese M., Wyss K., Haubitz M. and Kirsch T. (2010) Effect of cAMP derivatives on assembly and maintenance of tight junctions in human umbilical vein endothelial cells. *BMC Cell Biol*, 11: 68.

Benedicto I., Molina-Jimenez F., Bartosch B., Cosset F. L., Lavillette D., Prieto J., Moreno-Otero R., Valenzuela-Fernandez A., Aldabe R., Lopez-Cabrera M. and Majano P. L. (2009) The tight junction-associated protein occludin is required for a postbinding step in hepatitis C virus entry and infection. *J Virol*, 83: 8012-20.

Berger S. L. (2007) The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature*, 447: 407-12.

Borka K., Kaliszky P., Szabo E., Lotz G., Kupcsulik P., Schaff Z. and Kiss A. (2007) Claudin expression in pancreatic endocrine tumors as compared with ductal adenocarcinomas. *Virchows Arch*, 450: 549-57.

Bracken A. P., Pasini D., Capra M., Prosperini E., Colli E. and Helin K. (2003) EZH2 is downstream of the pRB-E2F pathway, essential for proliferation and amplified in cancer. *EMBO J*, 22: 5323-35.

Bronte V. and Zanovello P. (2005) Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nat Rev Immunol*, 5: 641-54.

Bryant J. L., Britson J., Balko J. M., Willian M., Timmons R., Frolov A. and Black E. P. (2012) A microRNA gene expression signature predicts response to erlotinib in epithelial cancer cell lines and targets EMT. *Br J Cancer*, 106: 148-56.

Catanzarite V., Hilfiker M., Daneshmand S. and Willert J. (2008) Prenatal diagnosis of fetal hepatoblastoma: case report and review of the literature. *J Ultrasound Med*, 27: 1095-8.

Chang C. J., Yang J. Y., Xia W., Chen C. T., Xie X., Chao C. H., Woodward W. A., Hsu J. M., Hortobagyi G. N. and Hung M. C. (2011) EZH2 promotes expansion of breast tumor initiating cells through activation of RAF1-beta-catenin signaling. *Cancer Cell*, 19: 86-100.

Chen T. T., Rakheja D., Hung J. Y., Hornsby P. J., Tabaczewski P., Malogolowkin M., Feusner J., Miskevich F., Schultz R. and Tomlinson G. E. (2009) Establishment and characterization of a cancer cell line derived from an aggressive childhood liver tumor. *Pediatr Blood Cancer*, 53: 1040-7.

Cheng A. S., Lau S. S., Chen Y., Kondo Y., Li M. S., Feng H., Ching A. K., Cheung K. F., Wong H. K., Tong J. H., Jin H., Choy K. W., Yu J., To K. F., Wong N., Huang T. H. and Sung J. J. (2011) EZH2-mediated concordant repression of Wnt antagonists promotes beta-catenin-dependent hepatocarcinogenesis. *Cancer Res*, 71: 4028-39.

Chessex P., Watson C., Kaczala G. W., Rouleau T., Lavoie M. E., Friel J. and Lavoie J. C. (2010) Determinants of oxidant stress in extremely low birth weight premature infants. *Free Radic Biol Med*, 49: 1380-6.

Chopra A., Iyer V. K., Agarwala S., Mathur S. R., Aron M., Gupta S. D. and Verma K. (2010) Apoptotic protein expression, glycogen content, DNA ploidy and cell proliferation in hepatoblastoma subtyping and their role in prognostication. *Pediatr Surg Int*, 26: 1173-8.

Czauderna P., Lopez-Terrada D., Hiyama E., Haberle B., Malogolowkin M. H. and Meyers R. L. (2014) Hepatoblastoma state of the art: pathology, genetics, risk stratification, and chemotherapy. *Curr Opin Pediatr*, 26: 19-28.

Darbari A., Sabin K. M., Shapiro C. N. and Schwarz K. B. (2003) Epidemiology of primary hepatic malignancies in U.S. children. *Hepatology*, 38: 560-6.

Dezso K., Halasz J., Bisgaard H. C., Paku S., Turanyi E., Schaff Z. and Nagy P. (2008) Delta-like protein (DLK) is a novel immunohistochemical marker for human hepatoblastomas. *Virchows Arch*, 452: 443-8.

Dezsofi A., McLin V. and Hadzic N. (2014) Hepatic neoplasms in children: a focus on differential diagnosis. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 38: 399-402.

Dhawan P., Singh A. B., Deane N. G., No Y., Shiou S. R., Schmidt C., Neff J., Washington M. K. and Beauchamp R. D. (2005) Claudin-1 regulates cellular transformation and metastatic behavior in colon cancer. *J Clin Invest*, 115: 1765-76.

Dorfel M. J., Westphal J. K. and Huber O. (2009) Differential phosphorylation of occludin and tricellulin by CK2 and CK1. *Ann N Y Acad Sci*, 1165: 69-73.

Dukers D. F., van Galen J. C., Giroth C., Jansen P., Sewalt R. G., Otte A. P., Kluijn-Nelemans H. C., Meijer C. J. and Raaphorst F. M. (2004) Unique polycomb gene expression pattern in Hodgkin's lymphoma and Hodgkin's lymphoma-derived cell lines. *Am J Pathol*, 164: 873-81.

Endo E. G., Walton D. S. and Albert D. M. (1996) Neonatal hepatoblastoma metastatic to the choroid and iris. *Arch Ophthalmol*, 114: 757-61.

Eren E., Demirkaya M., Cakir E. D., Sevinir B., Saglam H. and Tarim O. (2009) A rare cause of precocious puberty: hepatoblastoma. *J Clin Res Pediatr Endocrinol*, 1: 281-3.

Escudero-Esparza A., Jiang W. G. and Martin T. A. (2011) The Claudin family and its role in cancer and metastasis. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 16: 1069-83.

Falix F. A., Aronson D. C., Lamers W. H., Hiralall J. K. and Seppen J. (2012) DLK1, a serum marker for hepatoblastoma in young infants. *Pediatr Blood Cancer*, 59: 743-5.

