

Tricellulin expressziója humán pancreasban és májban, illetve ezek primer daganataiban

Doktori értekezés

Dr. Korompay Anna

Semmelweis Egyetem
Patológiai tudományok Doktori Iskola



Témavezetők: Dr. Schaff Zsuzsa, az MTA levelező tagja, professor emerita

Dr. Kiss András, PhD, egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Végső Gyula PhD, egyetemi adjunktus

Dr. Szmola Richárd PhD, főorvos

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Sági Zoltán DSc, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Simon Károly PhD, osztályvezető főorvos

Dr. Bodánszky Hedvig, PhD, egyetemi magántanár

Budapest
2016

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK.....	5
1. BEVEZETÉS – IRODALMI HÁTTÉR	9
1.1. NORMÁL PANCREASSZÖVET ÉS HASNYÁLMIRIGYDAGANATOK	9
<i>1.1.1. A normál pancreasszövet felépítése és működése</i>	<i>9</i>
<i>1.1.2. Hasnyálmirigydaganatok</i>	<i>11</i>
1.1.2.1. Ductalis adenocarcinomák.....	11
1.1.2.2. Endocrin pancreasdaganatok	14
1.1.2.3. Acinussejtes carcinoma	17
1.2. Normál májszövet és májdaganatok	19
<i>1.2.1. A normál májszövet felépítése és működése</i>	<i>19</i>
<i>1.2.2. Primer májdaganatok.....</i>	<i>20</i>
1.2.2.1. Hepatocellularis carcinoma	20
1.2.2.2. Fibrolamellaris hepatocellularis carcinoma.....	21
1.2.2.3. Cholangiocarcinoma.....	23
1.3. Sejtkapcsoló struktúrák	24
1.3.1. Tight junction	24
1.3.1.1. ZO-fehérvék	28
1.3.1.2. Occludin	29
1.3.1.3. Claudinok	30
1.3.1.4. Tricellulin	34
1.3.1.4.1. A TRIC felépítése	35
1.3.1.4.2. A TRIC funkciója	36
1.3.1.4.3. A TRIC genetikája és szabályozása.....	37
1.3.1.5. Lipolysis stimulált lipoprotein receptor (LSR).....	39
1.3.2. Az adherens junctio	40
1.3.3. Desmosoma.....	41
2. CÉLKITŰZÉSEK	42
3. MÓDSZEREK	44
3.1. Betegek, vizsgálati anyagok	44
3.2. Módszerek.....	46

3.2.1. Szövettani vizsgálatok.....	46
3.2.2. Immunfluoreszcencia.....	46
3.2.3. Immunhisztokémiai reakciók.....	48
3.2.4. A tricellulin immunhisztokémiai reakciók értékelése	48
3.2.5. Statisztikai analízis	49
3.2.6. Western-blot.....	49
3.2.7. RT-PCR.....	50
4. EREDMÉNYEK	52
4.1. Immunfluoreszcencia.....	52
4.1.1. <i>Pancreas immunfluoreszcens vizsgálatok</i>	<i>52</i>
4.2.1. <i>Máj immunfluoreszcens vizsgálatok</i>	<i>53</i>
4.2. Immunhisztokémiai reakciók	55
4.2.1. <i>Pancreas és pancreasdaganatok vizsgálata.....</i>	<i>55</i>
4.2.1.1. Normál hasnyálmirigy	55
4.2.1.2. Pancreas ductalis adenocarcinomák	56
4.2.1.3. Pancreas endocrin tumorok	57
4.2.1.4. Acinussejtes carcinoma	58
4.2.2. <i>Máj és májdaganatok vizsgálata</i>	<i>58</i>
4.2.1.1. Tricellulin expresszió normál májban	58
4.2.1.2. Tricellulin expresszió vizsgálata cirrhotikus májban	59
4.2.1.3. Tricellulin expresszió vizsgálata hepatocelluláris carcinomákban.....	59
4.2.1.4. Tricellulin vizsgálata intrahepatikus cholangiocarcinomákban	61
4.2.1.5. Tricellulin vizsgálata fibrolamelláris hepatocelluláris carcinomákban ..	62
4.3. Statisztikai eredmények	63
4.3.1. <i>Pancreas irányú vizsgálatok</i>	<i>63</i>
4.3.2. <i>Májjal kapcsolatos vizsgálatok.....</i>	<i>65</i>
4.4. Western-blot	68
4.5. RT-PCR	70
5. MEGBESZÉLÉS	72
6. KÖVETKEZTETÉSEK.....	83
7. ÖSSZEFOGLALÁS	86

8. SUMMARY	87
9. IRODALOMJEGYZÉK	88
10. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE	108
11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	110

RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK

5-FU	5-fluorouracil
5-HIAA	5-hydroxi-indolacetic acid
ABL-ab	Abelson murine leukaemia viral oncogene homolog 1 gén
ACC	acinussejtes carcinoma
ACTH	adrenocorticotrop hormon
AFP	α -fetoprotein
AJ	adherent junction
AJCC	American Joint Committee on Cancer
AKT-2	actin-likeprotein gene-2
AP-1	activator protein 1 gén
APC	adenomatosis polyposis coli gén
BRCA	breast cancer antigen
bTJ	bicellularis tight junction
CA 19-9	carbohydrate antigen 19-9
CD	cluster of differentiation
CEA	carcinoembrionalis antigén
CEACAM5	carcinoembrionalis antigen-related cell adhesion molecule 5
CK	cytokeratin
CLDN	claudin
CPE	Clostridium perfringens enterotoxin
CPS1	carbamoyl-phosphate synthase 1 gén
CT	computed tomographia
DAB	diamino-benzidin
DAPI	4',6-diamino-2-phenylindole
DNS	dezoxiribonukleinsav
DPC-4	deleted in pancreatic cancer gene, locus 4
EC-sejt	enterochromaffin-sejt
eCC	extrahepatikus cholangiocarcinoma
ECM	extracellularis mátrix
EDTA	ethylenediamine-tetraacetic acid

EGFR	epithelial növekedési faktor receptor
EMT	epithelialis-mesenchymalis transitio
EPCAM	epithelial cell adhesion molecule
ErbB-2	erb-b2receptor tyrosine kinase 2
ERCP	endoszkópos retrográd cholangio-pancreatographia
FGF	fibroblast növekedési faktor
FLHCC	fibrolamellaris hepatocellularis carcinoma
FNH	focalis modularis hyperplasia
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GH	növekedési hormon
HB	hepatoblastoma
HBV	hepatitis-B vírus
HCC	hepatocellularis carcinoma
HCV	hepatitis-C vírus
HE	hematoxylin-eosin
HPDE-sejtek	humán pancreas ductus epithelialis sejtek
HPF	high power field
HPV	humán papilloma vírus
HRCT	high-resolution computed tomography
HRP	horseradish peroxidase
HTERT	humán telomerase reverse transcriptase
HTVL-1	humán T-sejtes leukaemia vírus 1
iCC	intrahepatikus cholangiocarcinoma
IFN	interferon
IPMN	intraductalis papillaris mucinosus neoplasia
ITIH-1	inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 1 gén
JAM-protein	junction-associated membrane protein
JNK	c-Jun NH2-terminal Kinase
kDa	kiloDalton
KO	knock out
kr	kromoszóma
k-ras	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog

LOH	loss of heterozygosity
LSR	lipolysis stimulated lipoprotein
MAGI	membrane-associated guanylate kinase with inverted orientation
MAGUK	membrane-associated guanylate kinase-like homologue
MARVEL	MAL and Related proteins for VEsicle trafficking and membrane Link
MDCK	Madin Darby canine kidney
MEN	multiplex endocrin neoplasia
miR	mikroRNS
MMP	matrix-metalloproteinase
MRCP	mágneses rezonancias cholangiapancreatographia
MRI	magnetic resonance imaging
MRP2	multidrug resistance protein-2
MSH	mutS homolog
mTOR	mechanistic target of rapamycin
MUC	mucin
myc	v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog
NEC	neuroendocrin carcinoma
NET	neuroendocrin tumor
NGAL	neutrophil gelatinase-associated lipocalin
NSE	neuronspecifikus enoláz
OS	overall survival
p16	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
PAS	perjódsv-Schiff reakció
PanIN	pancreas intraepithelialis neoplasia
PB	pancreatoblastoma
PBS	phosphate-buffered saline
PDAC	pancreas ductalis adenocarcinoma
PDGFR	platelet derived growth factor receptor
PEI	percutan ethanol infiltration
PET	pancreaticus endocrin tumor
PKC	protein kinase-C

PP-sejt	pancreatic polypeptide-sejt
PPAR	peroxisome proilferator-activated receptor
RFTA	radiofrekvenciás abláció
RNS	ribonukleinsav
RT-PCR	real time – polymerase chain reaction
SEER Program	Surveillance, Epidemiology and End Results Program
Smad4	the product of the tumor suppressor gene DPC 4
Slug	ces-1-related zinc finger transcription factor gene
SNAIL-1	snail family zinc finger-1
SSTR	somatostatin receptor
TAE	transzartériás embolizáció
TACE	transzartériás kemoembolizáció
TAMP	tight junction-associated MARVEL proteins
TAT	tyrosine aminotransferase
TER	transepithelial resistance
TGF- β	transforming growth factor- β
TJ	tight junction
tTJ	tricellularis tight junction
TMC-5	transmembrane channel-like gene family 5
TRIC	tricellulin
TRIS	tris (hydroxymethyl) aminomethane
TP-53	tumor protein 53
UH	ultrahang
UICC	Union for International Cancer Control
VEGF	vascular endothel growth factor
VHL	von Hippel-Lindau
VIP	vasoactive intestinal polypeptid
WHO	World Health Organization
ZO	zonula occludens
ZONAB	ZO-1 associated nucleic acid-binding protein

1. BEVEZETÉS – IRODALMI HÁTTÉR

1.1. Normál pancreaszövet és hasnyálmirigydaganatok

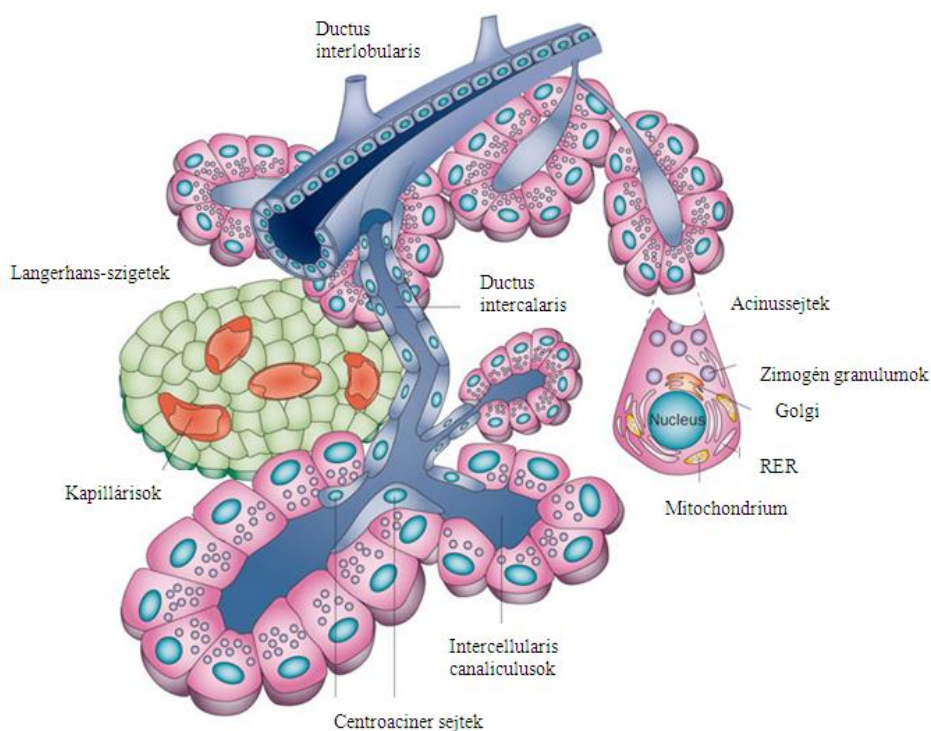
1.1.1. *A normál pancreaszövet felépítése és működése*

Az emberi hasnyálmirigy retroperitonealisan, a gyomor és a haránt vastagbél mögött, a duodenum görbületébe illeszkedve helyezkedik el. Anatómiailag három részből áll, ezek a fej, test és farok. Súlya általában 60–140 g, mérete átlagosan 15x3 cm. Tekintettel a hasüregben való viszonylag rejtett elhelyezkedésére, megbetegedései leggyakrabban csak igen előrehaladott fázisban okoznak tüneteket, panaszokat.

Szövettani felépítését tekintve két funkcionálisan elkülönülő egységből, exocrin és endocrin részből épül fel, melyek fejlődéstanilag is eltérnek egymástól (1. ábra). Az exocrin mirigyállomány kifejezetten domináns, a teljes pancreas közel négyötödét alkotja; az endocrin mirigyek mennyisége 1–2%. A maradék hasnyálmirigyszövetet erek és az extracellularis mátrix (stroma) alkotja.

Az exocrin vagy külső elválasztású hasnyálmirigy lobulusokból, tubulo-acinaris egységekből épül fel, melyek legfőbb alkotói az acinusok. Az acinusokat felépítő, a sejtek basalis részén intenzíven basophil festődésű, piramis alakú hámsejtek apicalis, eosinophil cytoplasmája tartalmazza a PAS-pozitív zymogen granulumokat, melyekben az acinussejtek által termelt több tucat emésztőenzim található. Ezen granulumok tartalma vegetatív idegrendszeri vagy endocrin hatásra az acinusok lumenébe jut. Az exocrin hasnyálmirigyszövet másik alkotórésze az acinusok tartalmát elvezető ductalis-ductularis rendszer, azaz a ductussejtek. A nagyobb ductusokban mucin termelődik, míg a kisebb, ductularis sejtek bikarbonátgazdag nedvet szekretálnak. Ezekből fiziológias esetben naponta közel két liter 'hasnyál' termelődik, mely a duodenumban termelődő cholecystokinin és secretin hatására, a ductus- és acinussejtek felszíni receptoraihoz kötődve a Wirsung-vezetéken keresztül, a Vater-papillánál jut a patkóbélbe. A hasnyálmirigy szekretált emésztőenzimeik inaktívak, proenzim formájában termelődnek. Közülük a legfontosabbak a tripszin, kimotripszin, az amiláz és lipáz, az elasztáz, az aminoszteroidok és a nukleázok.

Az endocrin hasnyálmirigy alkotói a Langerhans-szigetek, melyek szövettanilag könnyen elkülöníthetőek, az exocrin pancreasnál jóval halványabbak. Egy humán hasnyálmirigyben közel egymillió Langerhans-sziget található; ezek legfőbb feladata a szénhidrát-anyagcsere hormonális szabályozása. Sejtjei öt típusba sorolhatók: a szigetek 15–20%-át alkotó α -sejtek glucagont termelnek, a 60–80%-ban jelen lévő β -sejtek felelősek az inzulin és az amylin képződéséért, a 3–10%-ban előforduló δ -sejtek somatostatint szekretálnak, a $\delta 1$ -sejtek a vasoactiv intestinalis peptid termelődését tartják fenn, a Langerhans-szigeteket 3–5%-ban alkotó PP vagy γ -sejtek a pancreaticus polypeptid termelődésében játszanak szerepet, az ϵ -sejtek a ghrelin szekrécióját biztosítják (<1%), míg az EC-sejtek szerotonint termelnek.



1. ábra. A humán pancreas felépítése (1)

A hasnyálmirigy leggyakoribb megbetegedései közül kiemelendők egyes anatómiai jellegű eltérései, fejlődési rendellenességei (pancreas divisum, pancreas anulare, pancreas accessorius), veleszületett anyagcsere-zavarai (cysticus fibrosis, haemochromatosis), akut és krónikus gyulladásai, illetve az exocrin, az endocrin vagy a stromaállomány jó- és rosszindulatú daganatai.

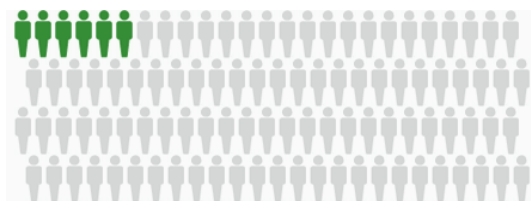
1.1.2. Hasnyálmirigydaganatok

1.1.2.1. Ductalis adenocarcinómák

A hasnyálmirigy ductalis adenocarcinómái az exocrin pancreas tumorainak közel 90%-át alkotják, a maradék 10% cysticus eredetű tumor. Ez a daganatcsoport az összes rosszindulatú daganat 5–6%-át alkotja, incidenciája fokozatosan növekszik. 2008-ban az Európai Unió országaiban közel 70 000 ember esetében diagnosztizálták a kórképet; incidenciája a magyar és a cseh férfiak körében a legmagasabb (2).

A pancreasdaganatok 2012-ben világszerte az összes daganatos megbetegedés közül a 15. helyen álltak, incidenciájuk 2,4%, ez a férfiak között 178 161 regisztrált esetet jelent, a nők körében pedig 159 711 diagnosztizált betegséget (2). A hazai statisztikai eredmények alapján a pancreasdaganatok előfordulása évente 13,5/100 000 fő (3). Leggyakrabban 60 év felett fordulnak elő, többnyire férfiak esetében. Bár etiológiája nagyrészt ismeretlen, a hasnyálmirigy ductalis adenocarcinómáinak kialakulásában számos rizikófaktor is szerepet játszik, ezek közül a legfontosabbak a dohányzás, a túlzott alkoholfogyasztás, a diabetes mellitus, a krónikus pancreatitis és a családi halmozódás – pozitív családi anamnézis esetén gyakran derül fény egyes génmutációkra (p16, BRCA-2) (4). Lynch- és Peutz–Jeghers-szindrómás betegek, valamint benzidinnel és β -naftilaminnal dolgozóknál gyakran előforduló tumortípus (5).

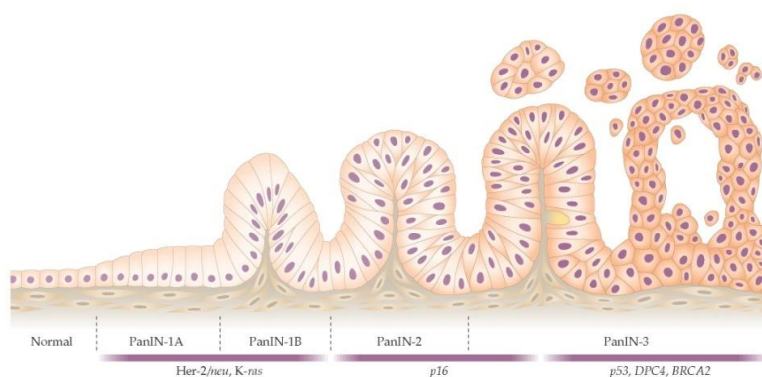
A betegségcsoportra jellemző az érintett szerv anatómai elhelyezkedéséből és a későn jelentkező tünetekből adódó nehéz diagnosztika, a szerény kezelési lehetőségek és a kifejezetten rossz prognózis: a diagnózis után egy évvel a betegek közel 90%-át elveszítjük; a túlélők csak az operált populációból kerülnek ki. Ötéves túlélése a National Cancer Institute SEER Program statisztikai eredményei alapján mindössze 6,7% (2. ábra).



2. ábra. A pancreasdaganatok túlélése

A zöld alakok reprezentálják az öt éves túlélők arányát (5%) (6).

Metastatizáló hajlama igen magas; a kuratív céllal végzett műtétek szövettani anyagában gyakran észlelhetők perineuralis és lymphovascularis invázió jelei is. Az exocrin pancreas daganatok döntő többségét, közel 90%-át alkotó ductalis adenocarcinomák kialakulásának esetében igen fontos jelenség az ún. 'adenoma-carcinoma szekvencia' (3. ábra) (7). Ennek kezdeti lépcsőfoka a pancreas intraepithelialis neoplasia (PanIN); magába foglalja a hasnyálmirigy ductalis hámsejtjeinek hyperplasiás, metaplasiás és dysplasiás elváltozásait. Különböző fokozatai ismertek, melyek az invazív ductalis adenocarcinoma előalakjainak tekinthetők (8).