Fenaux P., Bowen D., Gattermann N., Hellstrom-Lindberg E., Hofmann W. K., Pfeilstocker M., Sanz G. and Santini V. (2010) Practical use of azacitidine in higher-risk myelodysplastic syndromes: an expert panel opinion. *Leuk Res*, 34: 1410-6.

French A. D., Fiori J. L., Camilli T. C., Leotlela P. D., O'Connell M. P., Frank B. P., Subaran S., Indig F. E., Taub D. D. and Weeraratna A. T. (2009) PKC and PKA phosphorylation affect the subcellular localization of claudin-1 in melanoma cells. *Int J Med Sci*, 6: 93-101.

Fujii S. and Ochiai A. (2008) Enhancer of zeste homolog 2 downregulates E-cadherin by mediating histone H3 methylation in gastric cancer cells. *Cancer Sci*, 99: 738-46.

Fujiwara M., Kwok S., Yano H. and Pai R. K. (2012) Arginase-1 is a more sensitive marker of hepatic differentiation than HepPar-1 and glypican-3 in fine-needle aspiration biopsies. *Cancer Cytopathol*, 120: 230-7.

Furuse M. (2014) [Molecular organization of tricellular tight junctions]. *Yakugaku Zasshi*, 134: 615-21.

Furuse M., Izumi Y., Oda Y., Higashi T. and Iwamoto N. (2014) Molecular organization of tricellular tight junctions. *Tissue Barriers*, 2: e28960.

Furuse M., Oda Y., Higashi T., Iwamoto N. and Masuda S. (2012) Lipolysis-stimulated lipoprotein receptor: a novel membrane protein of tricellular tight junctions. *Ann N Y Acad Sci*, 1257: 54-8.

Garami M., Schuler D. and Jakab Z. (2014) [Importance of the National Childhood Cancer Registry in the field of paediatric oncology care in Hungary]. *Orv Hetil*, 155: 732-9.

Giardiello F. M., Offerhaus G. J., Krush A. J., Booker S. V., Tersmette A. C., Mulder J. W., Kelley C. N. and Hamilton S. R. (1991) Risk of hepatoblastoma in familial adenomatous polyposis. *J Pediatr*, 119: 766-8.

Gnemmi V., Leteurtre E., Sudour-Bonnange H., Devisme L., Guettier C., Buob D. and Leroy X. (2013) SALL4 is a marker of the embryonal subtype of hepatoblastoma. *Histopathology*, 63: 425-8.

Goedeke J., Haeberle B., Schmid I. and von Schweinitz D. (2011) AFP negative cystic liver lesion in a child should let one think of hepatoblastoma. *J Pediatr Hematol Oncol*, 33: e245-7.

Gow A., Davies C., Southwood C. M., Frolenkov G., Chrustowski M., Ng L., Yamauchi D., Marcus D. C. and Kachar B. (2004) Deafness in Claudin 11-null mice reveals the critical contribution of basal cell tight junctions to stria vascularis function. *J Neurosci*, 24: 7051-62.

Gupta A. A., Gerstle J. T., Ng V., Wong A., Fecteau A., Malogolowkin M. H., Meyers R. L., Grant D. and Grant R. M. (2011) Critical review of controversial issues in the management of advanced pediatric liver tumors. *Pediatr Blood Cancer*, 56: 1013-8.

Gyugos M., Lendvai G., Kenessey I., Schlachter K., Halasz J., Nagy P., Garami M., Jakab Z., Schaff Z. and Kiss A. (2014) MicroRNA expression might predict prognosis of epithelial hepatoblastoma. *Virchows Arch*, 464: 419-27.

Hadj-Rabia S., Baala L., Vabres P., Hamel-Teillac D., Jacquemin E., Fabre M., Lyonnet S., De Prost Y., Munnich A., Hadchouel M. and Smahi A. (2004) Claudin-1 gene mutations in neonatal sclerosing cholangitis associated with ichthyosis: a tight junction disease. *Gastroenterology*, 127: 1386-90.

Hadzic N. and Finegold M. J. (2011) Liver neoplasia in children. *Clin Liver Dis*, 15: 443-62, vii-x.

Hadzic N., Finegold M. J., Iacob D., Serban A., Fufezan O., Badea R., Iancu C., Mitre C. and Neamtu S. (2010) Mixed hepatoblastoma in child. Case report. *Med Ultrason*, 12: 157-62.

Hajosi-Kalcakosz S., Dezso K., Bugyik E., Bodor C., Paku S., Pavai Z., Halasz J., Schlachter K., Schaff Z. and Nagy P. (2012) Enhancer of zeste homologue 2 (EZH2) is a reliable immunohistochemical marker to differentiate malignant and benign hepatic tumors. *Diagn Pathol*, 7: 86.

Halasz J., Holczbauer A., Paska C., Kovacs M., Benyo G., Verebely T., Schaff Z. and Kiss A. (2006) Claudin-1 and claudin-2 differentiate fetal and embryonal components in human hepatoblastoma. *Hum Pathol*, 37: 555-61.

Higashi T., Tokuda S., Kitajiri S., Masuda S., Nakamura H., Oda Y. and Furuse M. (2013) Analysis of the 'angulin' proteins LSR, ILDR1 and ILDR2--tricellulin recruitment, epithelial barrier function and implication in deafness pathogenesis. *J Cell Sci*, 126: 966-77.

Higashi Y., Suzuki S., Sakaguchi T., Nakamura T., Baba S., Reinecker H. C., Nakamura S. and Konno H. (2007) Loss of claudin-1 expression correlates with malignancy of hepatocellular carcinoma. *J Surg Res*, 139: 68-76.

Hirschman B. A., Pollock B. H. and Tomlinson G. E. (2005) The spectrum of APC mutations in children with hepatoblastoma from familial adenomatous polyposis kindreds. *J Pediatr*, 147: 263-6.

Hiyama E. (2013) Current therapeutic strategies for childhood hepatic malignant tumors. *Int J Clin Oncol*, 18: 943-5.

Holczbauer A., Gyongyosi B., Lotz G., Szijarto A., Kupcsulik P., Schaff Z. and Kiss A. (2013) Distinct claudin expression profiles of hepatocellular carcinoma and metastatic colorectal and pancreatic carcinomas. *J Histochem Cytochem*, 61: 294-305.

Honda S., Arai Y., Haruta M., Sasaki F., Ohira M., Yamaoka H., Horie H., Nakagawara A., Hiyama E., Todo S. and Kaneko Y. (2008) Loss of imprinting of IGF2 correlates with hypermethylation of the H19 differentially methylated region in hepatoblastoma. *Br J Cancer*, 99: 1891-9.

Hua W. F., Fu Y. S., Liao Y. J., Xia W. J., Chen Y. C., Zeng Y. X., Kung H. F. and Xie D. (2010) Curcumin induces down-regulation of EZH2 expression through the MAPK pathway in MDA-MB-435 human breast cancer cells. *Eur J Pharmacol*, 637: 16-21.

Huang G. W., Ding X., Chen S. L. and Zeng L. (2011) Expression of claudin 10 protein in hepatocellular carcinoma: impact on survival. *J Cancer Res Clin Oncol*, 137: 1213-8.

Hubertus J., Lacher M., Rottenkolber M., Muller-Hocker J., Berger M., Stehr M., von Schweinitz D. and Kappler R. (2011) Altered expression of imprinted genes in Wilms tumors. *Oncol Rep*, 25: 817-23.

Iida H., Hata M., Kakuno A., Hirano H., Yamanegi K., Yamada N., Ohyama H., Terada N., Yasui C., Yamanaka N. and Nakasho K. (2011) Expression of hepatocyte markers in mass-forming peripheral and periductal-infiltrating hilar intrahepatic cholangiocarcinomas. *Oncol Lett*, 2: 1041-1046.

Ikari A., Watanabe R., Sato T., Taga S., Shimobaba S., Yamaguchi M., Yamazaki Y., Endo S., Matsunaga T. and Sugatani J. (2014) Nuclear distribution of claudin-2 increases cell proliferation in human lung adenocarcinoma cells. *Biochim Biophys Acta*, 1843: 2079-88.

Ikenouchi J., Furuse M., Furuse K., Sasaki H. and Tsukita S. (2005) Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. *J Cell Biol*, 171: 939-45.

Ikenouchi J., Sasaki H., Tsukita S. and Furuse M. (2008) Loss of occludin affects tricellular localization of tricellulin. *Mol Biol Cell*, 19: 4687-93.

Islas S., Vega J., Ponce L. and Gonzalez-Mariscal L. (2002) Nuclear localization of the tight junction protein ZO-2 in epithelial cells. *Exp Cell Res*, 274: 138-48.

Kaarteenaho R., Merikallio H., Lehtonen S., Harju T. and Soini Y. (2010) Divergent expression of claudin -1, -3, -4, -5 and -7 in developing human lung. *Respir Res*, 11: 59.

Kaatsch P. (2010) Epidemiology of childhood cancer. *Cancer Treat Rev*, 36: 277-85.

Kappler R. and von Schweinitz D. (2012) A better way forward: targeting hedgehog signaling in liver cancer. *Front Biosci (Schol Ed)*, 4: 277-86.

Kiss A., Szepesi A., Lotz G., Nagy P. and Schaff Z. (1998) Expression of transforming growth factor-alpha in hepatoblastoma. *Cancer*, 83: 690-7.

Kitanovski L., Ovcak Z. and Jazbec J. (2009) Multifocal hepatoblastoma in a 6-month-old girl with trisomy 18: a case report. *J Med Case Rep*, 3: 8319.

Kleer C. G., Cao Q., Varambally S., Shen R., Ota I., Tomlins S. A., Ghosh D., Sewalt R. G., Otte A. P., Hayes D. F., Sabel M. S., Livant D., Weiss S. J., Rubin M. A. and Chinnaiyan A. M. (2003) EZH2 is a marker of aggressive breast cancer and promotes neoplastic transformation of breast epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 11606-11.

Kojima T., Fuchimoto J., Yamaguchi H., Ito T., Takasawa A., Ninomiya T., Kikuchi S., Ogasawara N., Ohkuni T., Masaki T., Hirata K., Himi T. and Sawada N. (2010) c-Jun N-terminal kinase is largely involved in the regulation of tricellular tight junctions via tricellulin in human pancreatic duct epithelial cells. *J Cell Physiol*, 225: 720-33.

Kojima T., Murata M., Yamamoto T., Lan M., Imamura M., Son S., Takano K., Yamaguchi H., Ito T., Tanaka S., Chiba H., Hirata K. and Sawada N. (2009) Tight junction proteins and signal transduction pathways in hepatocytes. *Histol Histopathol*, 24: 1463-72.

Kondoh A., Takano K., Kojima T., Ohkuni T., Kamekura R., Ogasawara N., Go M., Sawada N. and Himi T. (2011) Altered expression of claudin-1, claudin-7, and tricellulin regardless of human papilloma virus infection in human tonsillar squamous cell carcinoma. *Acta Otolaryngol*, 131: 861-8.

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. and Kiss A. (2012) Tricellulin expression in normal and neoplastic human pancreas. *Histopathology*, 60: E76-86.

Krings G., Ramachandran R., Jain D., Wu T. T., Yeh M. M., Torbenson M. and Kakar S. (2013) Immunohistochemical pitfalls and the importance of glypican 3 and arginase in the diagnosis of scirrhous hepatocellular carcinoma. *Mod Pathol*, 26: 782-91.

Krug S. M., Amasheh S., Richter J. F., Milatz S., Gunzel D., Westphal J. K., Huber O., Schulzke J. D. and Fromm M. (2009) Tricellulin forms a barrier to macromolecules in tricellular tight junctions without affecting ion permeability. *Mol Biol Cell*, 20: 3713-24.