3. ábra. A pancreasdaganatok 'adenoma-carcinoma' szekvenciája (9)

A ductalis adenocarcinoma progressziós modelljében korai elváltozásként (PanIN 1-2) gyakran észlelhető genetikai eltérés a MUC5, a PSCA és a p16 hiánya, illetve a daganatok közel 100%-ban előforduló KRAS és BRAF mutáció, illetve a HER2/neu overexpressziója (10). PanIN-3 esetében már egyes tumorszuppresszor gének inaktivációja is detektálható (p53, DPC4, BRCA2, SMAD4, p16INK4A, TP53, MYC, KRAS2, és AKT2) (11, 12). Előrehaladott pancreasdaganatok esetében mind allélvesztéssel, mind allélnyeréssel járó kromoszomális aberráció létét igazolták.

A daganatok mirigyes szerkezetének differenciáltsága alapján magasan (grade I), közepesen (grade II) vagy alacsonyan (grade III) differenciált formákat különítjük el. Mindhárom altípusra jellemző a kifejezett fibroplasia és a kötőszövetekben gazdag tumoros stroma jelenléte. A ductalis adenocarcinomák további jellemzője a

mucintermelő képesség. Míg a normál pancreas az ismert 21 féle mucin közül a MUC-1, -6, -17, -20 és -21-típust expresszálja, addig különböző daganataiban a MUC-1 (szekretált típus), a MUC-2 (membránasszociált típus) és a MUC-5AC termelődik. Pancreatitisekben MUC-1, -5B és -6 detektálható. Ductalis adenocarcinomák és súlyos pancreaticus dysplastikus elváltozások (PanIN-3) vizsgálata során a MUC-1, -5AC, -5B, -4, -6, -13, -16 és -17 expresszálódott (13).

Legjellemzőbb tünetei a krónikus pancreatitisnek (is) megfelelő epigastrialis- és hátfájdalom, a hasi diszkomfort (étvágycsökkenés, hányinger, hányás), látványos testsúlycsökkenés. Sok esetben a masszív icterus a vezető tünet, mely leginkább pancreasfeji carcinomában segíti a diagnosztikát. Courvoisier-jel (icterust okozó, az epehólyag fájdalommentesen megnagyobbodásával járó állapot) a ductus choledochus tumoros elzáródása esetén észlelhető. Kimondottan a hasnyálmirigy daganatokra jellemző paraneoplasztikus tünet a thrombophlebitis migrans.

Diagnosztikája nem specifikus: képalkotó vizsgálat (UH, CT-HRCT-MRI, MRCP-ERCP) szükségessége mellett kiegészítő vizsgálatok is segíthetik a diagnózist: a pancreasnedv cytológiai vizsgálata, tumormarkerek közül a CA 19-9-szint mérése (inkább az igazolt malignoma utánkövetésében van létjogosultsága) és a CEA meghatározás (70–80%-ban emelkedett érték), illetve családi halmozódás esetén genetikai vizsgálatok végzése. Lehetőség van aspirációs cytológiai vagy vastagtűbiopsziás mintavétel végzésére is.

Terápiás lehetőségei szűkösek; amennyiben a daganat operábilis, egyértelműen a radikális sebészi eltávolítás (Whipple-műtét/pancreato-duodenectomy, pylorus preserving pancreato-duodenectomy) a választandó lehetőség. Amennyiben kuratív beavatkozás nem jön szóba, palliatív lehetőségként – icterus esetén – endoscopos stentbeültetés, drainage biztosítása vagy biliodigestív anastomosis képzése lehetséges. A betegség kezelése elsősorban sebészi, azonban bizonyos esetekben gyógyszeres terápiás lehetőségek is a palliatív kezelés részét jelenthetik. A daganattípus agresszivitását jól jellemzi, hogy az 5-FU/kapecitabin – gemcitabin alapú kemoterápiás kombinációk alkalmazása révén is csupán közel 20-25% response-rate érhető el. Újabb vizsgálati eredmények alapján a metastaticus pancreas ductalis adenocarcinomák esetében a FOLFIRINOX-protokoll szerinti kombináció (leukvorin, 5-FU, irinotekán,

oxaliplatin) is hatékony lehet (14). Radiokemoterápia, illetve intraluminalis brachyterápia az inoperábilis esetekben hasznos palliatív kezelési forma.

Számos vizsgálat folyik további kemoterápiás készítményekkel, így a glaukarubinon és gemcitabin kombinációjával, peptid-alapú tumorellenes vakcinákkal (15), receptor-tirozin kináz-gátlókkal, albumin-kötött paklitaxellal.

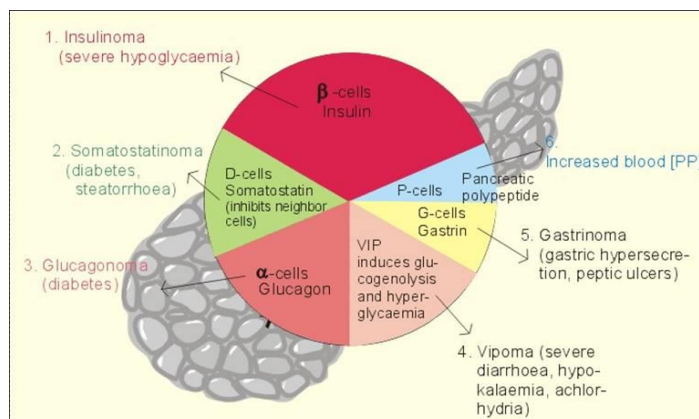
A hasnyálmirgy ductalis adenocarcinomái a legrosszabb prognózisú daganatok közé tartoznak; a betegek 1 éves túlélése is csupán 20%, az 5 éves túlélés 5% körüli (16). Bár világszerte intenzív kutatások folynak a pancreasdaganatok gyógyszeres kezelése lehetőségeinek bővítése irányában, egyelőre az új diagnosztikus és terápiás modalitások sem eredményeztek jelentős javulást a túlélésben.

1.1.2.2. Endocrin pancreasdaganatok

A pancreas Langerhans-szigeteinek sejtjeiből kiinduló funkcionáló vagy nem funkcionáló daganatok lényegesen ritkábban fordulnak elő az exocrin hasnyálmirigydaganatokhoz képest; az összes pancreastumor 1-2%-a tartozik ebbe a szövettani típusba (17). A nem funkcionáló tumorok specifikus tüneteket nem okoznak, a funkcionáló, hormonálisan aktív daganatok azonban kiindulási sejttypustól függően speciális endocrin-neuroendocrin tüneteket eredményeznek. Ez utóbbi csoport alkotja az endocrin hasnyálmirigydaganatok legnagyobb csoportját.

Kialakulásukat tekintve eltérnek az exocrin pancreasdaganatoktól, azon belül is a ductalis adenocarcinomáktól. Míg a ductalis adenocarcinomák jellemzője az 'adenoma-carcinoma'-progressziós modell, melyet speciális genetikai eltérések is kísérnek, az endocrin hasnyálmirigydaganatok nem mutatnak szekvenciális kialakulást, s leggyakoribb detektálható genetikai eltérésük a MEN-1 gén mutációja. E genetikai eltérés során a 'menin'-gén (kr 11q13) mutálódik, azonban létét a sporadikusan kialakult endocrin pancreastumorok csupán mintegy 20%-ban sikerült igazolni. Családi halmozódás esetén felmerül von Hippel–Lindau szindróma lehetősége is (kr 3p25.2) (18).

Az endocrin hasnyálmirigydaganatok osztályozása egyrészt hormonális aktivitásuk szerint, másrészt biológiai/szövettani viselkedésük alapján történik. A funkcionáló endocrin tumorok közül az insulinoma fordul elő leggyakrabban (70%), ezt követi az α -sejtekből kialakuló glucagonoma (20%), majd az 5-10%-ban igazolható somatostatinoma. A δ 1-sejtek által képzett VIP-oma, a PP-sejtes tumor és a szerotonin-termelő carcinoid még ritkábban észlelhető (4. ábra).



4. ábra. A funkcionáló endocrin hasnyálmirigydaganatok megoszlása (19)

Biológiai/szövettani viselkedésük alapján a daganatok mindegyike potenciálisan malignus daganat. A WHO 2010-es beosztás alapján jól differenciált (grade 1 és 2) neuroendocrin tumorokat (NET) és rosszul differenciált (grade 3) neuroendocrin carcinomákat (NEC) különböztetünk meg. A grade megadása a 'mitosis-szám' és a Ki-67 proliferációs index vizsgálatán alapszik (1. sz. táblázat). A UICC és AJCC TNM-rendszer az adenocarcinomáknál használatos beosztást alkalmazza. Tekintettel arra, hogy kutatásunk során még az előző beosztás volt érvényben (WHO 2000; benignus-borderline-malignus endocrin daganatok), a vizsgálni kívánt daganatokat e felosztás alapján osztályoztuk.

1. táblázat. A malignus endocrin pancreasdaganatok osztályozása (2014) (20)

Grade	Differenciáltság	Ki-67 index (%)	Mitosiszám/10 hpf
I (low)	jó	≤ 2	≤ 2
II (intermediate)	jó	3-20	2-20
III (high)	rossz	≥ 20	≥ 20

Tüneteiket tekintve az endocrin pancreasdaganatok rendkívül heterogének, megfelelnek az általuk termelt hormon szisztémás hatásainak. A leggyakrabban előforduló insulinoma az esetek közel 90%-ban benignus, azonban a hyperinsulinismusból fakadó hypoglikæmia gyakran életveszélyes állapotot eredményez. Az agresszív viselkedésű, többnyire malignus és könnyen metastatizáló glucagonoma diabetes tüneteit okozza, kísérőtünetei egyes nekrotizáló, bullosus bőrelváltozások, stomatitis, fogyás és anaemia. A somatostatinoma túlnyomórészt szintén rosszindulatú, zsírszékletet, diabetest, cholelithiasist, hypochlorhydriát és súlycsökkenést okoz. Az igen ritkán előforduló VIP-oma eredményezi a Verner–Morrison-szindrómát, melyre az excesszív mértékű, vizes hasmenés és a hypokalaemia jellemző.

A funkcionáló daganatok diagnosztikája specifikus tünetei miatt lényegesen könnyebb, laboratóriumi (hormonszint-mérések; insulin-provokációs teszt, C-peptid, chromogranin, calcitonin, NSE, VIP, 5-HIAA) és a ductalis adenocarcinomáknál részletezett képalkotó vizsgálatokat kiegészítő, speciális lehetőségek (Octreoscan) segítik a pontos kórismét.

Az endocrin pancreastumorok terápiája elsődlegesen sebészi; ez, amennyiben felmerül malignitás lehetősége, széles ép széllel és a regionális nyirokcsomók eltávolításával együtt történő resectiot, egyéb esetben enucleatiót jelent. Gyógyszeres kezelésük szerény, a hagyományos kemoterápiás szerekre leggyakrabban rezisztensek. Rosszul differenciált pancreas endocrin tumorok salvage-kezelése során gemcitabine alkalmazásáról számolnak be, míg előrehaladott gastroenteropancreaticus endocrin tumorokban capecitabine és doxorubicin +/- cisplatin adásával kapcsolatos kutatások is folynak. Bizonyítottan hatékony a somatostatin és szintetikus analógjai (lanreotide, octreotide), melyek a SSSTR1-5 receptorokon keresztül hatva egyrészt gátolják a daganat hormontermelését, másrészt érnövekedés-gátló hatásuk révén a tumorprogressziót is mérséklék. Az IFN specifikus sejtfelszíni receptorokhoz való kötődése révén számos szignáltranszdukciós útvonalat aktivál, hatására IFN-indukált tumorsuppresszor gének transzkripciója kezdődik meg. További antiproliferatív hatása a sejtciklus-gátlás (G0-G1). Mindezek alapján jól differenciált, somatostatin-rezisztens endocrin daganatok esetében szóba jön α -IFN adása is (21).

Tekintettel az endocrin daganatok által excesszíven termelt proangiogén molekulákra (VEGF), az antiangiogenetikus hatású, VEGF-gátló bevacizumab és a VEGFR-target tirozin-kináz gátló sunitinib, pazopanib és sorafenib alkalmazása is létjogosultságot nyer e daganattípus gyógyszeres kezelése során. Bár a célzott terápiás lehetőségek nyújtotta túlélés-növekedés jelentős; a molekulákra intrinsic és szerzett rezisztencia kialakulását is észlelték. Ezek hátterében egyes – feltehetően az intratumoralis hypoxia és a hypoxia-okozta stressz hatására – proangiogenikus faktorok fokozott expressziója állhat (VEGF, FGF, angiopoietin, ephrin). A pancreas endocrin tumoraiban észlelt fokozott mTOR-aktiváció az mTOR-gátláson keresztül (everolimus) további új támadáspontot jelenthet a biológiai terápiák számára (22).

Az endocrin hasnyálmirigy-daganatok túlélése lényegesen jobb, mint az exocrin tumoroké; a sebészileg kezelt, jól differenciált daganatok 5 éves túlélése meghaladja a 60%-ot, míg a rosszul differenciált formák esetében ez lényegesen kevesebb (23).

1.1.2.3. Acinussejtes carcinoma

Ezen daganattípus a hasnyálmirigy-daganatok mindössze 1-2%-át alkotja. Neuroendocrin eredetét igazolja a diagnosztika során alkalmazott chromogranin-, synaptophysin- és neuron-specifikus enoláz termelő képessége, emellett azonban az exocrin differenciációt támasztja alá acinusképző természete. Gyakran zymogen granulumok és α -1 antitripszin is kimutatható bennük. Az esetek több mint felében a pancreasfejre lokalizálódnak (24). Agresszív, rossz prognózisú daganatok, metastasisképző potenciáljuk nagy, korán adnak áttétet a májba. Előfordulásuk a ductalis adenocarcinomákhoz képest fiatalabb életkorban gyakoribb, többnyire férfiak esetében diagnosztizálják.

Szövettani felépítésükre a granularis cytoplasma jellemző, a basophil, kerek, kissé pleomorph sejtmag és a lobularis mintázat desmoplasticus stroma nélkül. A jól differenciált neuroendocrin tumoroktól a granularis, PAS-pozitív cytoplasma és a nucleus basali elhelyezkedése, valamint immunfenotípusa révén (synaptophysin és chromogranin pozitivitás <25%) differenciálható (25). A pancreas solid pseudopapillaris neoplasmái szintén differenciáldiagnosztikai nehézséget okozhatnak,

azonban míg az acinussejtes daganatok inkább férfiakban alakulnak ki, a pseudopapillaris tumorok jellemzően nőkben fejlődnek. Immunhisztokémiai reakciók végzése is segíti a helyes diagnózis felállítását: az acinussejtes daganatok β -katenin/CD56/CD10 negatívak, a pseudopapillaris daganatok azonban pozitivitást mutatnak. A pseudopapillaris neoplasmák általában jól körülírtak, míg az acinussejtes carcinoma leggyakrabban masszívan infiltrálja környezetét (26).

Differenciáldiagnosztikailag a legfontosabb elkülönítendő entitás a pancreatoblastoma, mely főképp gyermekkorban alakul ki, nincs anatómiai predilekciós helye. Szövettani képét tekintve két fő sejttypusból áll: az acináris struktúrákból és a köztük elhelyezkedő, jellegzetes, fészkés elrendeződésű, organoid squamosus részből. Diagnosztikus, terápiás lehetőségei az acinussejtes carcinomáéhoz hasonlóak, túlélése teljes sebészi resectio után akár 80% is lehet (27).

Az acinussejtes carcinoma tünetei részben hasonlóak a ductalis adenocarcinomákéihoz, azonban ebben a daganatcsoportban néhány jellegzetes eltérés is megfigyelhető: túlnyomó részben a betegek már a daganat korai stádiumában erőteljes hasi fájdalomról és puffadásról számolnak be. Tekintve, hogy az acinussejtes daganatok excesszív lipáztermelésre képesek, gyakran a zsírnecrosis (panniculitis, bőrlaesiók, subcutan csomók) a vezető tünet. Laboratóriumi eltérések közül jellegzetes a magas serum lipáz-szint és az eosinophilia, melyekhez olykor emelkedett AFP-szint is társulhat.

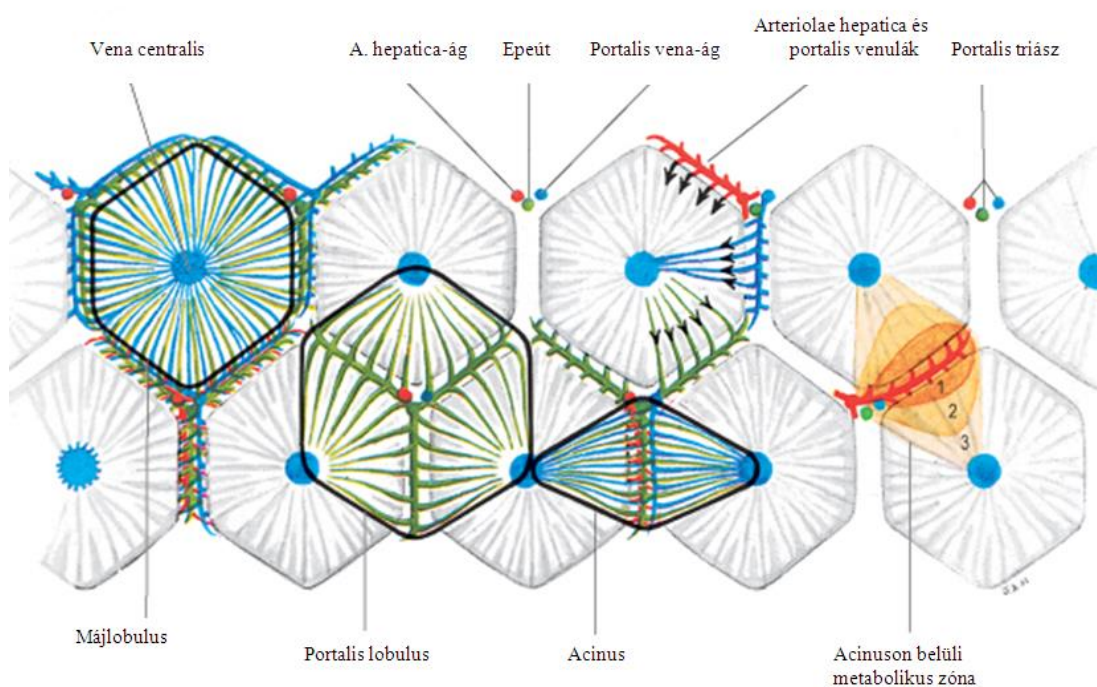
Terápiája gyakorlatilag csak sebészi; a recurrens vagy inoperábilis esetekben alkalmazott kezelési lehetőségek igen szerények. Tekintettel a daganattípus ritka előfordulására és az ebből adódó kis esetszámmra, egyértelműen hatékony gyógyszeres kezelési eredmények egyelőre nincsenek. Az alkalmazott kemoterápiás kombinációk közül jellemzően a ductalis adenocarcinomák során használt gyógyszerek jelennek meg, így a gemcitabin, oxaliplatin, docetaxel, kapecitabin és irinotekán (28, 29).

A lokalizált esetek átlagos túlélése 56,9 hónap, míg metastatizáló formáiban 19,6 hónap (24).

1.2. Normál májszövet és májdaganatok

1.2.1. A normál májszövet felépítése és működése

Az előbél-eredetű hepatocytákból és a mesenchymalis kötőszöveti sejtekből felépülő humán máj jobb és bal lebenyre, összesen 8 szegmentre osztható, külön epe-elvezetési és vérrellátási rendszerrel, melyet dominánsan a vena portae rendszere, 30–40%-ban az arteria hepatica biztosít. Szövettani szerkezetét tekintve 1–2 mm, hatszögletű egységekből, az ún. 'klasszikus lobulusokból' áll, a hepatocyták által képzett trabeculák középpontjában a vena centralis áll. A periférián a portalis triász képletei (a. hepatica, v. portae, epevezeték) azonosíthatók, míg a Rappaport-féle acinus tekinthető a máj 'funkcionális lobulusok'-ból álló elemi egységének (5. ábra) (30).