Kumon K., Kobayashi H., Namiki T., Tsunematsu Y., Miyauchi J., Kikuta A., Horikoshi Y., Komada Y., Hatae Y., Eguchi H. and Kaneko Y. (2001) Frequent increase of DNA copy number in the 2q24 chromosomal region and its association with a poor clinical outcome in hepatoblastoma: cytogenetic and comparative genomic hybridization analysis. *Jpn J Cancer Res*, 92: 854-62.

Last B. F., Grootenhuis M. A. and Eiser C. (2005) International comparison of contributions to psychosocial research on survivors of childhood cancer: past and future considerations. *J Pediatr Psychol*, 30: 99-113.

Lee C. T., Zhang L., Mounajjed T. and Wu T. T. (2013) High mobility group AT-hook 2 is overexpressed in hepatoblastoma. *Hum Pathol*, 44: 802-10.

Leotlela P. D., Wade M. S., Duray P. H., Rhode M. J., Brown H. F., Rosenthal D. T., Dissanayake S. K., Earley R., Indig F. E., Nickoloff B. J., Taub D. D., Kallioniemi O. P., Meltzer P., Morin P. J. and Weeraratna A. T. (2007) Claudin-1 overexpression in melanoma is regulated by PKC and contributes to melanoma cell motility. *Oncogene*, 26: 3846-56.

Lessard J. and Sauvageau G. (2003) Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells. *Nature*, 423: 255-60.

Li X., Gonzalez M. E., Toy K., Filzen T., Merajver S. D. and Kleer C. G. (2009) Targeted overexpression of EZH2 in the mammary gland disrupts ductal morphogenesis and causes epithelial hyperplasia. *Am J Pathol*, 175: 1246-54.

Li Y. C., Deng Y. H., Guo Z. H., Zhang M. M., Zhu J., Pu C. L., Xiang C. P. and Guo C. B. (2010) Prognostic value of hedgehog signal component expressions in hepatoblastoma patients. *Eur J Med Res*, 15: 468-74.

Linabery A. M. and Ross J. A. (2008) Trends in childhood cancer incidence in the U.S. (1992-2004). *Cancer*, 112: 416-32.

Lodi C., Szabo E., Holczbauer A., Batmunkh E., Szijarto A., Kupcsulik P., Kovalszky I., Paku S., Illyes G., Kiss A. and Schaff Z. (2006) Claudin-4 differentiates biliary tract cancers from hepatocellular carcinomas. *Mod Pathol*, 19: 460-9.

Lopez-Terrada D., Alaggio R., de Davila M. T., Czauderna P., Hiyama E., Katzenstein H., Leuschner I., Malogolowkin M., Meyers R., Ranganathan S., Tanaka Y., Tomlinson G., Fabre M., Zimmermann A. and Finegold M. J. (2014) Towards an international pediatric liver tumor consensus classification: proceedings of the Los Angeles COG liver tumors symposium. *Mod Pathol*, 27: 472-91.

Mahajan A., Liu Z., Gellert L., Zou X., Yang G., Lee P., Yang X. and Wei J. J. (2010) HMGA2: a biomarker significantly overexpressed in high-grade ovarian serous carcinoma. *Mod Pathol*, 23: 673-81.

Maibach R., Roebuck D., Brugieres L., Capra M., Brock P., Dall'Igna P., Otte J. B., De Camargo B., Zsiros J., Zimmermann A., Aronson D., Childs M., Scopinaro M., Morland B., Plaschkes J., Czauderna P. and Perilongo G. (2012) Prognostic stratification for children with hepatoblastoma: the SIOPEL experience. *Eur J Cancer*, 48: 1543-9.

Malogolowkin M. H., Katzenstein H. M., Meyers R. L., Krailo M. D., Rowland J. M., Haas J. and Finegold M. J. (2011) Complete surgical resection is curative for children with hepatoblastoma with pure fetal histology: a report from the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol*, 29: 3301-6.

Mao H., Gao W., Lu G., Fang F. and Teng L. (2013) Clinicopathological and prognostic implications of arginase expression in hepatocellular carcinoma. *Clin Lab*, 59: 37-43.

Mariano C., Palmela I., Pereira P., Fernandes A., Falcao A. S., Cardoso F. L., Vaz A. R., Campos A. R., Goncalves-Ferreira A., Kim K. S., Brites D. and Brito M. A. (2013) Tricellulin expression in brain endothelial and neural cells. *Cell Tissue Res*, 351: 397-407.

Mariano C., Silva S. L., Pereira P., Fernandes A., Brites D. and Brito M. A. (2011) Evidence of tricellulin expression by immune cells, particularly microglia. *Biochem Biophys Res Commun*, 409: 799-802.

Masuda R., Semba S., Mizuuchi E., Yanagihara K. and Yokozaki H. (2010) Negative regulation of the tight junction protein tricellulin by snail-induced epithelial-mesenchymal transition in gastric carcinoma cells. *Pathobiology*, 77: 106-113.

Matsukawa Y., Semba S., Kato H., Ito A., Yanagihara K. and Yokozaki H. (2006) Expression of the enhancer of zeste homolog 2 is correlated with poor prognosis in human gastric cancer. *Cancer Sci*, 97: 484-91.

McLaughlin C. C., Baptiste M. S., Schymura M. J., Nasca P. C. and Zdeb M. S. (2006) Maternal and infant birth characteristics and hepatoblastoma. *Am J Epidemiol*, 163: 818-28.

Melnick A. (2012) Epigenetic therapy leaps ahead with specific targeting of EZH2. *Cancer Cell*, 22: 569-70.

Meyers R. L., Rowland J. R., Krailo M., Chen Z., Katzenstein H. M. and Malogolowkin M. H. (2009) Predictive power of pretreatment prognostic factors in children with

hepatoblastoma: a report from the Children's Oncology Group. *Pediatr Blood Cancer*, 53: 1016-22.