5. ábra. A májszövet felépítése (31)

Maguk a májsejtek 30–40 μm átmérőjű hámsejtek, sugárirányban elhelyezkedve, trabeculákba rendeződve építik fel a májszövetet. Vascularis pólusuk a Disse-térbe, a sinusoidokat alkotó endothelsejtek és hepatocyták közötti virtuális területbe ér. A májsejtekben nagy mennyiségű endoplazmás retikulum és Golgi-apparátus

azonosítható. További fő alkotójuk a glikogén, ez egyes szövettani reakciókkal jól detektálható (PAS). A sinusoidokat bélelő endothel sejtek mellett itt találhatóak a Kupffer-féle fagocyták, melyek számos kórkép során aktiválódnak. A perisinusoidalis térben elhelyezkedő Ito-sejtek fiziológiás esetben vitaminokat és zsírokat tárolnak; egyes kórállapotok során azonban rosttermelő sejtekké transzformálódnak, s így hozzájárulnak a máj kötőszövetes átalakulásához bizonyos fibrosissal járó májbetegségekben.

A májsejtek egymással összefekvő oldalai alakítják ki az epecanaliculusok, az ezeket lezáró sejtkapcsoló struktúrák akadályozzák meg a képződött epe májsinusoidokba való visszafolyását. A csatornarendszer a továbbiakban a részben már önálló, köbhámsejtekből álló Hering-csatornákat képezi, majd az interlobularis ductulusokban, ductusokban folytatódik.

A máj megbetegedései közül kiemelendők a veleszületett anyagcserezavarok, egyes enzimopathiák, a májat érintő vírusfertőzések, a toxikus májkárosodások, a hepatikus keringési zavarok, valamint az intrahepatikus epeutakat érintő kórképek. Külön említendők a máj primer vagy szekunder daganatos megbetegedései is.

1.2.2. Primer májdaganatok

1.2.2.1. Hepatocellularis carcinoma

A hepatocellularis carcinoma a második leggyakoribb daganatos halálok; a leggyakoribb primer malignus májdaganat. A legutóbbi GLOBOCAN adatok alapján 2012-ben 782 000 új esetet regisztráltak, melynek 83%-a a fejlődő világból származik; a betegség előfordulása extrém magas Kínában, ahonnan az összes bejelentett eset 50%-a érkezett (2). Incidenciája Magyarországon évente 4,7/100 000 főre tehető (3).

Etiológiájában számos veleszületett és szerzett tényező szerepet játszik; leggyakrabban a májcirrhosis, a hepatotrop vírusok (HBV, HCV) által okozott krónikus májgyulladások, a túlzott alkoholfogyasztás, az aflatoxin-expozíció, egyes gyógyszer-toxicitások és a máj különböző tárolási betegségei fokozzák kialakulásának lehetőségét (32). Túlnyomórészt cirrhosis talaján alakul ki. Megjelenését tekintve állhat egyetlen

nagy göbből, észlelhető több gócban, noduláris formában, ritkábban megfigyelhető az ún. 'cirrhosis carcinomatosa' – ebben az esetben a cirrhotikus göbökben, elsősorban alakul ki a daganat.

Szövettani típusai közül a leggyakrabban a trabecularis forma fordul elő, emellett ismert a pseudoglandularis, compact és scirrhusos típusa is. Differenciáltságának megítélése igen lényeges a beteg további sorsának szempontjából.

Tünetei a korai stádiumokban aspecifikusak, később tapintható hasi terime, ascites, nagymértékű súlycsökkenés, vagy icterus hívja fel rá a figyelmet. Diagnosztikájában alapvető fontosságúak a képalkotó vizsgálatok (UH, CT, MRI), a részletes laboratóriumi vizsgálatok (májenzimek, tumormarkerek – AFP) és az aspirációs citológiai vagy vastagtű-biopsziás mintavételi lehetőségek.

A primer és szekunder májdaganatok kezelésében az elsődleges terápia sebészi ellátás, lehetőség szerint az R0-resectio. 3 cm-nél kisebb, több szegmentumra kiterjedő, végstádiumú májbetegséggel társuló primer májdaganatok esetén felmerül a májtranszplantáció szükségessége is. Sebészeti megoldása a daganat kiterjedtségétől és elhelyezkedésétől függően a segmentectomiától akár a lobectomiáig, hemihepatectomiáig is terjedhet; disszeminált betegség esetén sebészeti beavatkozás nem jön szóba. Egyéb terápiás lehetőségei az intervenció radiológia nyújtotta lehetőségek közül a radiofrekvenciás abláció (RFTA), a percutan ethanol infiltráció (PEI), a transzartériás embolizáció (TAE) vagy kemoembolizáció (TACE) (33). Gyógyszeres kezelési lehetőségei az utóbbi években jelentősen fejlődtek; az 5-FU, doxorubicin és mitomycin-C mellett ma már dominánsan a biológiai támadáspontú, VEGFR, PDGFR és Raf-kináz gátló sorafenib adása javasolt (34); emellett azonban számos új target-terápiára alkalmas hatóanyaggal (anti-VEGFR, anti-FGFR, anti-PDGFR és rapamycin) folynak aktív kutatások (35). A daganat a terápiás lehetőségek bővülése ellenére is rossz prognózisú, 5 éves túlélése 15–20% között alakul.

1.2.2.2. Fibrolamellaris hepatocellularis carcinoma

A fibrolamellaris hepatocellularis carcinoma (FLHCC) a HCC ritka variánsa; leginkább fiatal korosztályban alakul ki (36). Először 1956-ban Edmondson és munkatársai azonosították (37). Földrajzi régiótól függően a HCC-k közel 5%-át alkotja (38).

Etiológiája ismeretlen; a klasszikus májsejtdaganatok esetében ismert rizikófaktorok (virális ok, egyéb toxikus vagy metabolikus tényező, cirrhosis) e daganattípus kialakulása során nem játszanak érdemi szerepet. Eddig egyetlen ismert rizikófactora a focalis nodularis hyperplasia (FNH) (39). Klinikai tünetei a konvencionális HCC-hoz hasonló; fontos különbség azonban a beteg életkora: a FLHCC jellemzően a fiatal felnőttkor betegsége. Diagnosztikája a hepatocellularis daganatokéval egyező; a pontos kórisme kimondásához mindenképpen legalább vastagtű-biopsziás mintavétel, ennek sikertelensége esetén feltárasos ékbiopszia végzése szükséges. Néhány aspecifikus tünet is felhívhatja rá a figyelmet; így paraneoplasziás hyperthyreosis, magas láz, steril endocarditis vagy hypoglikæmia. Ritkán előfordulhat colitis ulcerosával vagy primer sclerotizáló cholangitissel való egyidejű megjelenése is. Laboratóriumi eltérései közül két félig-specifikus támpontot ismerünk; az egyik a 3 cm-nél nagyobb daganatok esetében jellemzően K-vitamin-hiány alakul ki; ennek következtében a szérumban Des- γ -carboxy prothrombin (DCP) fehérje szintje magasabb lehet, a másik pedig a szérumban telítetlen B₁₂-vitaminkötő képessége, mely a FLHCC több mint kétharmadában észlelhető (40).

Makroszkópos megjelenésére jellemző a májszövetnél halványabb, jól körülhatárolt, noduláris, heterogén szerkezet, illetve a daganatfészkeket elválasztó, lamelláris szerkezetű, fibrosus septumok és a centrálisan elhelyezkedő, csillagszerű hegszövet. Gyakran előfordul hyalinos degeneráció vagy meszesedés is. Mikroszkópos képe igen jellegzetes; nagy, oncocytaer jellegű, granulált cytoplasmájú tumorsejtekből áll, melyekben prominens nucleolus észlelhető. Sok esetben réz, vagy réz-asszociált fehérje is kimutatható a daganatszövetben (41).

Immunhisztokémiai profilja hasonló a konvencionális májsejtrákokéhoz, azonban a FLHCC AFP-t nem termel, ellenben a cholangiocarcinomák által jellemzően termelt CK-7 kifejezett expressziója észlelhető. – Molekuláris- és fehérjeszintű vizsgálata alapján e daganattípus vélhetően olyan bipotens hepatocytá-progenitor sejtéből származik, mely hepatocytá és cholangiocytá irányban is egyaránt differenciálódhat. Korai diagnózis esetén adekvát terápiája sebészeti; előrehaladott formájában hemihepatectomia vagy májtranszplantáció is szóba jön. Inoperabilitás esetén szükséges

kemoterápiás kezelés megkezdése; a leggyakrabban alkalmazott gyógyszerek a cisplatin, az epirubicin és az 5-FU.

Korai, a lehetőségekhez mérten célzott terápia mellett prognózisa lényegesen jobb a HCC-csoporthoz képest öt éves túlélése; a 30%-ot is meghaladja (38) – ehhez feltehetően a betegek fiatalabb életkora és az egyébként 'egészséges' májszövet is hozzájárul.

1.2.2.3. Cholangiocarcinoma

E daganattípus a rosszindulatú primer májdaganatok második leggyakrabban előforduló formája. Kiindulási helyétől függően extra- és intrahepatikus típusa ismert (eCC, iCC), az intrahepatikus cholangiocarcinoma incidenciája napjainkban egyértelműen emelkedik (42). Etiológiája nincs pontosan tisztázva; ismert rizikófaktorai a primer sclerotizáló cholangitis, polycystás májbetegség, egyes parazita-fertőzések (májmétely), epekövesség, illetve számos mérgező anyag (dioxin, Thorotrast vagy nitrozamin).

Hasonlóan a pancreas ductalis adenocarcinomáihoz és a hepatocellularis carcinomához, korai stádiumban tünetmentesek, esetleg aspecifikus hasi tüneteket okozhatnak. Érdekes különbség, hogy míg az eCC általában obstruktív icetrus kialakulásával hívja fel a figyelmet, addig az iCC vezető tünete általában a hasi fájdalom. Előrehaladottabb stádiumban a súlyvesztés, bőrviszketés, láz és a biliaris obstrukció következményei jellemzők.

A kórisme felállítása igen hasonló a HCC diagnosztikus lehetőségeihez, azonban CC esetében mindeztidáig nincs specifikus klinikai gyakorlatban alkalmazható tumormarker. Egyes kutatások alapján a MMP-7 a CA19-9 alacsony specificitásához és szenzitivitásához képest jobb hatásfokkal differenciálja a benignus epeúti tumorokat és a CC-t (43). További perspektivikus biomarker lehet a jó- és rosszindulatú epeúti daganatok elkülönítéséhez a NGAL (neutrophil gelatinase-associated lipocalin) is (44). A CC hátterében sejthetők egyes genetikai eltérések is; egyes vizsgálatok alapján a MUC13, EPCAM, TMC5, CEACAM5 gének overexpressziója, míg a CPS1, TAT és

ITIH1 gének alulműködése is hozzájárulhat az ICC kialakulásához, akárcsak a miR-9 (45).

A pontos diagnózis felállításához és az operabilitás megítéléséhez komplex hasi képalkotó diagnosztika szükséges. A transcutan májbiopszia végzése mellett ma már lehetőség van endoscopos UH-vezérelt aspiráció végzésére is. Tekintettel arra, hogy a CC máig leghatékonyabb és egyben egyetlen potenciális kuratív terápiás eszköze a sebészi eltávolítás, igen lényeges a daganat minél korábbi stádiumban történő felfedezése. Az agresszív sebészeti megoldások lényegesen növelik a túlélést. Előrehaladott betegség esetén preoperatív vena portae-embolizációt, majd radikális resectiót vagy kemoterápiát követően szóba jön májtranszplantáció is. Az inoperábilis esetekben palliatív lehetőségek, mint az endoscopos vagy percutan stentbeültetés javíthatják a túlélési időt és az életminőséget.

Kemoterápiás kezelésében a gemcitabin/cisplatin mellett kapecitabin/oxaliplatin, gemcitabin/kpecitabin és gemcitabin/oxaliplatin kombinációk alkalmazhatóak (46). Egyes vizsgálatok alapján erlotinib és bevacizumab-kiegészítés növelheti a progressziómentes túlélést. Az R0-rezekción átesett betegek közel 30%-a 5 év után is él, az összes diagnosztizált CC esetében a betegek 5 éves túlélése nem haladja meg a 20%-ot. Az átlagos túlélési idő 15–28 hónap (47).

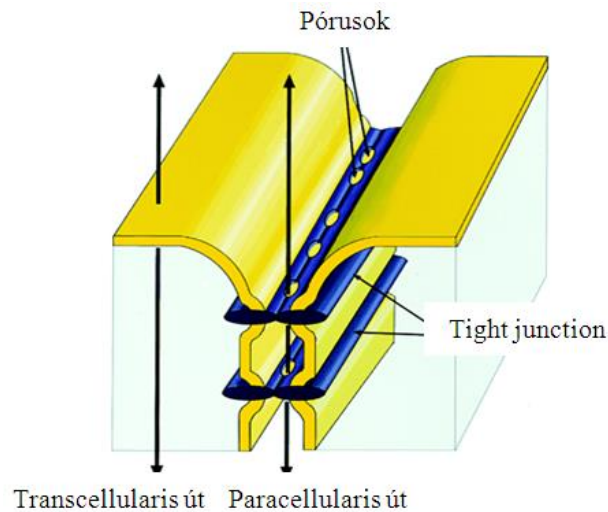
1.3. Sejtkapcsoló struktúrák

1.3.1. *Tight junction*

A tight junction az epithelialis és endothelialis sejtek apicalis részén elhelyezkedő multiprotein membránkomplex (48). Fő feladata a két, egymás szomszédságában lévő sejt között folyó paracellularis transzportfolyamatok és a permeabilitás szabályozása, mindezek mellett számos egyéb cellularis mechanizmusban is fontos szerepet tölt be (49).

Regulálja a folyadékok, egyes immunsejtek és gyógyszerek paracellularis transzportját, fontos feladata van a fluidkompartmentek elhatárolásában (50). A tight junction vagy zonula occludens típusú sejtkapcsoló struktúrák a hámsejtek apicalis részén, övszerűen

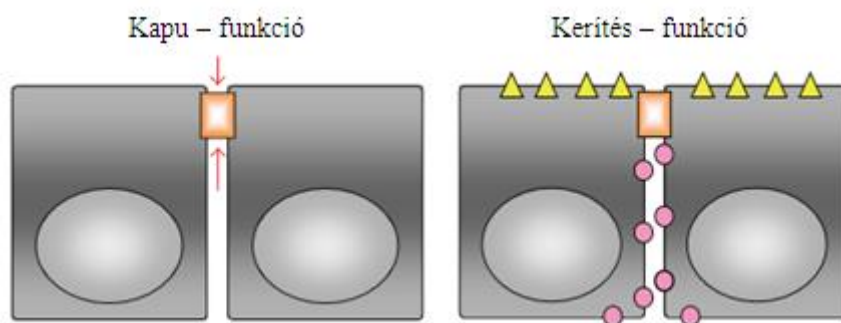
futnak körbe, létrehozva az ún. 'kissing point' jelenségét, mely a glikocalyx eltűnését, a sejtek közötti kapcsolódás erősségét szemlélteti.



6. ábra. A 'tight junction' két hámsejt közötti elhelyezkedése (51)

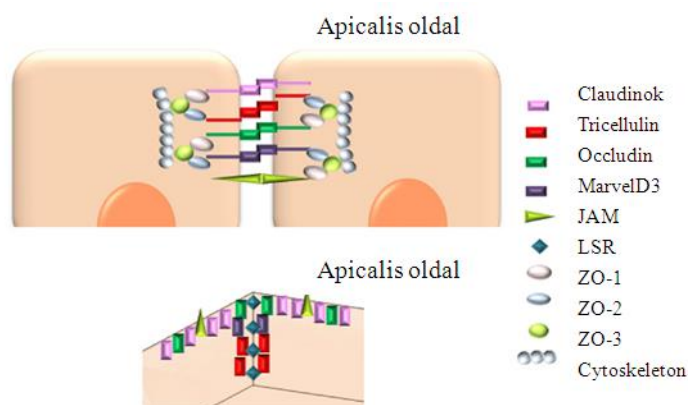
További feladatuk a sejtek polaritásának létrehozása és megőrzése, melyet az apicalis és basolateralis sejtfelszín közötti laterális diffúzió, illetve az apicalis membránon végbemenő receptormediált endocytosis és a basolateralis membránon keresztül zajló exocytosis szabályozásával érnek el.

A TJ struktúrák egyik fő feladata a barrier vagy határoló funkció, azaz a para- és transcellularis transzportfolyamatok szabályozása és a sejtek, illetve a lipidmembrán által elkülönített kompartmentek integritásának fenntartása és megőrzése (vér-agy gát, vér-here gát), míg a másik lényeges szerep a 'kerítés-funkció', azaz a laterális diffúzió megelőzése (7. ábra).



7. ábra. A TJ 'kapu' és 'kerítés' funkciója (52)

A TJ-k felépítésüket tekintve integráns és cytoplasmaticus fehérjékből épülnek fel. Napjainkban a TJ-fehérjék két, funkcionálisan és szerkezetileg is elkülöníthető csoportját különböztetjük meg: az egyik az emlősökben eddig 27 azonosított fehérjéből álló claudin-család (53), a másik az occludint, tricellulint és marveld3 fehérjét tartalmazó TJ-asszociált MARVEL proteinek (TAMP) családja (8. ábra) (54). A legtöbb TJ-fehérje élettani szerepük alapján tovább osztályozható, eszerint számos tagjuk 'lezáró/sealing' funkciójú (CLDN-1, -3, -5, -11, -14, -19 és tricellulin), több közülük szerepet játszik a szelektív kation- (CLDN-2, -10b és -15), illetve anionpermeabilitásban (CLDN-10a és -17) (55), a CLDN-2 a vízáteresztőképességet szabályozza. Lényeges feladatuk van a sejt-extracelluláris mátrix közötti ozmotikus egyensúly fenntartásában is.



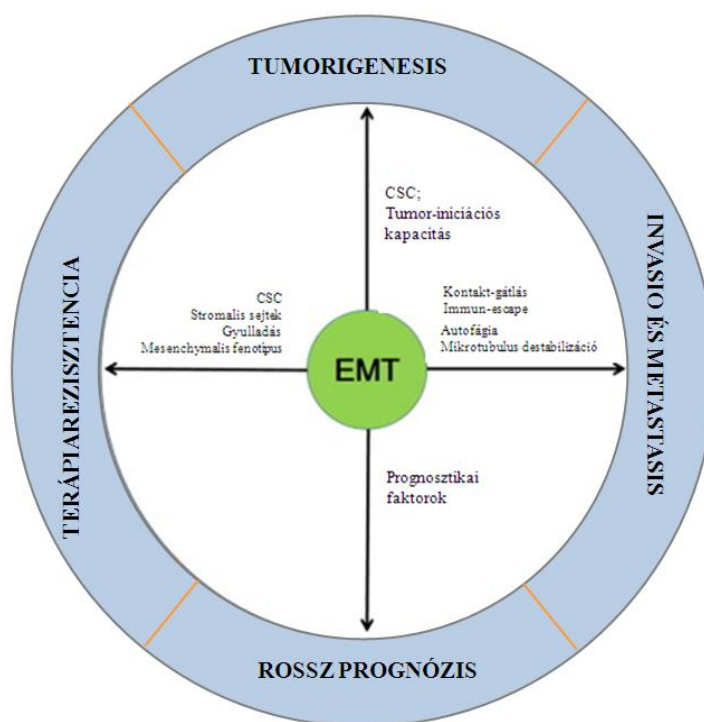
8. ábra. A TJ-fehérjék elhelyezkedése (56)

A JAM-proteinek egyszálú fehérjék, két immunglobulin-szerű részletük miatt az IgG-családhoz is tartoznak (57). A citoplazmatikus fehérjék legismertebb tagjai a ZO proteinek, melynek három altípusa ismert, a ZO-1, ZO-2 és ZO-3; szerepük a membránfehérjék aktin citoszkeletonhoz való rögzítése (58).

Mindezek mellett az utóbbi években számos egyéb intracelluláris mechanizmusban való részvételükre derült fény; a TJ-fehérjék egy része szerepet játszik a sejtproliferáció és egyes szignáltranszdukciós útvonalak szabályozásában, mások a carcinogenesisben, illetve további proteinek fontos funkciót töltenek be a metastasisképzésben és a

tumorprogresszióban. Ismét más fehérjéi a folyadékfelszívódás mértékét regulálják (a CLDN-16 és -19 a magnézium felszívódásában játszik szerepet) (59).