Meyers R. L., Tiao G., de Ville de Goyet J., Superina R. and Aronson D. C. (2014) Hepatoblastoma state of the art: pre-treatment extent of disease, surgical resection guidelines and the role of liver transplantation. *Curr Opin Pediatr*, 26: 29-36.

Mineta K., Yamamoto Y., Yamazaki Y., Tanaka H., Tada Y., Saito K., Tamura A., Igarashi M., Endo T., Takeuchi K. and Tsukita S. (2011) Predicted expansion of the claudin multigene family. *FEBS Lett*, 585: 606-12.

Mochizuki-Kashio M., Mishima Y., Miyagi S., Negishi M., Saraya A., Konuma T., Shinga J., Koseki H. and Iwama A. (2011) Dependency on the polycomb gene *Ezh2* distinguishes fetal from adult hematopoietic stem cells. *Blood*, 118: 6553-61.

Mori M. (2007) Regulation of nitric oxide synthesis and apoptosis by arginase and arginine recycling. *J Nutr*, 137: 1616S-1620S.

Morin R. D., Johnson N. A., Severson T. M., Mungall A. J., An J., Goya R., Paul J. E., Boyle M., Woolcock B. W., Kuchenbauer F., Yap D., Humphries R. K., Griffith O. L., Shah S., Zhu H., Kimbara M., Shashkin P., Charlot J. F., Tcherpakov M., Corbett R., Tam A., Varhol R., Smailus D., Moksa M., Zhao Y., Delaney A., Qian H., Birol I., Schein J., Moore R., Holt R., Horsman D. E., Connors J. M., Jones S., Aparicio S., Hirst M., Gascoyne R. D. and Marra M. A. (2010) Somatic mutations altering *EZH2* (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin. *Nat Genet*, 42: 181-5.

Morris S. M., Jr. (2006) Arginine: beyond protein. *Am J Clin Nutr*, 83: 508S-512S.

Nagarajan P., Ge Z., Sirbu B., Doughty C., Agudelo Garcia P. A., Schleder M., Annunziato A. T., Cortez D., Kenner L. and Parthun M. R. (2013) Histone acetyltransferase 1 is essential for mammalian development, genome stability, and the processing of newly synthesized histones H3 and H4. *PLoS Genet*, 9: e1003518.

Nagata T., Takahashi Y., Ishii Y., Asai S., Nishida Y., Murata A., Koshinaga T., Fukuzawa M., Hamazaki M., Asami K., Ito E., Ikeda H., Takamatsu H., Koike K., Kikuta A., Kuroiwa M., Watanabe A., Kosaka Y., Fujita H., Miyake M. and Mugishima H. (2003) Transcriptional profiling in hepatoblastomas using high-density oligonucleotide DNA array. *Cancer Genet Cytogenet*, 145: 152-60.

Nikoloski G., Langemeijer S. M., Kuiper R. P., Knops R., Massop M., Tonnissen E. R., van der Heijden A., Scheele T. N., Vandenberghe P., de Witte T., van der Reijden B. A. and Jansen J. H. (2010) Somatic mutations of the histone methyltransferase gene *EZH2* in myelodysplastic syndromes. *Nat Genet*, 42: 665-7.

O'Carroll D., Erhardt S., Pagani M., Barton S. C., Surani M. A. and Jenuwein T. (2001) The polycomb-group gene *Ezh2* is required for early mouse development. *Mol Cell Biol*, 21: 4330-6.

Ogasawara N., Kojima T., Go M., Ohkuni T., Koizumi J., Kamekura R., Masaki T., Murata M., Tanaka S., Fuchimoto J., Himi T. and Sawada N. (2010) PPAR γ agonists upregulate the barrier function of tight junctions via a PKC pathway in human nasal epithelial cells. *Pharmacol Res*, 61: 489-98.

Ohkuni T., Kojima T., Ogasawara N., Masaki T., Ninomiya T., Kikuchi S., Go M., Takano K., Himi T. and Sawada N. (2009) Expression and localization of tricellulin in human nasal epithelial cells in vivo and in vitro. *Med Mol Morphol*, 42: 204-11.

Olsen E. A., Kim Y. H., Kuzel T. M., Pacheco T. R., Foss F. M., Parker S., Frankel S. R., Chen C., Ricker J. L., Arduino J. M. and Duvic M. (2007) Phase IIb multicenter trial of vorinostat in patients with persistent, progressive, or treatment refractory cutaneous T-cell lymphoma. *J Clin Oncol*, 25: 3109-15.

OS M. (1898) A case of teratoma hepatis. *J Pathol Bacteriol*, 5: 128-37

Patonai A., Erdelyi-Belle B., Korompay A., Somoracz A., Straub B. K., Schirmacher P., Kovalszky I., Lotz G., Kiss A. and Schaff Z. (2011) Claudins and tricellulin in fibrolamellar hepatocellular carcinoma. *Virchows Arch*, 458: 679-88.

Perilongo G., Malogolowkin M. and Feusner J. (2012) Hepatoblastoma clinical research: lessons learned and future challenges. *Pediatr Blood Cancer*, 59: 818-21.

Perilongo G., Shafford E. and Plaschkes J. (2000) SIOPEL trials using preoperative chemotherapy in hepatoblastoma. *Lancet Oncol*, 1: 94-100.

Popovic R., Shah M. Y. and Licht J. D. (2013) Epigenetic therapy of hematological malignancies: where are we now? *Ther Adv Hematol*, 4: 81-91.

Prokurat A., Kluge P., Kosciesza A., Perek D., Kappeler A. and Zimmermann A. (2002) Transitional liver cell tumors (TLCT) in older children and adolescents: a novel group of aggressive hepatic tumors expressing beta-catenin. *Med Pediatr Oncol*, 39: 510-8.

Pu C. L., Guo C. B., Jin X. Q., Deng C., Zhang M. M., Li Y. C. and Kang Q. (2009) [Retrospective analysis of maternal and infant birth features of hepatoblastoma patients]. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*, 17: 459-61.

Puertollano R., Menendez M. and Alonso M. A. (1999) Incorporation of MAL, an integral protein element of the machinery for the glycolipid and cholesterol-mediated apical pathway of transport, into artificial membranes requires neither of these lipid species. *Biochem Biophys Res Commun*, 266: 330-3.

Purcell R., Childs M., Maibach R., Miles C., Turner C., Zimmermann A. and Sullivan M. (2011) HGF/c-Met related activation of beta-catenin in hepatoblastoma. *J Exp Clin Cancer Res*, 30: 96.

RA W. (1962) *The pathology of the tumours of children*
Springfield, 57-61.

Rainier S., Dobry C. J. and Feinberg A. P. (1995) Loss of imprinting in hepatoblastoma. *Cancer Res*, 55: 1836-8.

Raleigh D. R., Marchiando A. M., Zhang Y., Shen L., Sasaki H., Wang Y., Long M. and Turner J. R. (2010) Tight junction-associated MARVEL proteins *marveld3*, *tricellulin*, and *occludin* have distinct but overlapping functions. *Mol Biol Cell*, 21: 1200-13.

Riazuddin S., Ahmed Z. M., Fanning A. S., Lagziel A., Kitajiri S., Ramzan K., Khan S. N., Chattaraj P., Friedman P. L., Anderson J. M., Belyantseva I. A., Forge A. and Friedman T. B. (2006) *Tricellulin* is a tight-junction protein necessary for hearing. *Am J Hum Genet*, 79: 1040-51.

Richter G. H., Plehm S., Fasan A., Rossler S., Unland R., Bennani-Baiti I. M., Hotfilder M., Lowel D., von Luetlichau I., Mossbrugger I., Quintanilla-Martinez L., Kovar H., Staeger M. S., Muller-Tidow C. and Burdach S. (2009) *EZH2* is a mediator of *EWS/FLI1* driven tumor growth and metastasis blocking endothelial and neuro-ectodermal differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106: 5324-9.

Roebuck D. J., Sebire N. J. and Pariente D. (2007) Assessment of extrahepatic abdominal extension in primary malignant liver tumours of childhood. *Pediatr Radiol*, 37: 1096-100.

Sakamoto L. H., B D. E. C., Cajaiba M., Soares F. A. and Vettore A. L. (2010) MT1G hypermethylation: a potential prognostic marker for hepatoblastoma. *Pediatr Res*, 67: 387-93.

Sanchez-Pulido L., Martin-Belmonte F., Valencia A. and Alonso M. A. (2002) MARVEL: a conserved domain involved in membrane apposition events. *Trends Biochem Sci*, 27: 599-601.

Sanders R. P. and Furman W. L. (2006) Familial adenomatous polyposis in two brothers with hepatoblastoma: implications for diagnosis and screening. *Pediatr Blood Cancer*, 47: 851-4.

Sauvageau M. and Sauvageau G. (2010) Polycomb group proteins: multi-faceted regulators of somatic stem cells and cancer. *Cell Stem Cell*, 7: 299-313.

Savas N., Canan O., Ozcay F., Bilezikci B., Karakayali H., Yilmaz U. and Haberal M. (2006) Hepatocellular carcinoma in Wilson's disease: a rare association in childhood. *Pediatr Transplant*, 10: 639-43.

Sawada N. (2013) Tight junction-related human diseases. *Pathol Int*, 63: 1-12.

Schiffman S. C., Li Y., Xiao D., Li X., Aiyer H. S. and Martin R. C. (2011) The resistance of esophageal adenocarcinoma to bile salt insult is associated with manganese superoxide dismutase expression. *J Surg Res*, 171: 623-30.

Schluter H., Moll I., Wolburg H. and Franke W. W. (2007) The different structures containing tight junction proteins in epidermal and other stratified epithelial cells, including squamous cell metaplasia. *Eur J Cell Biol*, 86: 645-55.

Schulzke J. D. and Fromm M. (2009) Tight junctions: molecular structure meets function. *Ann N Y Acad Sci*, 1165: 1-6.

Scott L., Lamb J., Smith S. and Wheatley D. N. (2000) Single amino acid (arginine) deprivation: rapid and selective death of cultured transformed and malignant cells. *Br J Cancer*, 83: 800-10.

Secretan B., Straif K., Baan R., Grosse Y., El Ghissassi F., Bouvard V., Benbrahim-Tallaa L., Guha N., Freeman C., Galichet L. and Cogliano V. (2009) A review of human carcinogens--Part E: tobacco, areca nut, alcohol, coal smoke, and salted fish. *Lancet Oncol*, 10: 1033-4.

Singh R., Pervin S., Karimi A., Cederbaum S. and Chaudhuri G. (2000) Arginase activity in human breast cancer cell lines: N(omega)-hydroxy-L-arginine selectively inhibits cell proliferation and induces apoptosis in MDA-MB-468 cells. *Cancer Res*, 60: 3305-12.

Singh T., Satheesh C. T., Appaji L., Aruna Kumari B. S., Padma M., Kumar M. V. and Mukherjee G. (2010) Hepatoblastoma: experience from a single center. *Indian J Cancer*, 47: 314-6.

Sobel G., Nemeth J., Kiss A., Lotz G., Szabo I., Udvarhelyi N., Schaff Z. and Paska C. (2006) Claudin 1 differentiates endometrioid and serous papillary endometrial adenocarcinoma. *Gynecol Oncol*, 103: 591-8.

Somoracz A., Korompay A., Torzsok P., Patonai A., Erdelyi-Belle B., Lotz G., Schaff Z. and Kiss A. (2014) Tricellulin expression and its prognostic significance in primary liver carcinomas. *Pathol Oncol Res*, 20: 755-64.

Spector L. G. and Birch J. (2012) The epidemiology of hepatoblastoma. *Pediatr Blood Cancer*, 59: 776-9.

Spector L. G., Feusner J. H. and Ross J. A. (2004) Hepatoblastoma and low birth weight. *Pediatr Blood Cancer*, 43: 706.