A tight junction-nak további lényeges szerepe van az epithelialis-mesenchymalis transitio (EMT) mechanizmusában is, mely mind fiziológias körülmények között (fejlődéstan), mind patológias viszonyok esetén (fibrosis, daganatképződés) megfigyelhető jelenség (9. ábra). Míg a hámsejtekre – részben a TJ struktúráknak is köszönhetően – megfelelő apico-basalis polarizáció jellemző, a mesenchymalis sejtek ezt a polarizációt elvesztik (60).



9. ábra. Az EMT szerepe a pancreascarcinómák iniciációjában, inváziójában, áttétképző tendenciájában és terápiás rezisztenciájában (61)

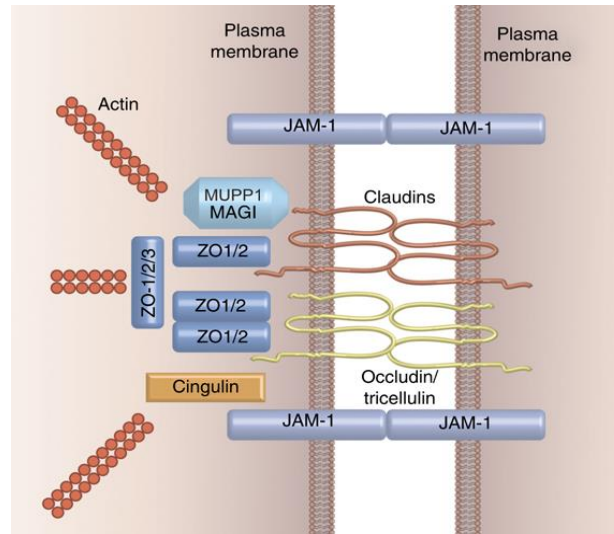
Egyes kutatások eredménye alapján a TGF- β hatására MDCK-sejtvonalban EMT következik be, mely együtt jár egyes CLDN-típusok és az occludin expressziójának megszűnésével (62). A közelmúltban derült fény a tricellulin és a marveld3 szerepére: EMT során ezek expressziója jelentősen csökken, elősegítve a vizsgált gyomorcarcinoma és pancreas tumorsejtek progresszióját.

1.3.1.1. ZO-fehérjék

Ezen fehérjék az ún. MAGUK (membrane-associated guanylate kinase) család tagjai; három PDZ-domain-ből, egy SH3 és GuK domain-ből állnak (10. ábra) (63) . A sejtmembránnal interakcióba lépő ZO-fehérjék altípusát az adott membránfehérje típusa határozza meg. A ZO-proteinek egyik legfontosabb része az ún. unique-5 (U5), mely felelős a ZO-1 TJ-beli pontos elhelyezkedéséért és C-terminalisa révén az occludinhoz való kötődésért. A ZO-fehérjék fent említett PDZ-domainjéhez kapcsolódik számos claudin molekula is, illetve a JAM proteinek saját PDZ-kötő helyeik révén csatlakoznak a ZO-1 C-terminalisához.

A ZO-fehérjék fontos feladatot látnak el nemcsak a TJ felépítésében, hanem a sejtkapcsoló struktúra fenntartásában is: ismert, hogy e proteincsalád hiánya következtében a hámsejtek nem képesek működőképes TJ létrehozására. A ZO-1 sejtremodellben, illetve embrionális szöveti differenciációban betöltött szerepét vizsgálta Katsuno (64). A ZO-2 sejtnövekedést befolyásoló hatásai is ismertek (65).

Feladatuk van a sejtciklus szabályozásában is: a ZO-1 associated nucleic acid-binding protein (ZONAB) segítségével egyrészt képesek egyes sejtciklust szabályozó fehérjék promoterével kapcsolatba lépni és befolyásolni az ErbB-2 promoter aktivitását, illetve az endogén ErbB-2 expressziót, másrészt PCNA-hoz és cyclinD1-hez való direkt kapcsolódás révén is befolyásolják a sejtciklus menetét (66). A ZO-2 fehérjére eddigi ismereteink alapján a proliferáció-kontroll jellemző, melyet a DNS-hez kapcsolódó scaffold-attachment factor-B (SAF-B) és a ZO-2 interakciója nyomán az AP-1 target génjeinek negatív szabályozásával ér el. A ZO-2 – c-Myc komplex a cyclinD1-promoteréhez kapcsolódva fejt ki annak expressziójára negatív hatást a sejtciklus G1/S fázisában (67).



10. ábra. A ZO-fehérjék elhelyezkedése és kapcsolata egyéb TJ-proteinekkal (68)

1.3.1.2. Occludin

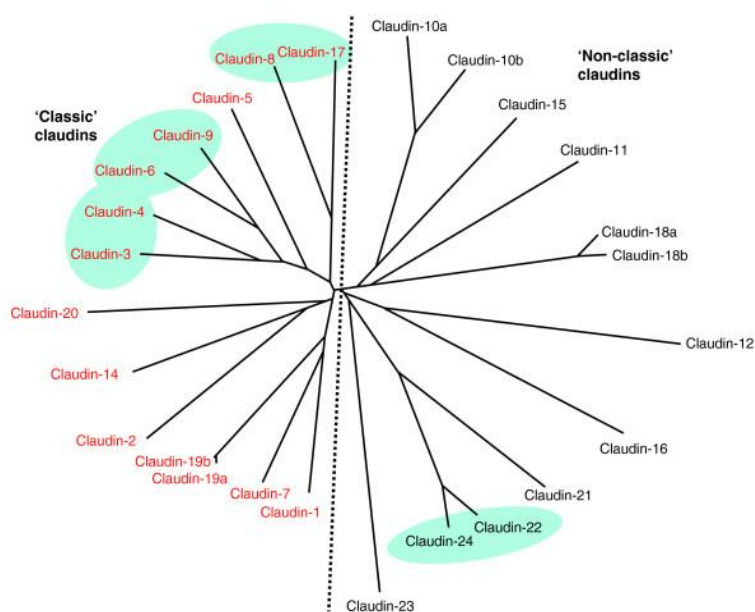
Az 65 kDa molsúlyú occludin az első azonosított transzmembrán TJ-alkotó fehérje (69). Fokozott expressziója emeli a sejtmembrán elektromos ellenállását (barrier-funkció). Hiánya ellenére a TJ egerekben megfelelő struktúrába rendeződött, azonban számos fejlődési zavar volt észlelhető a vizsgált állatokban: növekedési zavarok, csontfejlődési rendellenességek, hereatrophia, infertilitás vagy gyomornyálkahártya-hyperplasia. Az occludin hiányának *in vitro* vizsgálata során fokozódott az egyes kationok iránti membránpermeabilitás. A fehérje szabályozza a retina microvasculatúrájának endothelsejtjeiben a VEGF-indukált permeabilitás-változást is, az occludin kaveola-dependens internalizációja következtében pedig aktin-depolimerizáció és barrier-funkcióvesztés észlelhető (70).

Sejtproliferációban betöltött szerepe sokáig kérdéses volt, a közelmúltban azonban igazolták jelenlétét a centrosomákban, amelyekben feltehetően egy foszforilációs útvonalon keresztül, a centrosoma-szeparáció révén befolyásolja a mitosist. A carcinogenesisben való szerepe régebb óta ismert; a konstitutívan expresszáldó Raf-1 hatására az occludin transzkripciója csökken, ennek hátterében az occludin promoterében található Slug és E-box direkt kapcsolódása áll. Az aktivált Ras-jelút vonal hatására az occludin mellett a CLDN-1 és -2, valamint a ZO-1 expressziója is

mérséklődik. A VHL-tumorsuppresszor gén elvesztése következtében csökken az occludin és CLDN-1 termelődése.

1.3.1.3. Claudinok

A napjainkig megismert 27 féle claudin (CLDN) (71) közül az elsőket 1998-ban fedezték fel (72), az elmúlt 16 évben azóta is intenzív kutatások tárgyát képezik (73). Az első claudinokat (CLDN-1 és -2) Furuse és munkatársai azonosították csirke-hepatocytákban (74). Az eddig leírt közel harminc altípus közül számos sejt- és szövetspecifikus elhelyezkedésű és funkciójú. A CLDN-fehérjéket kódoló géncsaládot egy esztendővel később, 1999-ben Morita azonosította (75). Vizsgálatai alapján a proteinek kódoló gének 12,5 –69,7% szekvencia-homológiát mutatnak, mely már előre jelezte az egyes CLDN-altípusok közötti funkcióbeli átfedést. A mára azonosított közel harminc altípus tagjai filogenetikai osztályozás alapján két nagy csoportba, az ún. 'klasszikus CLDN' és a 'nem klasszikus CLDN'-kategóriába illeszthetők (11. ábra) (75, 76).



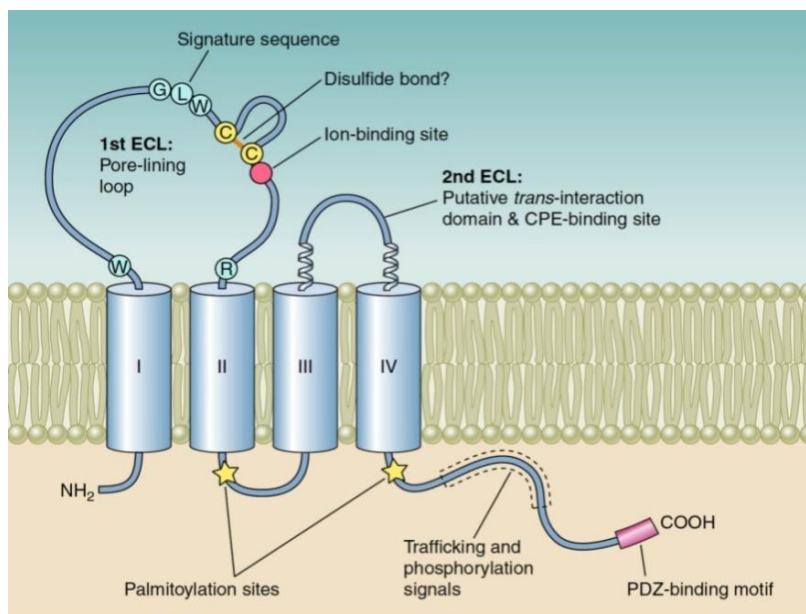
11. ábra. A humán claudin proteinek filogenetikai fája (73)

Felépítésüket tekintve négy transzmembrán domainből és két extracellularis hurokból állnak; N- és C- terminalisuk intracellularisan helyezkedik el (12. ábra). A második és

harmadik transzmembrán szakaszt kódoló gének kivételével a CLDN-fehérjéket kódoló szekvenciája megegyezik; a 27 eltérő fehérje-altípus a harmadik és negyedik transzmembrán egység genetikai különbözőségéből fakad. Az első extracelluláris loop nagyobb (~50 aminosav), és kifejezettebben hidrofób, mint a második extracelluláris loop (~20 aminosav). Az első extracelluláris huroknak jelentős feladata van az intercelluláris zippzár kialakításában.

Bár a CLDN-ok általában homodimereket képeznek egymással, ismert egyes típusainak heterodimerizációja is (77, 78). N-terminalishoz közelebbi extracelluláris hurkuk révén képesek egymással 'cis-', míg a másik, C-terminalis-közeli hurok segítségével 'trans-' interakcióban más CLDN-molekulákhoz kötődni. E cis/trans összeköttetés eredményezi a CLDN-ok által kialakított zippzár-szerű kapcsolatot.

Közös feladatuk az intercelluláris rések lezárásában és a sejtadhesióban való részvétel, a paracelluláris transzportfolyamatok szabályozása és a korlátlan laterális diffúzió gátlásán keresztül a szöveti homeosztázis biztosítása (77, 78). Barrierfunkciójának szükségességét jelzi, hogy a CLDN-1 hiánya a születés után 24 órával az étellel összeegyeztethetetlen mértékű vízvesztést eredményez (79), míg CLDN-5 hiányos egerek közvetlenül a születés utáni órákban súlyos agyvérzést szenvedtek, a CLDN-16 elvesztése pedig hypomagnesaemiát és nephrocalcinosiszt okoz (80). Ismert tény az is, hogy a CLDN-3 és -4 a *Clostridium perfringens* enterotoxinjának (CPE) receptora: kötődése után a toxin hatására a CLDN-molekula depolimerizálódik, az így létrejövő pórusokon keresztül fokozódik a membránpermeabilitás (81). E citotoxikus mechanizmust kihasználva napjainkban a CPE-receptor és a claudinok kapcsolata a rosszindulatú daganatok célzott terápiájával kapcsolatos kutatások kiemelt eleme (82-84).



12. ábra. A claudinok funkcionális felépítése és fontos kötőhelyei (85)

Míg normál humán pancreas CLDN-expresszió vizsgálata alapján a ductalis sejtek CLDN-1, -2, -3, -4 és -7 pozitívak, az acinussejtek CLDN-1, -3, -4 és -7 fehérjét expresszálnak és az endocrín hasnyálmirigy CLDN-3 és -7 proteint termel, Offner munkacsoportjának vizsgálatai alapján pancreas ductalis adenocarcinómában CLDN-1, -3, -4 és -7 expresszió figyelhető meg (86). Borka és munkatársainak kutatási eredményei alapján az exocrín eredetű, ductalis adenocarcinómák CLDN-1, -2, -4 és -7 overexpresszáltak, míg az – általuk elsőként vizsgált – endocrín pancreastumorok esetében csak CLDN-3 és -7 pozitivitás volt észlelhető (87). A CLDN-2 kivételével az összes vizsgált fehérje sejtmembránra lokalizálódott, a CLDN-2 azonban citoplazmatikus, granularis elrendeződésben volt azonosítható. Kutatási eredményeik alapján acinussejtes daganat irányú differenciáció esetén a CLDN-1 és CLDN-2 fehérje overexpresszálódik. A pancreasdaganatok CLDN-expressziós profilját tekintve a CLDN-1, -2 és -4 fehérje a ductalis, a csupán CLDN-1 az acinaris, a CLDN-3 az endocrín differenciáció biztos markere.

Holczbauer és munkatársai normál májszövetet vizsgálva egyértelmű, lineáris CLDN-1 és CLDN-7 membránpozitivitást észleltek mind a hepatocyták, mind az epeúti sejtek apicalis felszínén. A CLDN-2 fehérje a citoplazmában, granularisan volt detektálható. A

vizsgált CLDN-3 proteint a hepatocyták membránjában gyengén expresszálódott, míg az epeutakban lényegesen erőteljesebb mértékben volt kimutatható. CLDN-4 fehérje csak a biliaris sejtekben volt azonosítható (88). A humán máj vizsgálata során észlelt kifejezett CLDN-7 expresszió egyes munkacsoportok eredményei szerint a CLDN-7 – EpCam komplex révén szerepet játszhat a tumorprogresszióban és a metastasisképződésben is (89). A CLDN-4 molekula fokozott expressziója fontos differenciációs eszköz a cholangio- és hepatocellularis carcinomák esetében. A CLDN-4 hiánya a hepatocellularis differenciáció, a CLDN-10 expresszió pedig fontos markere a recidíváló hepatocellularis carcinomáknak (90). Ismert a CLDN-1 HCV-koreceptorként való működése is (91). Halász és munkatársai az agresszívebb viselkedésű, embrionalis típusú hepatoblastomákban csökkent vagy hiányos CLDN-1 és -2 expressziót észleltek (92).

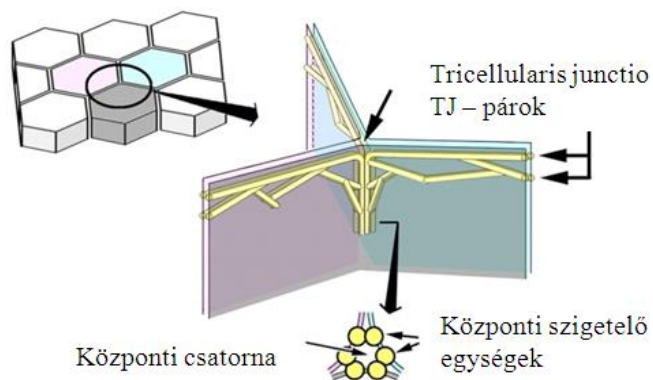
Tüdővel kapcsolatos kutatások eredményei alapján a magas CLDN-3 expresszió kissejtes daganatokra jellemző, így megkönnyíti a daganat elkülönítését egyes atípusos carcinoidoktól, az adenocarcinomáktól és a laphámcarcinomáktól (93), a sejtmagban expresszálódó CLDN-2 pedig egyes kutatási eredmények alapján fokozza a tüdő-adenocarcinomasejtek proliferációját (94). A CLDN-fehérjecsalád jelenlétét számos további szervben és daganatban vizsgálták: a gastrointestinalis rendszer hámsejtjeiben és egyes daganataiban a CLDN-2 mutat szövet-/sejttípus-specifitást (95, 96); CLDN-18 pancreas (97), a CLDN-7 és -18 gyomor (98), a CLDN-5 pedig endothel-specifikus marker (99). Oesophagus eredetű laphámcarcinomákban a CLDN-1 expresszió kifejezettebb, mint a nem daganatos laphámban. Barrett-oesophagusban és az abból kialakuló adenocarcinomában CLDN-1 és -2 (100) mellett CLDN-4 overexpresszió is észlelhető volt (101). Az emlődaganatokban leírt, ún. 'claudin-low' tumorscsoport (CLDN-1 és -4 hiánya) fontos prognosztikai értékkel bír a tumorprogresszió és a túlélés szempontjából (102). Normál cervicalis mucosában a CLDN-2 a basalis sejtrétegben mutatható ki, míg a CLDN-1, -4 és -7 a parabasalis és intermediaer sejtekben overexpresszálódik. Dysplasticus elváltozásokban és *in situ* carcinomákban mindhárom claudin-típus diffúz pozitivitást mutat az egész hámban, CLDN-3 jelenlétét azonban a normál és a dysplasticus vagy daganatosan átalakult hámban nem igazolták hazai vizsgálatok során. Az invázió kialakulásával a vizsgált claudinok csökkenő expressziót

mutattak (103). A CLDN-expressziós mintázat nőgyógyászati daganatokban szintén diagnosztikus lehet (104).

Mindezek alapján jól látható, hogy a hámsejtek közti kapcsolatok fenntartásán túl a carcinogenesisben, a tumorprogresszióban és a metastasisképzésben is szerepük van. Klinikai alkalmazásuk egyelőre még várat magára, azonban a jelenleg is folyó kutatások alapján a jövőben target-terápia célpontjaiként egy-egy CLDN-fehérje esetleg alkalmazható lehet.

1.3.1.4. Tricellulin

A barriológia aktuális kutatási eredményei alapján a hámsejtek közötti szoros sejtkapcsoló struktúráknak jelenleg két formáját különböztethetjük meg; ezek a két sejtet összekapcsoló bicellularis TJ-k (bTJ) és a három sejt találkozási pontjában észlelhető tricellularis TJ-k (tTJ) (105). Míg a két hámsejt közötti szoros sejtkapcsolat létrehozásában szerepet játszó bicellularis junctiók (bTJ) létezése már régóta ismert, és az ezeket alkotó fehérjék túlnyomó többségét is azonosították, a három sejt találkozási pontjánál elhelyezkedő sejtkapcsoló struktúrákat (tTJ) alig néhány éve fedezték fel. Ismert, hogy a tricellularis pontok területén a két sejtet összekapcsoló bTJ folytonossága a hámsejtek apicalis részén megszűnik; a struktúra e területeken a basolateralis membrán irányába fordul (13. ábra) (106, 107).