Spector L. G., Johnson K. J., Soler J. T. and Puumala S. E. (2008) Perinatal risk factors for hepatoblastoma. *Br J Cancer*, 98: 1570-3.

Su I. H., Basavaraj A., Krutchinsky A. N., Hobert O., Ullrich A., Chait B. T. and Tarakhovsky A. (2003) Ezh2 controls B cell development through histone H3 methylation and Igh rearrangement. *Nat Immunol*, 4: 124-31.

Sudo T., Utsunomiya T., Mimori K., Nagahara H., Ogawa K., Inoue H., Wakiyama S., Fujita H., Shirouzu K. and Mori M. (2005) Clinicopathological significance of EZH2 mRNA expression in patients with hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer*, 92: 1754-8.

Takasawa A., Kojima T., Ninomiya T., Tsujiwaki M., Murata M., Tanaka S. and Sawada N. (2013) Behavior of tricellulin during destruction and formation of tight junctions under various extracellular calcium conditions. *Cell Tissue Res*, 351: 73-84.

Taylor S. L. and Haque S. (2011) Hepatobiliary pathology. *Curr Opin Gastroenterol*, 27: 248-55.

Timek D. T., Shi J., Liu H. and Lin F. (2012) Arginase-1, HepPar-1, and Glypican-3 are the most effective panel of markers in distinguishing hepatocellular carcinoma from metastatic tumor on fine-needle aspiration specimens. *Am J Clin Pathol*, 138: 203-10.

Toya T., Hakuno D., Shiraishi Y., Kujiraoka T. and Adachi T. (2014) Arginase inhibition augments nitric oxide production and facilitates left ventricular systolic function in doxorubicin-induced cardiomyopathy in mice. *Physiol Rep*, 2:

Tsang D. P. and Cheng A. S. (2011) Epigenetic regulation of signaling pathways in cancer: role of the histone methyltransferase EZH2. *J Gastroenterol Hepatol*, 26: 19-27.

Tsukita S. and Furuse M. (1999) Occludin and claudins in tight-junction strands: leading or supporting players? *Trends Cell Biol*, 9: 268-73.

Tsukita S., Yamazaki Y., Katsuno T. and Tamura A. (2008) Tight junction-based epithelial microenvironment and cell proliferation. *Oncogene*, 27: 6930-8.

Varambally S., Dhanasekaran S. M., Zhou M., Barrette T. R., Kumar-Sinha C., Sanda M. G., Ghosh D., Pienta K. J., Sewalt R. G., Otte A. P., Rubin M. A. and Chinnaiyan A. M. (2002) The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature*, 419: 624-9.

Verdone L., Caserta M. and Di Mauro E. (2005) Role of histone acetylation in the control of gene expression. *Biochem Cell Biol*, 83: 344-53.

Vissers J. H., van Lohuizen M. and Citterio E. (2012) The emerging role of Polycomb repressors in the response to DNA damage. *J Cell Sci*, 125: 3939-48.

von Schweinitz D., Leuschner I., Gluer S. and Pietsch T. (1996) Expression of cell adhesion molecules and common acute lymphoblastic leukaemia antigen in hepatoblastoma. *Virchows Arch*, 429: 235-41.

Walther W., Petkov S., Kuvardina O. N., Aumann J., Kobelt D., Fichtner I., Lemm M., Piontek J., Blasig I. E., Stein U. and Schlag P. M. (2012) Novel *Clostridium perfringens* enterotoxin suicide gene therapy for selective treatment of claudin-3- and -4-overexpressing tumors. *Gene Ther*, 19: 494-503.

Wang C., Liu X., Chen Z., Huang H., Jin Y., Kolokythas A., Wang A., Dai Y., Wong D. T. and Zhou X. (2013) Polycomb group protein EZH2-mediated E-cadherin repression promotes metastasis of oral tongue squamous cell carcinoma. *Mol Carcinog*, 52: 229-36.

Wang C. G., Ye Y. J., Yuan J., Liu F. F., Zhang H. and Wang S. (2010) EZH2 and STAT6 expression profiles are correlated with colorectal cancer stage and prognosis. *World J Gastroenterol*, 16: 2421-7.

Wang Q. Z., Gong Y. H., Lu Y. H., Fei L. N., Liu H. J., Diao Y. and Xu R. A. (2011) [Selection and anti-cancer effects of siRNAs targeting HMGA2 gene]. *Yao Xue Xue Bao*, 46: 1444-50.

Ward E., DeSantis C., Robbins A., Kohler B. and Jemal A. (2014) Childhood and adolescent cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin*, 64: 83-103.

Westphal J. K., Dorfel M. J., Krug S. M., Cording J. D., Piontek J., Blasig I. E., Tauber R., Fromm M. and Huber O. (2010) Tricellulin forms homomeric and heteromeric tight junctional complexes. *Cell Mol Life Sci*, 67: 2057-68.

Witte M. B. and Barbul A. (2003) Arginine physiology and its implication for wound healing. *Wound Repair Regen*, 11: 419-23.

Wu C. W., Chung W. W., Chi C. W., Kao H. L., Lui W. Y., P'Eng F K. and Wang S. R. (1996) Immunohistochemical study of arginase in cancer of the stomach. *Virchows Arch*, 428: 325-31.

Yamada S., Ohira M., Horie H., Ando K., Takayasu H., Suzuki Y., Sugano S., Hirata T., Goto T., Matsunaga T., Hiyama E., Hayashi Y., Ando H., Suita S., Kaneko M., Sasaki F., Hashizume K., Ohnuma N. and Nakagawara A. (2004) Expression profiling and differential screening between hepatoblastomas and the corresponding normal livers: identification of high expression of the PLK1 oncogene as a poor-prognostic indicator of hepatoblastomas. *Oncogene*, 23: 5901-11.

Yan B. C., Gong C., Song J., Krausz T., Tretiakova M., Hyjek E., Al-Ahmadie H., Alves V., Xiao S. Y., Anders R. A. and Hart J. A. (2010) Arginase-1: a new immunohistochemical marker of hepatocytes and hepatocellular neoplasms. *Am J Surg Pathol*, 34: 1147-54.