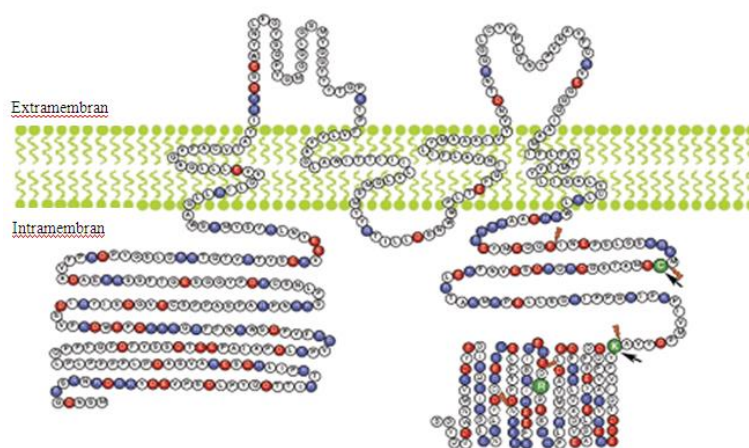
13. ábra. A tricellulin elhelyezkedése (105)

Az utóbbi néhány esztendőben folyó barriológiai kutatások alapján a TRIC, mint TJ-alkotó fehérje besorolása módosult; az occludin és marveld3 proteinekkel együtt a

TAMP (TJ-associated membrane proteins) – fehérjék MARVEL (MAL and Related proteins for Vesicle trafficking and membrane Link) – családjához tartozik. Ezek funkciója különböző, de egymást részben átfedik (108).

1.3.1.4.1. A TRIC felépítése

A 63,6 kDa molsúlyú, 555 aminosavból felépülő protein négy transzmembrán domainnel, két extracelluláris hurokkal és intracelluláris terminalisokkal rendelkezik (14. ábra); C-terminálisának utolsó 130 aminosava az occludin C-terminálisával, mely 32% szekvenciahomológiát jelent (109). Első extracelluláris hurka 40 aminosavból épül fel, a második 31-ből. N-terminalisát 190, míg C-terminalisát 193 aminosav alkotja (56). Riazuddin és munkatársai 4 izoformát különítették el: a TRIC-a a leghosszabb, 7 exonból és 558 aminosavból álló, 64 kDa molsúlyú fehérje (110). A 62 kDa mőtömegű TRIC-a1 a TRIC-a szerkezetéhez igen hasonló, azonban a 3. exonja hiányzik; a TRIC-b rövidebb, 458 aminosav által képzett, 52 kDa molsúlyú protein, míg a TRIC-c egy mindössze két transzmembrán domainből, 442 aminosavból álló splice-variáns. MDCK sejtvonalon végzett vizsgálatok alapján a TRIC C-terminálisa a fehérje basolateralis lokalizációjáért, az N-terminalis pedig a TRIC tTJ-ben való rögzítéséért felelős. Egyes kutatások alapján ismertek homomer (TRIC-TRIC) és heteromer (TRIC-occludin) kötődési formái is (111).



14. ábra. A tricellulin felépítése (50)

Fiziológiásan mind a TRIC, mind az occludin szerin/treonin- és egyes tirozin-kinázok által foszforilált állapotban van. Míg az occludint C-terminálisán a szerin/threonin-kinázok csoportjába tartozó casein kináz (CK)-1 és -2 tartja foszforilálva, a TRIC foszforilálói eddig ismeretlenek, az azonban bizonyos, hogy számos betegség (egyes gyulladásos bélbetegségek, vese-tüdőbetegségek, carcinogenesis) háttérében szabályozatlanná váló foszforilációs mechanizmusok is állnak (105).

1.3.1.4.2. A TRIC funkciója

Bár a TRIC funkciója még nincs tisztázva teljes egészében, számos feladatára már fény derült; köztük az egyik legfontosabbra, a transepithelialis barrier fenntartására (106). Bicellularis TJ-ben a TRIC jelenléte nyomán fokozódik a transzmembrán elektromos ellenállás (TER), mely a lezáró, sealing funkció egyik egyértelműen mérhető markere. A TER emelkedésével egyidejűleg mérséklődik egyes ionok és makromolekulák transzmembrán permeabilitása is. Tricellularis TJ-t vizsgálva a makromolekulák permeabilitása szintén csökken, azonban az ionpermeabilitás tTJ-től független (112). Ikenuchi és munkacsoportjának vizsgálatai alapján TRIC-KO sejtekben a TER csökkenése és a paracellularis permeabilitás fokozódása észlelhető.

A molekula C-terminalis vége – az occludinnal homológ szakasz – felelős a ZO-1-hez való kapcsolódásért. Ismert, hogy az adipocita-differenciációban és lipidmetabolizmusban is szerepet játszó PPAR- γ az epithel- és endothelsejtek barrierfunkciójának megőrzésében is fontos feladattal bír. A fehérje expresszióját számos szövettípusban vizsgálták (2. táblázat). Humán nasalis epithelialis sejtvonalat (HNEC) PPAR- γ -agonista rosiglitazonnal és troglitazonnal kezelve a TJ-k és TRIC mennyisége nőtt (113). Egyes kutatások alapján occludin-KO sejtekben a TRIC a tTJ-ben nem detektálható, azonban megfigyelhető a bTJ-ban, felvetve ezzel az occludin néhány funkciójának átvételét. Fontos feladata továbbá a korlátlan makromolekula-áramlás szabályozása (114, 115), valamint az a tény, hogy a tTJ centralis tubulusának átmérője meghaladja számos gyógyszermolekula méretét, így a jövőben a TRIC-nak szerepe lehet egyes gyógyszerhatóanyagok szállításában is (50). Egyes jól differenciált PDAC sejtvonalakon végzett vizsgálatok alapján az extracellularis kalcium-szint szintén befolyásolja a TRIC expresszió mértékét: mind a mesterségesen előidézett hypocalcaemia, mind a hypercalcaemia fokozta a TRIC fehérje-expresszióját (116).

Néhány éve ismert, hogy egyes TRIC-mutációk szerepet játszanak a familiáris siketség egyik formájának kialakulásában (110), azonban Ohkuni és munkacsoportjának eredményei alapján a TRIC-nak feladata lehet számos inhalatív antigén és felső légúti vírusfertőzés prevenciójában is (117). Szintén mikrobiológiai jelentőségű, hogy egyes Shigella-, Rickettsia-, Listeria- és Burkholderia-fajok a gazdasejt aktin citoskeletonját használják a sejtbe jutáshoz, mely túlnyomórészt a sejtek tricellularis pontjain megy végbe (118, 119).

1.3.1.4.3. A TRIC genetikája és szabályozása

Az occludint és TRIC-t kódoló génszakaszok az 5. kromoszóma rövid karján tandem helyezkednek el, felvetve a filogenezis alatti duplikáció lehetőségét. Jól ismert, hogy a TJ eltűnése fontos szerepet játszik az epithelialis-mesenchymalis transitióban, mely során a hámsejtek elvesztik polaritásukat (120). A folyamatot befolyásoló egyik legfontosabb molekula a SNAIL-1 cinkujjas transzkripciós faktor (121). Egyes egér Eph4-sejtvonalakban végzett vizsgálatok eredményei alapján SNAIL-1 hatására kifejezetten csökkent az occludin- és CLDN-expresszió (122). Annak tisztázása céljából, hogy más, eddig ismeretlen bTJ- vagy tTJ-alkotó membránfehérjék is a SNAIL-1 szabályozása alá esnek-e, egy 24 000 gén vizsgálatára alkalmas oligonukleotid-microarray-elemzést végeztek. E vizsgálat alapján fedezték föl több más SNAIL-1-target membránfehérje mellett a túlnyomórészt tricellularis pontokban elhelyezkedő tricellulint. Masuda és munkacsoportja gyomorcarcinoma-sejtvonalban igazolta, hogy SNAIL-1-indukált EMT során a TRIC expresszió jelentősen csökken; fehérjeszintű vizsgálatok alapján a TRIC és E-kadherin mennyisége csökken, míg ezzel párhuzamosan a tumorsejtek vimentin és N-kadherin-expressziója fokozódik (123). Humán pancreas adenocarcinoma sejteken (HPAC) végzett elemzések alapján a TRIC JNK-útvonalon keresztül is szabályozódik (124). Yamagouchi és munkatársainak kutatási eredményei szerint humán pancreas ductus epithel (HPDE)-sejtekbe juttatott humán telomeráz reverz transzkriptázzal (HTERT) végzett vizsgálatok alapján a PKC is hatással van a TRIC expressziójára (125). Yu és munkacsoportja a TRIC funkcióját és lokalizációját vizsgálta: MDCK II sejtvonalakban az occludin expressziót RNS-interferencia révén gátolták (KD1 és KD2), melynek következtében a TRIC a tTJ-k területéről a bTJ-k régiójába került át. Eredményeik alapján fölvetődik, hogy az

occludinnak szerepe lehet a TRIC tricellularis pozícióban tartásáért úgy, hogy a TRIC-t kizárja a bTJ-ből (126). A humán Corti-szerv lamina reticularisának vizsgálatakor pakisztáni családok örökletes, tünetmentes sükettség-szindrómája (DNFB49) hátterében derült fény TRIC-mutációra (5q13.2-q14.1) (127).

2. táblázat. Tricellulin expressziójával kapcsolatos eddigi kutatások és vizsgált szövetek/szervek

VIZSGÁLT SEJT/SZÖVET	MUNKACSOPORT
Egér vékonybél, gyomor, vese	Ikenouchi et al., 2005 (105)
Humán Corti-szerv lamina cochlearisa	Riazuddin et al., 2006 (110)
Humán HaCaT-keratinocytá sejtek, érett dendritikus sejtek	Schlüter et al., 2007 (128)
MDCK II-sejtvonal	Krug et al., 2009 (114)
Humán Langerhans-sejtek bőrben	Kubo et al., 2009 (129)
Humán nasalis epithelsejtek	Ohkuni et al., 2009 (117)
Humán csírasejtek, Sertoli-sejtek	Hermo et al., 2010 (130)
Humán gyomorcarcinoma sejtvonal	Masuda et al., 2010 (123)
Egér Schwann-sejtek	Kikuchi et al., 2010 (131)
Humán tonsilla squamosus sejtes carcinoma	Kondoh et al., 2011 (132)
Humán fibrolamelláris HCC	Patonai et al., 2011 (133)
Humán microglia és gyomorszövet	Mariano et al., 2011 (134)
Humán tüdőcarcinoma	Soini et al., 2012 (135)
Humán nasalis polypsejtek	Nguyen et al., 2013 (136)
Humán neuronok, astrocyták	Mariano et al., 2013 (137)
Humán neuronok, retina endothel sejtek	Iwamoto et al., 2014 (138)

1.3.1.5. Lipolysis stimulált lipoprotein receptor (LSR)

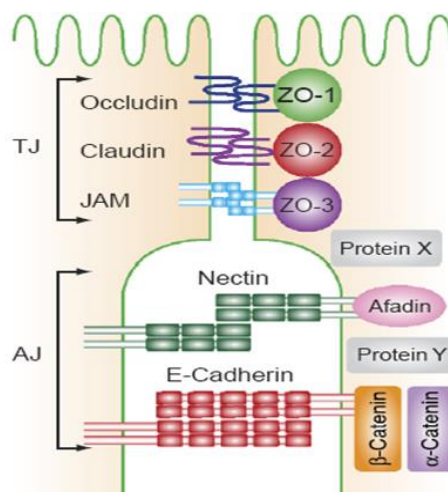
A Masuda és munkacsoportja által leírt, 65 kDa molsúlyú, 581 aminosavból felépülő, szintén a tricellularis találkozási pontokban megfigyelhető fehérje egy triacilgliceridben gazdag lipoprotein receptor. Felépítését tekintve integráns membránfehérje, egy extracellularis hurka és egy transzmembrán, illetve egy extra- és intracellularis domainje van; extracelluláris domainje IgG típusú (139). Barriológiai szerepe

túlnyomórészt még ismeretlen, azonban Furuse és munkatársainak vizsgálata alapján feltehetően tájékozódási pont a TJ-proteinek számára: LSR-KO Eph4-sejtek esetén az occludin a tricellularis TJ területében akkumulálódott, míg TRIC-KO Eph4-sejteken a LSR a tricellularis junctiókban maradt, míg LSR-KO sejteket vizsgálva a TRIC basolateralis membránba való áthelyeződése volt észlelhető (140).

1.3.2. Az *adherens junctio*

Az adherent junction (AJ) szintén két hámsejt közötti sejtkapcsoló struktúra, a TJ-hoz képest basalisabban helyezkedik el, citoplazmatikus oldala az aktin filamentumokhoz kapcsolódik. Nem hámeredetű sejtekben ismert, hasonló struktúrájú sejtkapcsoló rendszer a fascia adherens, mely szívizomsejtekben a legismertebb.

Szerkezetét tekintve ismert a sejtek között körbefutó formája, ez a zonula adherens, illetve a pontszerűen az ECM-hoz kapcsolódó típusa (adhéziós plakk). A sejtközi kapcsolat fenntartásán túl számos intracelluláris jelátviteli útvonalat közvetít (141). A kapcsolódásban szerepet játszó legfontosabb molekulacsalád a kadherineké, melyek transzmembrán fehérjék, a szomszédos sejtek kadherin molekuláival alkotnak homodimereket. Az AJ további lényeges alkotóelemei a kateninek (142). Az α -katenin a β - vagy γ -katenin révén indirekt módon kötődik a kadherinekhöz, és kapcsolódik az aktin citoszkeletonhoz. A γ -katenin/plakoglobin leginkább a desmosomákban fordul elő, azonban E-kadherinhez kapcsolódva vasculáris endothelben is kimutatták jelenlétét. A δ -katenin vagy p120 a kadherinekhöz juxtamembrán részeihez kötődik. Az endothelsejtek zonula adherens típusú struktúrájának fő alkotója az E-kadherin/CDH5 vagy CD144, melynek lényeges szerepe van a vasculáris integritás megőrzésében. A nyirokerek kivételével a kadherinekhöz a vasculáris endothelsejtekben zippzár-szerű struktúrákat alkotnak, ezzel is biztosítva a sejtek közötti stabil kapcsolatot (143). A CD144 mellett további endothel-specifikus fehérje a CLDN-5. További zonula adherens-alkotó proteinek a vinculin, eplin és α -aktinin (144).



15. ábra. A 'tight junction' és 'adherent junction' egymáshoz viszonyított helyzete (145)

1.3.3. Desmosoma

A desmosoma vagy macula adherens adhéziós fehérjékből és az azokat az aktin és cytokeratin filamentumokhoz kapcsoló proteinekből álló komplex (146, 147). A hámsejtek basolateralis membránjában helyezkednek el, feladatuk egyfelől a sejtkapcsoló membránfehérjék és a sejten belüli intermedier filamentumok összekapcsolása révén a hámsejtek struktúrájának megőrzése, másfelől a szöveti differenciációban és a morfogenezisben is fontos szerepet töltenek be (148). Legfőbb alkotói egyrészt a desmosomális kadherineket, másrészt az Armadillo-fehérjecsaldhoz tartozó plakoglobin és plakophilin (149), illetve a plakinn-proteinek családjába sorolható desmoplakin, envoplakin, periplakin és lectin (150). Míg az AJ csak egyféle kadherint (E-kadherin) tartalmaz, addig a desmosoma a kadherineket két típusból épül fel, ezek a desmoglein és desmocollin (151), melyek transzmembrán proteinek; öt extracelluláris domainjük segítségével, homofil kötődések révén kapcsolódnak egymáshoz, áthidalva a szomszédos sejtek közötti rést. További közös jellemzőjük a kalcium-kötőhely. A hámsejtek legfőbb intermedier filamentuma a citokeratin, mely a desmosomális plakkokhoz rögzül; nem hámeredetű sejtekben a citokeratin helyett desmin és vimentin révén kapcsolódnak a membránfehérjék a desmosomális plakkokhoz. A plazmamembrán citoplazmatikus oldalán további két, denz szerkezetű egység különíthető el: a külső denz plakk (ODP) és a belső denz plakk (IDP).

2. CÉLKITŰZÉSEK

Napjainkban világszerte aktív kutatások folynak a barriológia területén; számos eredménynek meghatározó következménye lehet nem csupán az alapkutatásokban, hanem a közeli vagy távolabbi klinikai vizsgálatok, esetleges jövődöbeli célzott terápiás lehetőségek tekintetében is. A sejtkapcsoló struktúrákat és az azokat alkotó fehérjéket fehérje- és RNS-szinten is elemezték; azonban a tudományág fejlődésével egyidejűleg számos további sejtkapcsoló fehérje létére és fiziológiás-patofiziológiás funkciójára derült fény.

A TRIC a fentebb részletezett számos vizsgálat eredménye; a fehérje különböző, sejtdifferenciációban, carcinogenesisben, tumorprogresszióban megismert szerepe nyomán került kutatásunk középpontjába. A fehérjével kapcsolatos kutatások túlnyomórészt sejtvonalakon vagy elektrofiziológiai vizsgálatok segítségével folytak; humán szöveteken elenyésző mennyiségű elemzést végeztek.

Mindezek alapján célul tűztük ki, hogy a TRIC fehérje- és RNS-expresszióját megvizsgáljuk normál humán hasnyálmirigyben és májban, illetve ezek leggyakrabban előforduló primer malignus daganataiban.

Vizsgálataink megkezdése előtt a következő kérdéseket tettük fel:

1. Expresszálódik-e a TRIC normál humán pancreasban? Amennyiben igen, az expresszió mértéke különbözik-e a ductalis, acinaris, illetve endocrín struktúrákban?
2. Megfigyelhető-e a TRIC fehérje pancreas eredetű ductalis adenocarcinomákban?
3. Észlelhető-e TRIC-expresszióbeli különbség a normál pancreas és a ductalis adenocarcinomák, illetve az eltérő differenciáltságú adenocarcinomák között?
4. Kimutatható-e TRIC endocrín pancreasdaganatokban, s amennyiben igen, eltérően expresszálják-e a különböző grádusú endocrín tumorok ?
5. Detektálható-e a hasnyálmirigy acinussejtes carcinomájában a TRIC?

6. Jelen van-e normál humán májszövetben a TRIC? Amennyiben igen, észlelhető-e expressziós vagy lokalizációs különbség a májsejtek és az epeutak között?
7. Kimutatható-e TRIC cirrhotikus, nem daganatos májszövetben?
8. Hepatocellularis carcinomában azonosítható-e a vizsgált molekula?
9. Van-e különbség a különböző differenciáltságú HCC-k TRIC expressziójában?
10. Előfordul-e a vizsgálni kívánt protein fibrolamellaris HCC-ben?
11. Észlelhető-e a TRIC-fehérje termelődése cholangiocarcinomában, illetve van-e expressziós különbség az eltérő differenciáltságú adenocarcinomák között?

3. MÓDSZEREK

3.1. Betegek, vizsgálati anyagok

Vizsgálataink során összesen 128, a SE II.sz. Patológiai Intézet archívumából származó tumormintát, közülük 76 hasnyálmirigydaganatot és 52 primer májdaganatot, illetve 12 cirrhotikus mintát elemeztünk (3. táblázat). A pancreastumorok közül 58 sebészileg eltávolított pancreas ductalis adenocarcinomát (14 grade 1, 19 grade 2 és 25 grade 3 daganat), 15 endocrin hasnyálmirigytmort (5 benignus, 7 borderline és 3 malignus) és 3 acinussejtes carcinomát vizsgáltunk (4. táblázat); a májtumorok közül 32 hepatocellularis carcinomát (10 grade 1, 13 grade 2, 8 grade 3 és 1 kevert grádusú daganat) és 20 intrahepatikus cholangiocarcinomát (5 grade 1, 9 grade 2 és 6 grade 3 differenciáltságú tumor) elemeztünk (5. táblázat) a Semmelweis Egyetem Etikai Bizottságának engedélyével (#172/2003). A májdaganatok vizsgálata mellett 12 cirrhotikus májszövetet is bevontunk kutatásunkba. Munkánk másik részében a hepatocellularis carcinomák egy altípusát, a fibrolamellaris HCC-t vizsgáltuk; a kiválasztott 11 eset mellett 7 'konvencionális' és 7 cholangiocarcinomát is elemeztünk (6. táblázat). Immunfluoreszcens vizsgálatainkat 5-5 ép hasnyálmirigy és ductalis adenocarcinoma, illetve normál máj és HCC frissen fagyasztott, -80°C-on tárolt mintáján végeztük. Kontrollcsoportjainkat 20, hasnyálmirigytmor mellől vett, daganatmentes pancreasszövet, illetve 20 tumormentes májállomány alkotta.

3. táblázat. Vizsgálatunk során felhasznált mintáink számbeli és demográfiai megoszlása

	Esetszám	Férfi/nő arány	Átlagéletkor (év)
PDAC	58	25/33 (1:1,32)	62,36
PET	15	3/12 (1:4)	54,78
ACC	3	2/1 (1:0,5)	34,66
HCC	32	26/6 (1:0,23)	67,45
iCC	20	7/13 (1:1,85)	57,4
Cirrrosis	12	10/2 (1:0,2)	60,14

4. táblázat. A vizsgált pancreasdaganatok szövettani és demográfiai megoszlása

Daganattípus	Esetszám	Férfi/nő arány	Átlagéletkor (év)
PDAC			
Grade 1	14	4/10 (1:2,5)	63,33
Grade 2	19	11/8 (1: 0,72)	61,46
Grade 3	25	10/15 (1: 1,5)	62,29
PET			
Benignus	5	1/4 (1:4)	44,2
Borderline	7	2/5 (1:2,5)	54,14
Malignus	3	0/3	66
ACC	3	2/1 (1:0,5)	34,66

5. táblázat. A vizsgált májminták szövettani és demográfiai megoszlása

Daganattípus	Esetszám	Férfi/nő arány	Átlagéletkor (év)
HCC			
Grade 1	10	8/2 (1:0,25)	65,2
Grade 2	13	10/3 (1: 0,3)	68,69
Grade 3	6	5/1 (1: 0,2)	70
Grade 4	2	-	63,5
Nem gradált	1	-	-
iCC	20	7/13 (1:1,85)	57,4
CIRRH	12	10/2 (1:0,2)	60,14

6. táblázat. FLHCC elemzésekor vizsgált mintáink megoszlása

	Esetszám	Férfi/nő arány	Átlagéletkor (év)
FLHCC	11	5/6 (1:1,2)	20,81
HCC	7	6/1 (1:0,16)	66
CC	7	2/5 (1:2,5)	60

3.2. Módszerek

3.2.1. Szövetteni vizsgálatok

A szövetmintákat az eltávolítás után azonnal 10%, pufferolt formalinba helyezve 24 órán keresztül szobahőmérsékleten fixáltuk. Ethanol- és xylol- dehidratációt követően paraffinba ágyasztuk. A 3-4 µm vastagságú metszeteket hematoxilinnal és eozinnal festettük meg (Reanal Kft., Budapest, Magyarország). Az acinussejtes daganatok vizsgálatakor perjódsv-Schiff (PAS)- és emésztéses-PAS-reakciót végeztünk, illetve mucikármin festést alkalmaztunk. A pontos diagnózis és grádus meghatározását három független patológus szakorvos végezte.

3.2.2. Immunfluoreszcencia

Immunfluoreszcens vizsgálataink során 5 normál hasnyálmirigyet, 5 pancreas ductalis adenocarcinómát, illetve 5 normál májat, 5 HCC-t és 5 iCC-t elemeztünk. A fagyasztott blokkokból származó, 5 µm vastagságú metszeteket metanol és aceton 1:1 arányú keverékében pancreas esetében 5, a májminták esetében 10 percig -20°C-on fixáltuk, majd szobahőmérsékleten megszáritottuk. A nem-specifikus fehérjekötődést PBS-oldattal (Protein Block Serum-Free; DAKO, Glostrup, Dánia) gátoltuk 30 percig 37°C-on. A metszeteket a primer antitestekkel 4°C-on, egy éjszakán át inkubáltuk (7. táblázat).

7. táblázat. Immunhisztokémiai vizsgálataink során használt primer antitestek.

ANTIGÉN	FAJ	KLONALITÁS	KLÓN	HIGÍTÁS	GYÁRTÓ
PANCREAS					
Tricellulin	nyúl	poliklonális	ZMD.699	1:200	Invitrogen
Occludin	egér	monoklonális	OC-3F10	1:100	Invitrogen
Kollagén IV	egér	monoklonális	CIV 22	1:100	Dako
Synaptophysin	egér	monoklonális	SY 38	1:100	Dako
MÁJ					
Claudin-1	egér	monoklonális	2H10D10	1:100	Invitrogen
Claudin-4	egér	monoklonális	3E2C1	1:100	Zymed
MRP2	egér	monoklonális	M2III-6	1:50	Abcam
Tricellulin	nyúl	poliklonális	ZMD.699	1:50	Invitrogen

Másodlagos antitestekként Alexa Fluor 568 kecskében termelt, nyúl-ellenes IgG-t (Invitrogen) és Alexa Fluor 488 számarban, egér ellen termelt IgG-t (Invitrogen) használtunk 1:200, PBS-hígításban (Phosphate Buffered Saline). Metszeteinket 30 percig szobahőmérsékleten, sötétben inkubáltuk, majd magfestésként 4',6-diamino-2 phenylindole (DAPI)-tartalmú Vectashieldet (Vector Labs., Burlingame, CA, USA) használtunk.

Kettős immunfluoreszcens vizsgálatainkat pancreaszövetekben tricellulin és occludin, tricellulin és synaptophysin, illetve tricellulin és kollagén IV kolokalizációjának kimutatása céljából végeztük. Májban tricellulin-CLDN-1 és – a tricellulin hámsejteken belüli orientációjának pontosítása céljából – tricellulin-MDR/MRP2 kettős jelölést végeztünk. Hepatocellularis carcinomákban a tricellulin-CLDN-1, míg intrahepatikus cholangiocarcinomákban a tricellulin-CLDN-4 kolokalizációját elemeztük. A fagyasztott metszeteket egy éjszakán át 4°C-on inkubáltuk a fent részletezett primer antitestekkel, ezt követően szekunder ellenanyagként szintén Alexa Fluor 568 kecskében termelt, nyúl-ellenes IgG-t (Invitrogen) és Alexa Fluor 488 számarban, egér ellen termelt IgG-t (Invitrogen) használtunk 1:200, PBS-hígításban (Phosphate Buffered Saline).

Az elvégzett immunreakciókat fluoreszcens mikroszkóp (Leica, RXA, Wetzlar, Németország) és konfokális lézer scanning mikroszkóp (Bio-Rad MRC-1024 system, Bio-Rad Lab., Hercules, CA, USA) segítségével, három független szakorvos részvételével elemeztük.

3.2.3. Immunhisztokémiai reakciók

A 3 µm vastagságú, formalinban fixált, paraffinba ágyazott metszeteket xilolban deparaffináltuk és felszálló alkoholsorban rehidráltuk. Az epitópfeltárás céljából végeztünk 4 perces proteáz-1 emésztést követően (Ventana Tucson, AZ, USA) peroxidáz és fehérjeblokkolást végeztünk, majd mintáinkat 42°C-on, 40 percen keresztül inkubáltuk nyúlban termelt poliklonális TRIC anti-C-terminális antitesttel 1:50 hígításban. A jelerősítéshez Amplification Kitet (Roche, Indianapolis, USA) használtunk. Az immunhisztokémiai reakciókat HRP-alapú Ventana Benchmark XT (Ventana) immunfestő automatával végeztük a gyártó ajánlásának megfelelő protokoll szerint. A szekunder ellenanyagok alkalmazása után a reakciók láthatóvá tételéhez UltraView™ Universal DAB Detection Kitet (Ventana) alkalmaztunk.

Pozitív kontrollként hasnyálmirigy esetében a tricellulint ismerten expresszáló eger duodenumából származó metszeteket, májmintáinkhoz humán duodenumot használtunk; negatív kontrollmintáink elkészítése során a primer antitesteket 'Antibody diluent'-tel (Ventana) helyettesítettük.

3.2.4. A tricellulin immunhisztokémiai reakciók értékelése

A tricellulin immunhisztokémiai reakciók kvantitatív elemzéséhez a metszeteket Mirax Panoramic Midi, illetve Panoramic 250 Scanner (3D Histech, Budapest, Magyarország) segítségével digitalizáltuk. Esetenként tizenöt, pancreas esetében 40x, májmintáink során 60x nagyítású, véletlenszerűen kiválasztott, nem átfedő látóteret fotóztunk. Az immunpozitivitás mértékének meghatározását digitális morfológia segítségével (Leica Qwin Software; Leica, Wetzlar, Németország) végeztük.

Ennek során meghatároztuk a vizsgált látótér teljes pixelszámához viszonyítva a pozitív területek pixelszámát, majd a program ez alapján kiszámolta az immunpozitív terület százalékos arányát (Area %). A reakciók értékelésekor az esetenként vizsgált 15 látótér vizsgálatakor kapott értékeket átlagolva minden mintához átlag-area %-ot társítottunk. A pozitív területek százalékos arányát a teljes vizsgált területhez viszonyítva adtuk meg, ezt az értéket tekintettük 'Area %'-nak.

3.2.5. Statisztikai analízis

A statisztikai vizsgálatok során csoportjaink tricellulin-expressziójának mértékét vetettük össze, melyhez Mann-Whitney-féle non-parametrikus tesztet használtunk. A túlélési elemzések során Kaplan-Meier analízist végeztünk. A teljes túlélés (OS) intervallumának a diagnózistól a halál bekövetkeztéig tartó időszakot tekintettük. A túlélés, illetve a tricellulin expresszió és egyéb változók közti összefüggést pancreasvizsgálataink során log-rank, májmintáink esetében Spearman-rank korrelációs tesztel elemeztük. A tricellulin-expresszió mértéke és a teljes túlélés közötti relatív kockázat felméréséhez univariációs Cox-regressziós analízist alkalmaztunk. Elemzéseink során a szignifikancia-határt $p < 0.05$ -ben határoztuk meg. Statisztikai vizsgálatainkat a Statistica 7.0 szoftver (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA) segítségével végeztük el.

3.2.6. Western-blot

Western-blot vizsgálatainkhoz 6-6 kontroll májból, HCC-ből és iCC-ből, illetve 5-5 normál pancreasból és pancreas ductalis adenocarcinomából származó fagyasztott szövetből végeztünk fehérje-izolációt. Ennek során 50-50 mg mintát folyékony nitrogénben porítottunk, majd centrifugálással (13 200 rpm, 4°C, 5 min), illetve lízis-pufferben (20 mM TRIS pH7.5, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% TritonX-100 és proteáz-gátló koktél /Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA/) homogenizáltunk. A minták protein-koncentrációját Bredford-fehérje assay segítségével határoztuk meg, majd gélelektroforézist végeztünk mintánként 30 µg mennyiségű lizátummal 10% SDS-

poliakrilamid gélen, 200 V feszültséggel 35 percen keresztül. Ezt követően a fehérjemintákat 100 V feszültség mellett 75 percen keresztül, 4°C-on nitrocellulóz membránra blottoltuk. A folyamat ellenőrzéséhez Ponceau-S vörös festést alkalmaztunk. Az aspecifikus fehérjekötődés kivédésére mintáinkat 5% zsírmentes száraz tejben (Sigma) inkubáltuk szobahőmérsékleten, 30 percig. Mindezek után a nitrocellulóz membránokat TRIS-pufferolt sóban (TBS) hígított primer tricellulin (nyúl poliklonális; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA 1:500) és GAPDH (egér monoklonális; AbDSerotec, Kidlington, UK; 1:5000) antitestekkel inkubáltuk 4°C-on egy éjszakán át. TBS-Tween (0.1% Tween 20) mosás után tormaperoxidáz (HRP)-konjugált másodlagos ellenanyagokat alkalmaztunk (nyúl- és egérelles antitestek; Dako, Glostrup, Dánia) 1:2000 TBS-hígításban 2 órán keresztül, szobahőmérsékleten.

A folyamat végén az elkészült membránokat kemilumineszcens oldattal inkubáltuk (BioRad, Hercules, CA, USA), majd az immunreakciókat Kodak géldokumentációs rendszer (Kodak, Rochester, NY, USA) segítségével elemeztük.

3.2.7. RT-PCR

RNS-izolálás

mRNS-szintű vizsgálatainkhoz 5 formalin-fixált, paraffinba ágyazott normál hasnyálmirigyszövetet, 10 grade 1, 11 grade 2 és 9 grade 3 pancreas ductalis adenocarcinomát választottunk ki.

Az RNeasy FFPE Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) segítségével teljes RNS-t izoláltunk öt-öt 5-10 µm vastagságú, nekrosis-, vérzés- és kötőszövetmentes makrodisszekált metszetből. Az izolált RNS mennyiségét NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) spektrofotométer használatával mértük.

RNS reverz transzkripció

A vizsgálatokhoz szükséges DNS-t esetenként 1-1 µg teljes RNS-ből, High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) alkalmazásával állítottuk elő.

Primertervezés

A real time RT-PCR során alkalmazandó gén-specifikus primereket AlleleID 6.01 szoftverrel (Premier Biosoft International, CA, USA) terveztük meg (8. táblázat). Az izoforma-specifititás és a tervezett primerek méretének meghatározásához BioEdit szekvencia-ellenőrző szoftvert (Tom Hall Ibis Therapeutics, Carlsbad, CA, USA) használtunk. A primerek specifitását BiSearch szoftverrel (MTA Enzimológiai Intézet, Budapest, Magyarország) ellenőriztük. Vizsgálataink során a primerspecifikus amplifikációs hőmérsékletet (58°C) gradiens-PCR segítségével optimalizáltuk.

8. táblázat. Real time RT-PCR során alkalmazott primerek szekvenciája

GÉN	PRIMER-SZEKVENCIA (5'- 3')	TERMÉKHOSSZ (bp)	ANNELLÁCIÓS HŐ (°C)
ABL-ab	ACGAGTCTGGTTGATGCTGTG (s)	105	61
	GGCGGACTGTGGCTTTGG (as)		
Tricellulin	TGGAACAACAGGAGATAAATGAGC (s)	86	61
	GTCTCTTTGTCTGTCACCACTG (as)		

PCR és Real-Time PCR

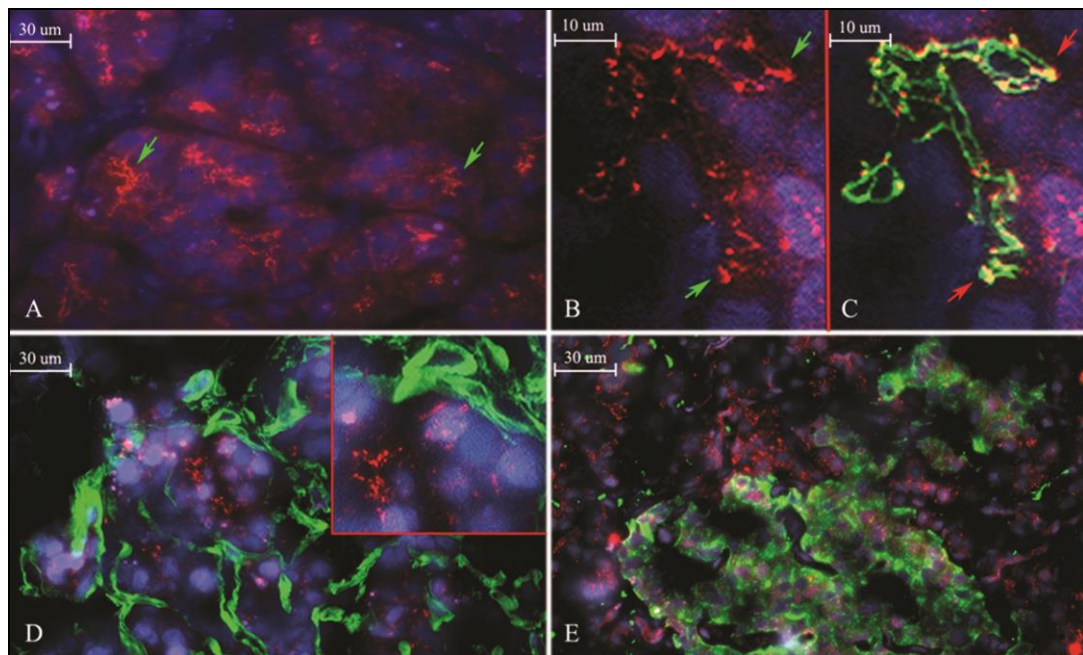
SYBR Green-alapú real-time RT-PCR vizsgálatainkat az ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) segítségével végeztük el a gyártó protokolljának megfelelően. Belső kontroll-génként a konstitutívan expresszáldó ABL-ab gént (Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1) használtuk. Az amplifikációra váró 20 µl reakcióelegy Power SYBR Green PCR Master Mix-et (Applied Biosystems), 10 pM forward és reverz primert és 100 ng cDNS-templátot tartalmazott. Az amplifikáció paraméterei a következők voltak: inkubáció 95°C-on 10 percig; majd 45 cikluson keresztül 95°C-on 15 másodpercig, 60°C-on 1 percig és 72°C-on 15 másodpercig. Az olvadáspont-analízis során 20 másodpercen át 95°C-os melegítést, 10 másodpercen keresztül 45°C-on végzett hűtést, majd 95°C-ra való újramelegítést végeztünk. A primer-specifikus amplifikációt 2% agaróz gélelektroforézissel és olvadáspont-analízissel ellenőriztük.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Immunfluoreszcencia

4.1.1. *Pancreas immunfluoreszcens vizsgálatok*

Normál hasnyálmirigyszövet elemzésekor a vizsgált fehérje a ductus- és acinussejtek apicalis pólusához közeli tricelluláris találkozási pontoknak megfelelően pontszerűen helyezkedett el (16. A kép), míg lineáris membránpozitivitást mutatott a bicelluláris junctiók területén (16. B és C kép). Az endocrin pancreasban tricellulin pozitivitást nem észleltünk. A tricellulin és occludin kettős jelölése során a két fehérje együttes elhelyezkedését detektáltuk a ductus- és acinussejtek apicalis membránjában, melyet az 16.B és 16.C kép illusztrál; a pontszerűen megjelenő sárga szín a tricellulin (piros) és occludin (zöld) kolokalizációját jelzi (16. ábra).



16. ábra. Immunfluoreszcens eredményeink normál pancreasban

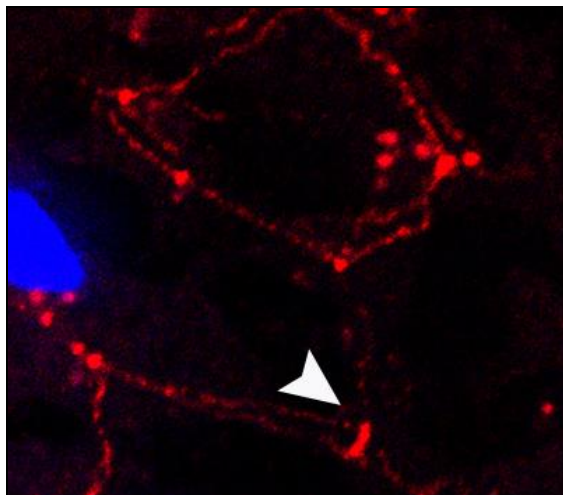
A, Tricellulin (TRIC) expresszió az acinussejtek luminális részén (zöld nyilak; 630x); **B-C**, TRIC (piros) és occludin (zöld) kolokalizációban (sárga) normál pancreas acinussejtjeinek apicalis felszínén (zöld és piros nyilak; 1200x); **D**, Az anti-TRIC (piros) és anti-kollagén IV (zöld) antitestek is megerősítik a TRIC apicalis elhelyezkedését (630x; inset, 1000x); **E**, Anti-TRIC (piros) és anti-synaptophysin (zöld) kettős jelölés alapján a Langerhans-szigetek területén nem észlelhető kolokalizáció (L; 400x). Korompay

A, Borka K, Lotz G et al. Tricellulin expression in normal and neoplastic human pancreas. Histopathology, 2012.

4.2.1. Máj immunfluoreszcens vizsgálatok

Az immunfluoreszcens mikroszkópia révén – a hasnyálmirigy vizsgálata során észleltekhöz hasonlóan – a tricellulin feltűnő, pontszerű halmozódását tapasztaltuk a tricelluláris találkozási pontokban (17. ábra, nyílhegy), míg a két sejt között kialakult junctioknak megfelelően lineáris membránpozitivitást észleltünk.