Zatkova A., Rouillard J. M., Hartmann W., Lamb B. J., Kuick R., Eckart M., von Schweinitz D., Koch A., Fonatsch C., Pietsch T., Hanash S. M. and Wimmer K. (2004) Amplification and overexpression of the IGF2 regulator PLAG1 in hepatoblastoma. *Genes Chromosomes Cancer*, 39: 126-37.

Zhao H., Xu Y., Mao Y. and Zhang Y. (2013) Effects of EZH2 gene on the growth and migration of hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *Hepatobiliary Surg Nutr*, 2: 78-83.

Zimmermann A. (2005) The emerging family of hepatoblastoma tumours: from ontogenesis to oncogenesis. *Eur J Cancer*, 41: 1503-14.

Zynger D. L., Gupta A., Luan C., Chou P. M., Yang G. Y. and Yang X. J. (2008)
Expression of glypican 3 in hepatoblastoma: an immunohistochemical study of 65 cases.
Hum Pathol, 39: 224-30.

12 SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

Megjelent közlemények impact factora (IF): 7,711

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények: (IF: 5,151)

Schlachter K., Gyugos M., Halasz J., Lendvai G., Baghy K., Garami M., Gyongyosi B., Schaff Z. and Kiss A. (2014) High tricellulin expression is associated with better survival in human hepatoblastoma. *Histopathology*, 65: 631-41.

IF: 3.301

Hajosi-Kalcakosz S., Dezso K., Bugyik E., Bodor C., Paku S., Pavai Z., Halasz J., Schlachter K., Schaff Z. and Nagy P. (2012) Enhancer of zeste homologue 2 (EZH2) is a reliable immunohistochemical marker to differentiate malignant and benign hepatic tumors. *Diagn Pathol*, 7: 86.

IF: 1.850

Nem az értekezés alapjául szolgáló közlemények (IF: 2,560)

Gyugos M., Lendvai G., Kenessey I., Schlachter K., Halasz J., Nagy P., Garami M., Jakob Z., Schaff Z. and Kiss A. (2014) MicroRNA expression might predict prognosis of epithelial hepatoblastoma. *Virchows Arch*, 464: 419-27.

IF: 2.560

13 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton köszönetemet fejezem ki Mindazoknak, akik az értekezés elkészítésében segítségemre voltak.

Elsőként köszönöm témavezetőmnek, **Prof. Dr. Schaff Zsuzsának**, hogy mindvégig támogatta tudományos munkámat és a Doktori Iskolába való jelentkezésemet. Köszönöm, hogy lehetővé tette és segítette ezen munka létrejöttét. Köszönöm Professzor Asszonynak mindenre kiterjedő figyelmét és tanácsait, továbbá, hogy a patológiai tudományokban és ezen munkám során is folyamatosan segített és irányított. Külön köszönöm, hogy lehetőséget teremtett tudományos eredményeink számos, nivós nemzetközi konferencián való bemutatására

Ezen tudományos munkám elvégzése során **Kiss András docens úr** folyamatosan mindvégig nagy odafigyeléssel irányított, maximálisan támogatott és biztosította a lehetőséget, hogy a laboratóriumában dolgozzam. Külön köszönöm segítségét a Doktori Iskolába való jelentkezésem során.

Szeretném megköszönni **Dr. Lendvai Gábor** alapos és kitartó segítő munkáját, hasznos észrevételeit.

Köszönettel tartozom **Dr. Lotz Gábor** docens úrnak az immunhisztokémiai és immunfluoreszcens vizsgálatok kivitelezésében és értékelésében nyújtott segítségével.

Köszönöm **Dr. Kenessey Istvánnak** a statisztikai számításokban nyújtott iránymutatást, segítséget.

Köszönet **Dr. Garami Miklós** docens úrnak és **Dr. Jakab Zsuzsanna** doktornőnek, hogy a betegek klinikai adatait rendelkezésemre bocsátották.

Dr. Baghy Kornélia nagy segítséget nyújtott a mintáink kiválasztásában, illetve a sejtvonalakkal kapcsolatos vizsgálatok kivitelezésében, köszönet érte.

Hasonlóan hálával tartozom az intézet asszisztenseinek. Az immunhisztokémiai vizsgálatok kivitelezésében **Sklánitzné Samodai Erikának** és **Gregor Viktóriának** köszönöm fáradhatatlan segítségüket és tanácsaikat az immunhisztokémiai vizsgálatok elvégzésével kapcsolatban. Köszönettel tartozom **Pekár Zoltánné Magdinak** és **Horváth Csillának** is, akik mindig rendkívül készségesen segítettek a vizsgálatok elvégzése során. A rutin hisztológiai laboratóriumból köszönet a sok segítségért **Tordainé Szabó Hedvignek**.

Szeretném megköszönni a fordítások, lektorálások, az adminisztratív teendők során kapott segítséget **Rigóné Kálé Elvirának**.

Köszönet illeti a II.sz. Patológiai Intézetben dolgozó PhD hallgató társaimat és kollégáimat –Dr. Gyöngyössy Benedeket, Dr. Halász Juditot, Dr. Kiss Orsolyát, Dr. Imrédi Eleonórárt, Gyugos Mónikát, Dr. Tőkés Anna-Máriát, Vígh Esztert–, akikre mindig támaszkodhattam vizsgálataink kivitelezésekor, és akik hasznos tanácsokkal láttak el, és nem utolsó sorban, akikkel sokszor együtt osztoztunk a PhD munka nehézségeiben.

Végül, szeretném megköszönni **családomnak és barátaimnak** biztató szavaikat, belém vetett bizalmukat és türelmüket. Köszönöm páromnak, **Oláh Gergelynek** türelmét, fáradhatatlan segítséget munkám megírásában, elkészítésében, szerkesztésében. Köszönöm, hogy végig mellettem állt és támogatott, lelkesített és elviselte a munka készítésével járó sok lemondást.