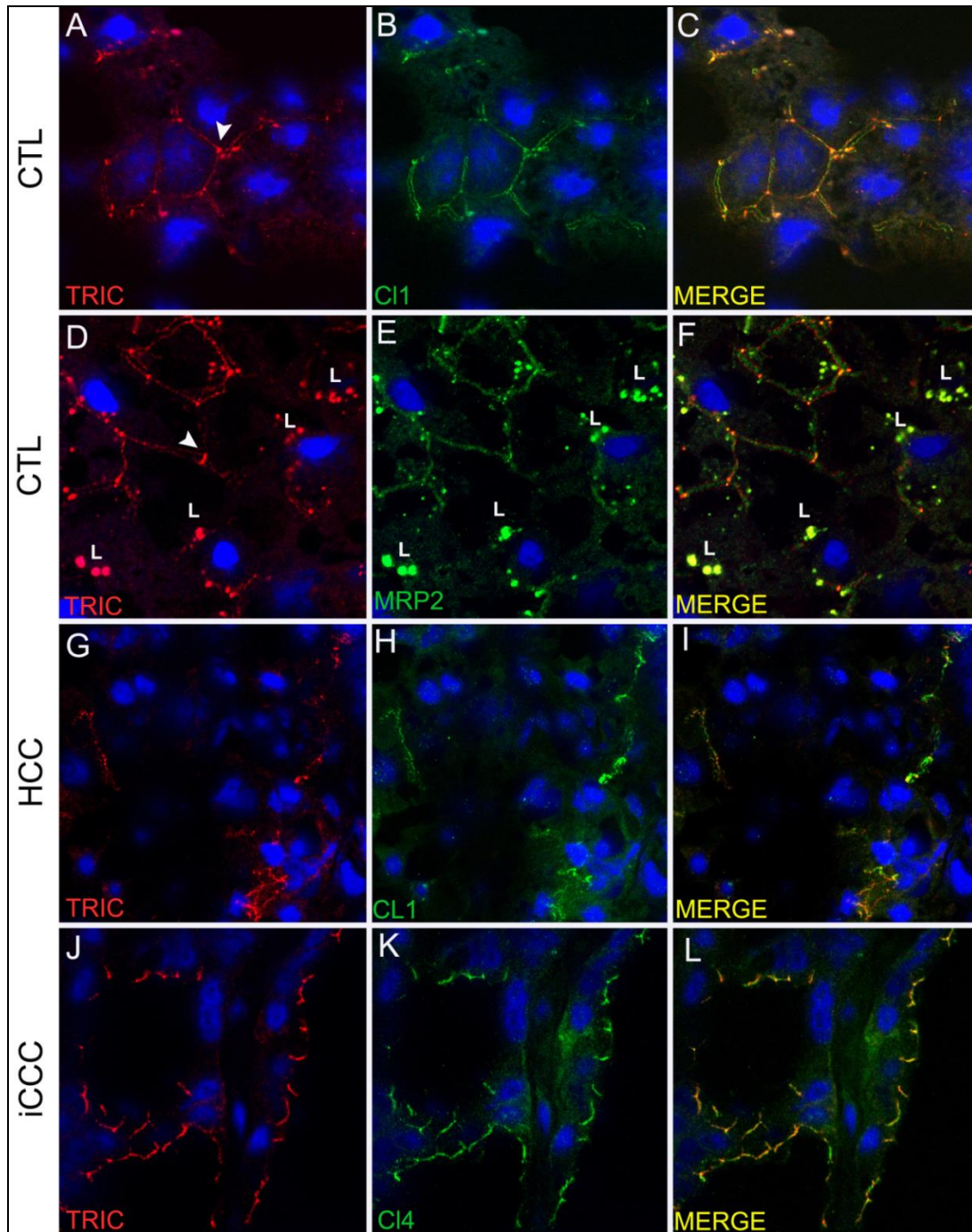
Az általunk vizsgált normál májszövetekben a tricellulin heterogén expresszióját észleltük. Túlnyomórészt gyenge immunpozitivitás mellett mintáink egy részében kifejezetten erős reakció volt megfigyelhető. A vizsgált ellenanyagok mind a hepatocyták, mind pedig az epeúti hámsejtek felületén kimutathatóak voltak. Kettős immunfluoreszcens vizsgálataink során tricellulin-CLDN-1 (18. ábra A, B, C) és tricellulin-MRP2 (18. ábra D, E, F) kolokalizációt észleltünk normál májban, megerősítve ezzel a tricellulin elhelyezkedését a hepatocitákban és a primer epeúti sejtekben. Hepatocellularis carcinomákban TRIC-CLDN-1 kolokalizációt azonosítottuk (18. ábra G, H, I), intrahepaticus cholangiocarcinomákban pedig TRIC-CLDN-4 kettős jelölődést detektáltunk (18. ábra J, K, L). A fibrolamellaris hepatocellularis carcinomák esetében szintén két sejt között lineáris, három sejt között pedig pontszerű tricellulin-expressziót észleltünk (19. ábra A és B).



17. ábra. Tricellulin immunfluoreszcencia ép humán májban

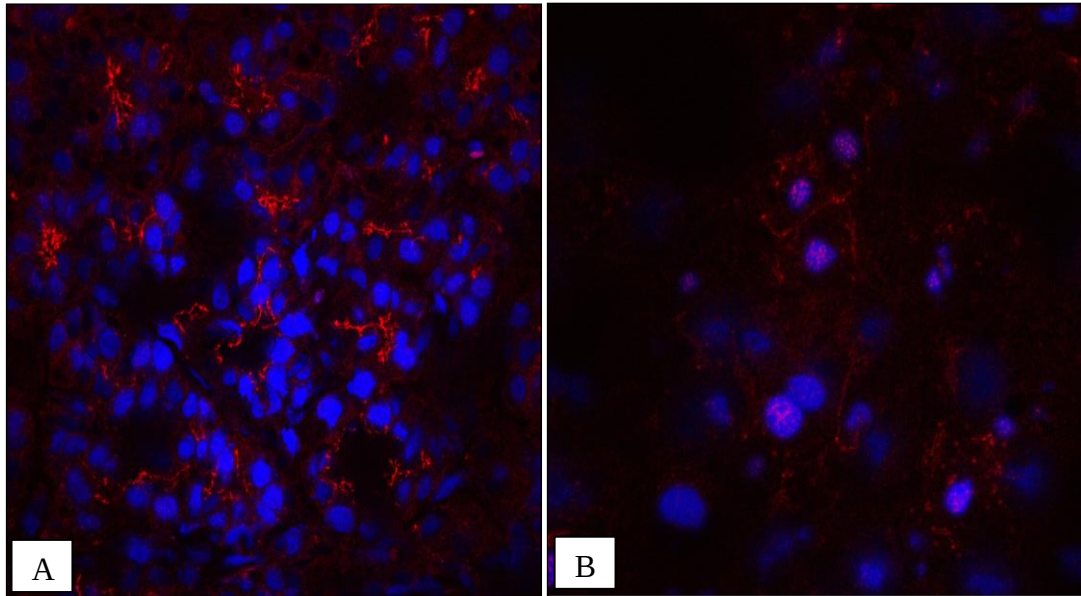
Jól látható a fehérje részben pontszerű, részben lineáris membránpozitivitása. A nyílhegynek megfelelően, három sejt találkozásánál pontszerű halmozódás észlelhető, míg a tricellulin két hepatocyta összefekvő felszínén lineárisan helyezkedik el (630x, kinagyított kép). Somorác A, Korompay A, Törzsök P et al. Tricellulin expression and its prognostic significance in primary liver carcinomas.

Pathol Oncol Res., 2014.



18. ábra. Tricellulin kolokalizációja májban CLDN-1, CLDN-4, és MRP2 fehérjékkel

Normál májban a tricellulin túlnyomórészt három sejt találkozási pontjában helyezkedik el (nyílhegy A és D; 630x), azonban lineárisan megfigyelhető a bicellularis junctióknak megfelelően is (A, D; 630x). Míg CLDN-1 fehérjével mind ép májban (A-C; 630x), mind HCC-ben (G-I; 630x) kolokalizációt mutat, ez MRP2-vel csak normál májban észlelhető (D-F; 630x). A képen látható 'L'-jelölés erős aspecifikus autofluoreszcenciát jelez (D-F; 630x). A tricellulin iCC-ban kolokalizál CLDN-4 fehérjével (J-L; 630x). CTL: kontroll máj; CL1: claudin-1; CL4: claudin-4; MRP2: multidrug resistance protein 2; TRIC: tricellulin. Somorácz A, Korompay A, Törzsök P et al. Tricellulin expression and its prognostic significance in primary liver carcinomas. *Pathol Oncol Res.*, 2014.



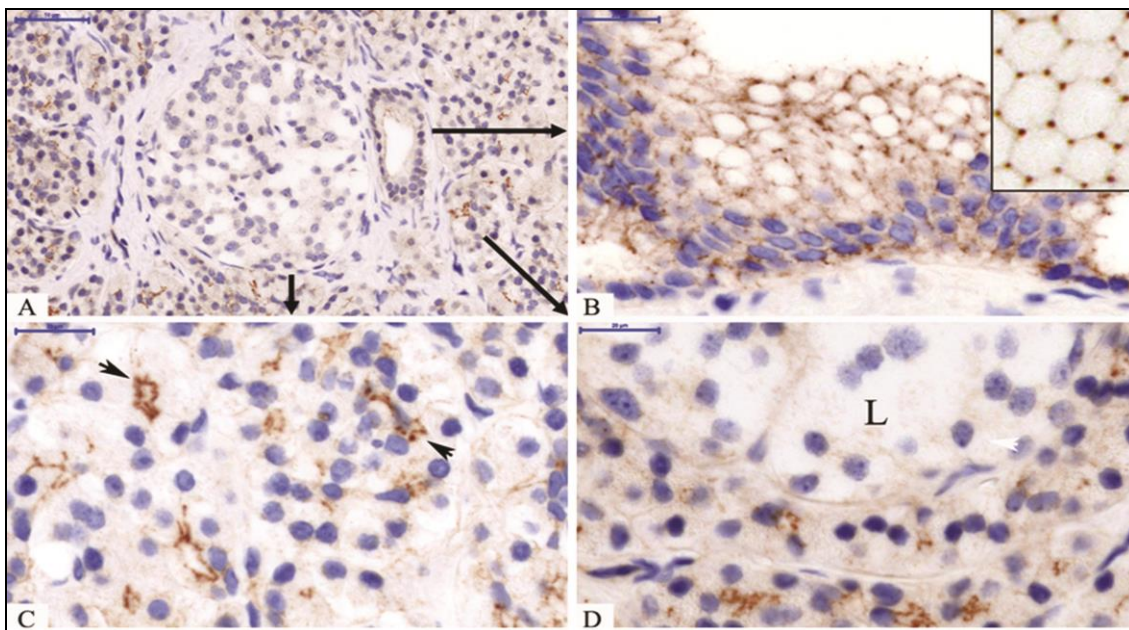
19. ábra. Tricellulin immunfluoreszcencia HCC-ban (A, 630x) és FLHCC-ban (B, 1200x) Bicellularisan linearis, három sejt között pontszerű lokalizáció. Patonai A, Erdélyi-Belle B, Korompay A et al. Claudins and tricellulin in fibrolamellar hepatocellular carcinoma. *Virchows Arch.*, 2011.

4.2. Immunhisztokémiai reakciók

4.2.1. *Pancreas és pancreasdaganatok vizsgálata*

4.2.1.1. Normál hasnyálmirigy

Immunhisztokémiai vizsgálataink során egyértelmű tricellulin-expressziót észleltünk az exocrin pancreas minden alkotóelemében; így az acinussejtekben, a ductulusokban és a nagyobb ductusokban is (20. ábra, B-C). A vizsgált fehérje minden sejtípusban a hámsejtek luminális pólusához közel helyezkedett el. Intenzív, pontszerű membránpozitivitást észleltünk a tricelluláris junctióknak megfelelően, míg gyengébb, lineáris jeleket azonosítottunk a két sejt közötti, bicelluláris junctiókat alkotó területeken. Az általunk vizsgált endocrin pancreasterületek egyike sem mutatott tricellulin-pozitivitást (20. ábra, D).

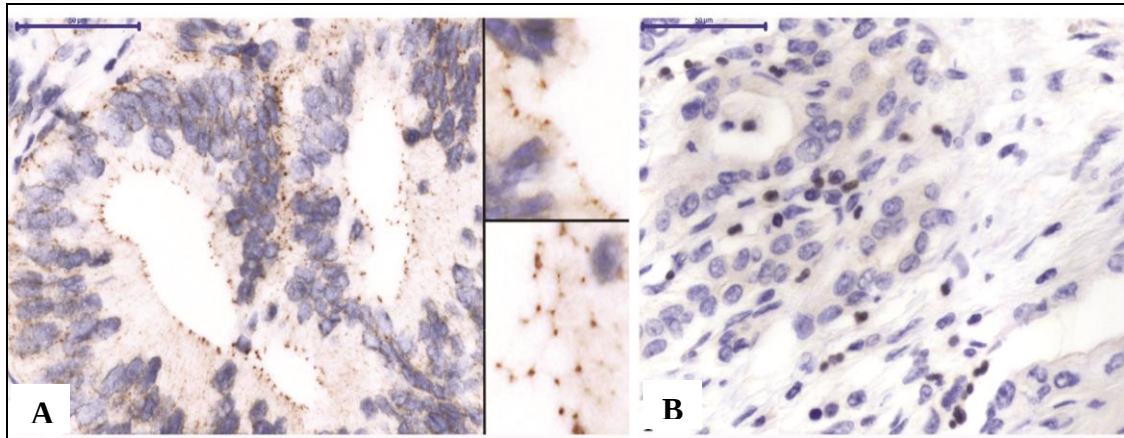


20. ábra. Tricellulin immunhisztokémiai reakciók normál pancreasban

A, Humán pancreas exocrin és endocrin részei (200x; a nyilak a nagyobb nagyítású képekre mutatnak; skála: 50 μ m); **B**, Erős pontszerű és mérsékelt lineáris membránpozitivitás a ductussejtek apicalis pólusán (600x; inset, 1000x; skála: 20 μ m); **C**, Intenzív jelölődés az acinussejtek luminális pólusán (600x; skála: 20 μ m); **D**, A Langerhans-szigetek (L) TRIC-negatívak (600x; skála: 20 μ m). Korompay A, Borka K, Lotz G et al. Tricellulin expression in normal and neoplastic human pancreas. Histopathology, 2012.

4.2.1.2. Pancreas ductalis adenocarcinomák

Hasonlóan a normál hasnyálmirigy ductussejtjeiben észleltekhöz, az általunk vizsgált 12 grade 1 differenciáltságú ductalis adenocarcinomában a tricellulin a daganatsejtek luminális membránjának megfelelően pontszerű elhelyezkedésben volt azonosítható (átlagérték 1.6015) (21. ábra, A). Az ép pancreashoz képest a jól differenciált daganatokban lényegesen kevésbé volt észlelhető lineáris immunpozitivitás. Vizsgálataink során a daganatok dedifferenciációjával párhuzamosan a tricellulin expressziójának kifejezett csökkenését tapasztaltuk. A tricellulin expressziója a vizsgált grade 2 tumorok körében szignifikánsan csökkent mind a normál pancreasban, mind pedig a grade 1 daganatokban észleltekhöz képest (átlagérték 1.1486; $p < 0.01$). A rosszul differenciált, grade 3 adenocarcinomák szignifikánsan kevésbé expresszálták a tricellulint a normál hasnyálmirigyszövetekhez, a jól differenciált, grade 1 daganatokhoz és a grade 2, közepesen kiérett tumorokhoz képest is (átlagérték 0.5196; $p < 0.01$) (21. ábra, B).

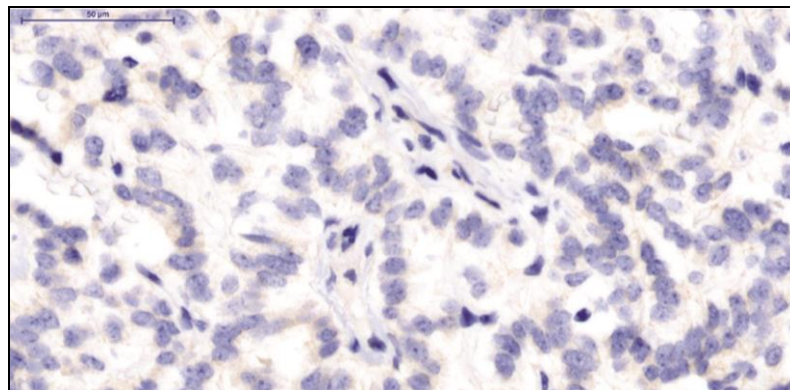


21. ábra. Tricellulin expresszió pancreas ductalis adenocarcinomákban

A, A jól differenciált, grade 1 daganatokban a daganatsejtek tricelluláris találkozási pontjainak megfelelően erős, pontszerű immunpozitivitás észlelhető (600x; inset, 1000x; skála: 30 µm); **B**, A kevésbé differenciált, grade 3 ductalis adenocarcinomák szignifikánsan kevésbé mutattak tricellulin immunpozitivitást (600x; skála: 30 µm). Korompay A, Borka K, Lotz G et al. Tricellulin expression in normal and neoplastic human pancreas. Histopathology, 2012.

4.2.1.3. Pancreas endocrin tumorok

Az általunk vizsgált 15 hasnyálmirigy neuroendocrin daganatok, függetlenül differenciáltságuk mértékétől – hasonlóan az immunfluoreszcens mikroszkópia során észleltekhöz –, nem mutattak tricellulin immunpozitivitást (22. ábra).

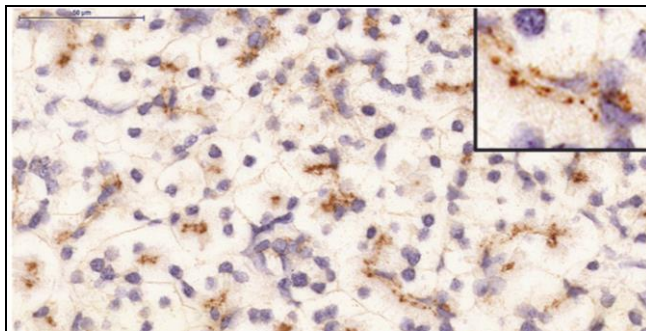


22. ábra. Tricellulin vizsgálata endocrin pancreasdaganatokban

A tricellulin fehérje hasnyálmirigy endocrin tumoraiban nem expresszálódik. (600x; skála: 30 µm). Korompay A, Borka K, Lotz G et al. Tricellulin expression in normal and neoplastic human pancreas. Histopathology, 2012.

4.2.1.4. Acinussejtes carcinoma

A hasnyálmirigy acinussejtes daganataiban kifejezett, pontszerű immunreakciót észleltünk az abortív mirigyszerű struktúrákat képező tumorsejtek apicalis pólusának megfelelően (23. ábra).



23. ábra. Acinussejtes carcinoma tricellulin expressziója

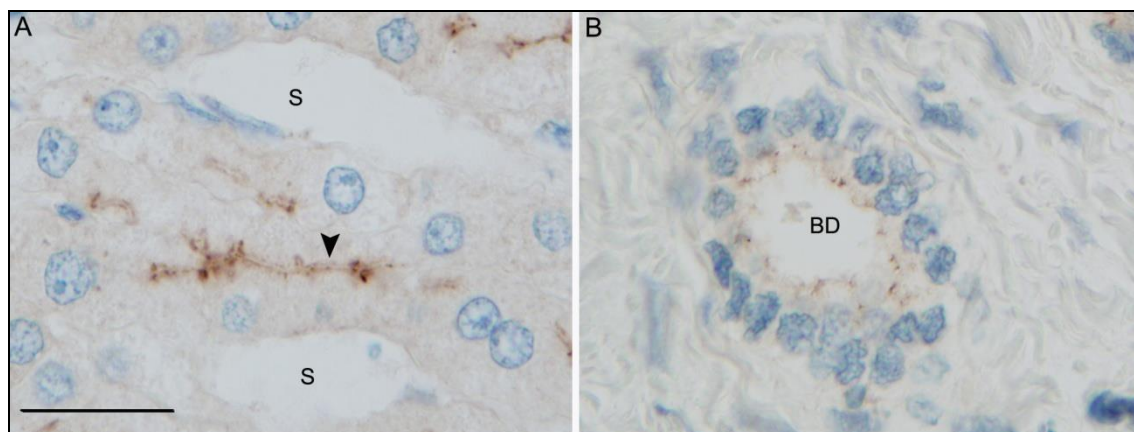
Kifejezett immunpozitivitás a daganat abortív acinussejtjeinek luminális pólusa mentén (600x; inset, 1000x ; skála: 30 μm).

Korompay A, Borka K, Lotz G et al. Tricellulin expression in normal and neoplastic human pancreas. Histopathology, 2012.

4.2.2. Máj és májdaganatok vizsgálata

4.2.1.1. Tricellulin expresszió normál májban

Hasonlóan az immunfluoreszcens vizsgálatok eredményeihez, az elvégzett immunhisztokémiai reakciók alapján is heterogén tricellulin-pozitivitást figyeltünk meg. A normál májszövet egyes területein gyengébb, másutt kifejezettebb antigén-antitest reakció volt észlelhető. A tricelluláris junctióknak megfelelően pontszerű, míg a bicelluláris sejtkapcsoló struktúrákat jelző, két hámsejt közötti membránok mentén lineáris pozitivitást tapasztaltunk májsejtekben, cholangiocytákban és a nagyobb epevezetékekben egyaránt (24. ábra).



24. ábra. Tricellulin expresszió normál májszövetben

A tricellulin jól láthatóan a hepatocyták mellett az epeutak elsődleges pólusa mentén is azonosítható (A,B; 600x, skála: 20um). S: sinusoid; BD: epevezeték (bile duct). Somorácz A, Korompay A, Törzsök P et al. Tricellulin expression and its prognostic significance in primary liver carcinomas. *Pathol Oncol Res.*, 2014.

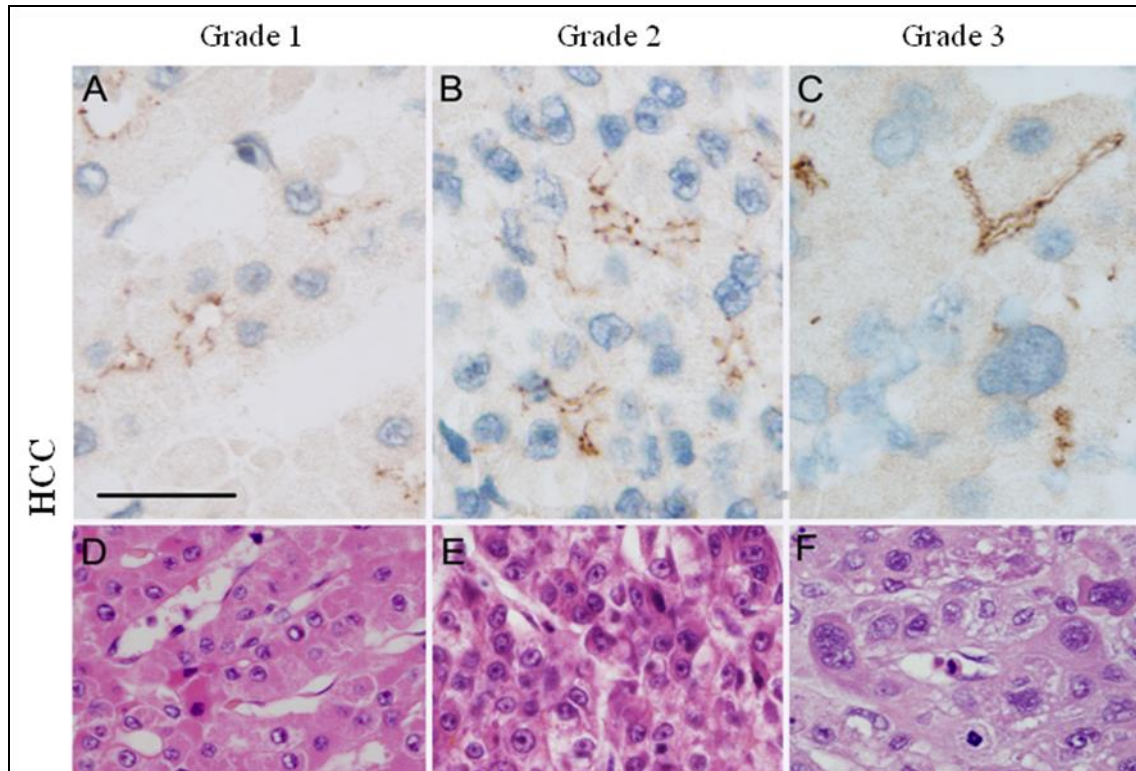
4.2.1.2. Tricellulin expresszió vizsgálata cirrhotikus májban

Az általunk vizsgált 12, makro- és mikronoduláris cirrhotikus májszövet tricellulin-expressziós mintázatát tekintve igen hasonló eredményt kaptunk a normál májszövetekben tapasztaltakhoz képest. A göbök parenchymájában pontszerű és lineáris immunpozitivitást is azonosítottunk. A megvastagodott falú kis- és közepes méretű biliáris vezetékben túlnyomórészt pontszerű tricellulin-jelölődést detektáltunk. Vizsgálataink során nem észleltünk összefüggést a fehérje-expresszió mértéke és a cirrhosis súlyossága között.

4.2.1.3. Tricellulin expresszió vizsgálata hepatocelluláris carcinomákban

Tricellulin-immunhisztokémiai vizsgálataink eredménye a hepatocelluláris carcinomákban (HCC) igen széles határok között mozgott. Néhány HCC tricellulin-negatívnak bizonyult, míg mások esetében kifejezett overexpressziót észleltünk. A jól és közepesen differenciált daganatok pszeudoglanduláris struktúrájában a normál epeúti hámiban észleltékhez hasonló tricellulin-expressziót figyeltünk meg a daganatsejtek apicalis pólusához közel; azaz három sejt között pontszerű (25. ábra, A), a bicelluláris kapcsolódási pontoknak megfelelően pedig lineáris membránpozitivitást (25. ábra, B)

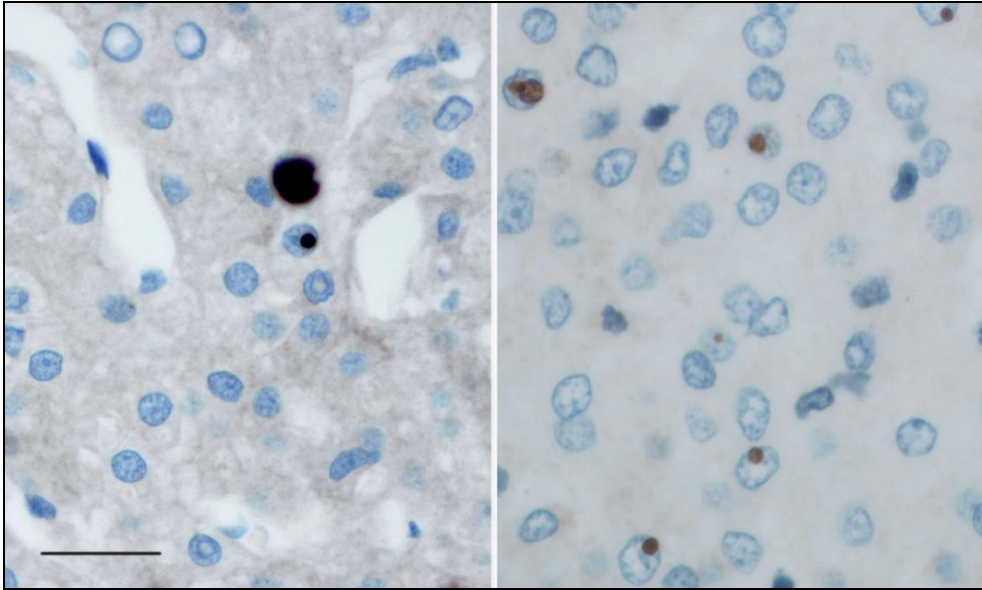
azonosítottunk. A rendezetlen szerkezetű, trabekulákat és sejtfészkeket alkotó daganatsejtek között is lineáris immunreakciót észleltünk. Néhány rosszul differenciált, grade 3 daganat esetében erős immunpozitivitást tapasztaltunk (25. ábra, C).



25. ábra. Tricellulin expresszió HCC-ban

A jól differenciált HCC-k pszeudoglanduláris struktúrájában a normál epeúti hámphoz hasonló tricellulin expressziót észleltünk (A, 1000x; skála 25 μ m). A HCC-k trabekuláris részében lineáris és pontszerű immunpozitivitást detektáltunk (B, 1000x). Néhány dedifferenciált daganatban is megfigyeltünk tricellulin-expressziót (C, 1000x). A különböző grádusú HCC-k HE festett metszetei (D, E, F 600x). Somorácz A, Korompay A, Törzsök P et al. Tricellulin expression and its prognostic significance in primary liver carcinomas. *Pathol Oncol Res.*, 2014.

Érdekes, hogy a vizsgált HCC-k közül hat esetben a daganatsejtek igen kis hányadában (1–2%) a membranózus immunreakciók mellett magi pozitivitás is jelen volt. A hat, nukleáris lokalizációban is tricellulin-pozitivitást mutató HCC közül 5 esetében igen gyenge membranózus jel volt detektálható (26. ábra).

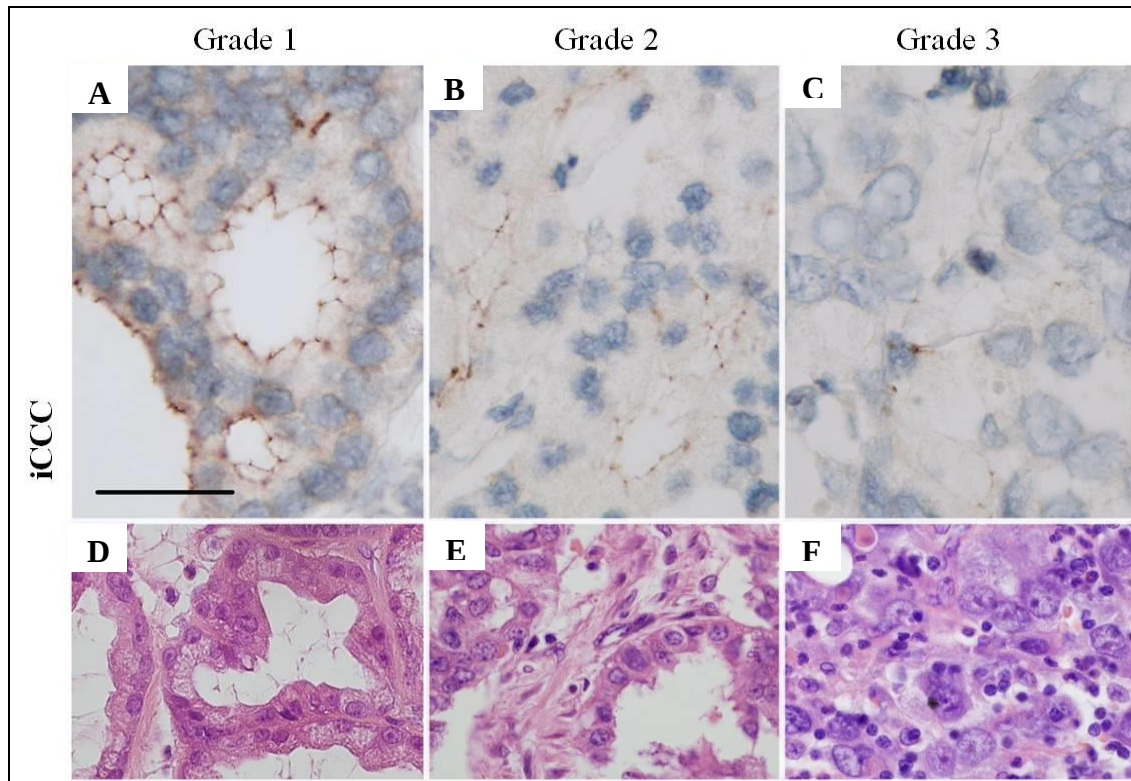


26. ábra. Magi tricellulin-pozitivitás HCC-ban

Magi pozitivitás a hepatocelluláris daganatsejtek 1–2%-ában, melyek mellett túlnyomórészt igen gyenge membránpozitivitás észlelhető (600x, skála: 25 μ m). Somorác A, Korompay A, Törzsök P et al. Tricellulin expression and its prognostic significance in primary liver carcinomas. *Pathol Oncol Res.*, 2014.

4.2.1.4. Tricellulin vizsgálata intrahepatikus cholangiocarcinomákban

A cholangiocarcinomákat vizsgálva a tricellulin expressziójának egyértelmű csökkenését azonosítottuk a daganatok dedifferenciálódásával párhuzamosan. A grade 3 tumorok gyenge immunpozitivitást mutattak, míg a jól differenciált daganatok glanduláris részében a normál epeutakban észleltekhöz hasonló, erőteljes, pontszerű tricellulin (27. ábra, A) pozitivitást tapasztaltunk. A HCC-k mirigyeket nem képző típusaiban igen gyenge jelet vagy a fehérje hiányát észleltük (27. ábra, C).



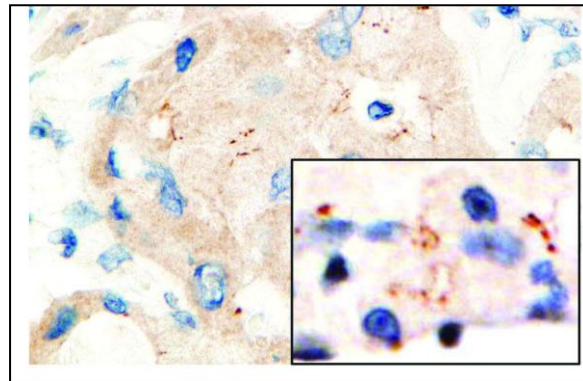
27. ábra. Tricellulin expresszió iCC-ban

A jól differenciált daganatokban diffúz, erős immunpozitivitás látható (A, 1000x; skála 25 μ m). A grade 2 tumorok esetében a vizsgált fehérje mennyisége mérséklődött (B, 1000x;), míg elenyésző intenzitású tricellulin expresszió vagy a fehérje hiánya volt azonosítható a rosszul differenciált tumorokban (C, 1000x) és iCC-csoportban (D, E, F; 600x). A különböző grádusú iCC-k HE-festett metszetei (D, E, F). Somorácz A, Korompay A, Törzsök P et al. Tricellulin expression and its prognostic significance in primary liver carcinomas. *Pathol Oncol Res.*, 2014.

4.2.1.5. Tricellulin vizsgálata fibrolamelláris hepatocelluláris carcinomákban

A klasszikus HCC-csoporthoz hasonlóan a daganatfészkeket alkotó tumorsejtek apicalis pólusán döntően lineáris membránpozitivitást észleltünk (28. ábra). Első, FLHCC-val kapcsolatos vizsgálatunk során a normál májszövetben szignifikánsan magasabb TRIC-protein expressziót észleltünk, mint az iCC-k, a HCC-k, vagy a FLHCC-k esetében; az iCC-k pedig szignifikánsan kevésbé termelték a vizsgált fehérjét a konvencionális HCC-csoporthoz képest. Kutatásunk folytatása során nagyobb esetszámon is megismételtük a reakciókat, újabb vizsgálatunk alapján nem tapasztaltunk szignifikáns különbségeket a normál és a daganatos minták TRIC-expressziója között (ez feltehetően a bővített esetszámból adódó pontosabb statisztikai eredményből fakad). Az iCC-

csoportban a daganatok dedifferenciációjával a TRIC-fehérje expressziója szignifikánsan csökkent, hasonlóan a pancreas ductalis adenocarcinomáihoz.



28. ábra. Tricellulin (TRIC) immunhisztokémiai reakció FLHCC-ban

A pseudoglandularis szerkezetnek megfelelően, illetve a tumorsejtek mentén pontszerű pozitívitas detektálható (600x, inset 1200x).

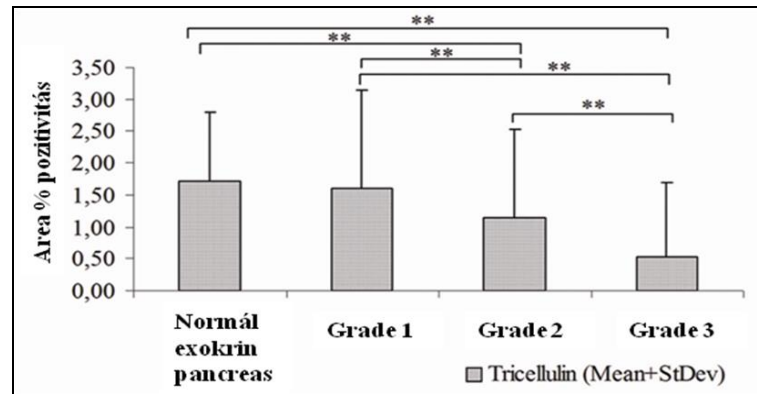
Patonai A, Erdélyi-Belle B, Korompay A et al. Claudins and tricellulin in fibrolamellar hepatocellular carcinoma.

Virchows Arch., 2011.

4.3. Statisztikai eredmények

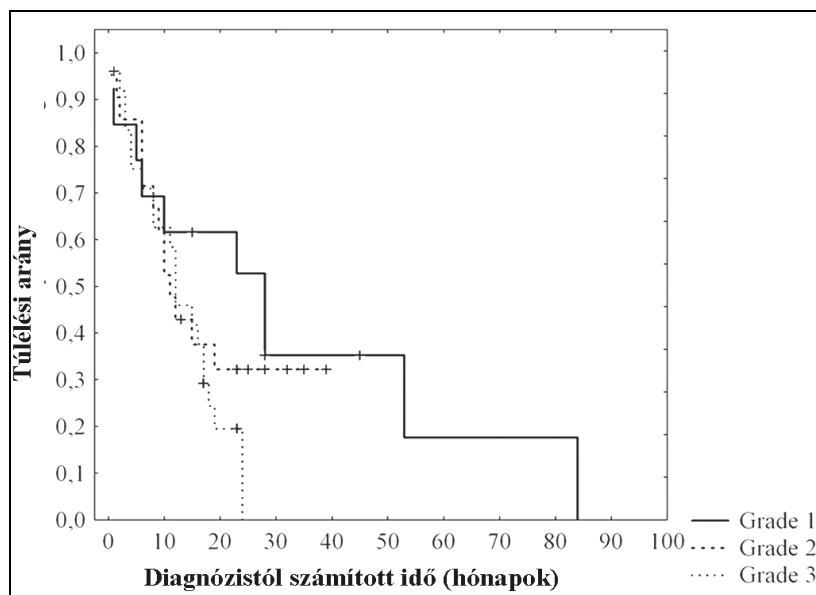
4.3.1. *Pancreas irányú vizsgálatok*

Az elvégzett digitális morfometria alapján a tricellulin fehérje expressziójának szignifikáns csökkenését észleltük a közepesen differenciált, grade 2 ductalis adenocarcinomákban mind a normál, mind a jól differenciált, grade 1 daganatokhoz képest. Ehhez hasonlóan, szignifikáns expressziós különbséget tapasztaltunk a grade 3, rosszul differenciált daganatcsoportban a normál pancreas, a grade 1 és a grade 2 adenocarcinomákhoz képest; a rosszul differenciált tumorokban észlelt igen gyenge tricellulin expresszió statisztikai elemzéseink során is szembetűnő volt (29. ábra). Túlélési vizsgálatainkhoz log-rank analízist végeztünk, mely szignifikáns összefüggést mutatott a ductalis adenocarcinomák differenciáltsága és a betegség túlélése között ($p=0.02$); a tricellulin expresszió és a tumor kiérettiségének foka között észlelt szignifikáns összefüggések alapján pedig a vizsgált fehérje expressziója és a túlélés mértéke között indirekt korreláció valószínűsíthető (30. ábra).



29. ábra. A tricellulin immunreakciók morfolometriai elemzése grade 1, grade 2 és grade 3 hasnyálmirigy ductalis adenocarcinómában és normál exocrin pancreasban

Szignifikáns korreláció: ** = $p < 0.01$. Korompay A, Borka K, Lotz G et al. Tricellulin expression in normal and neoplastic human pancreas. Histopathology, 2012.

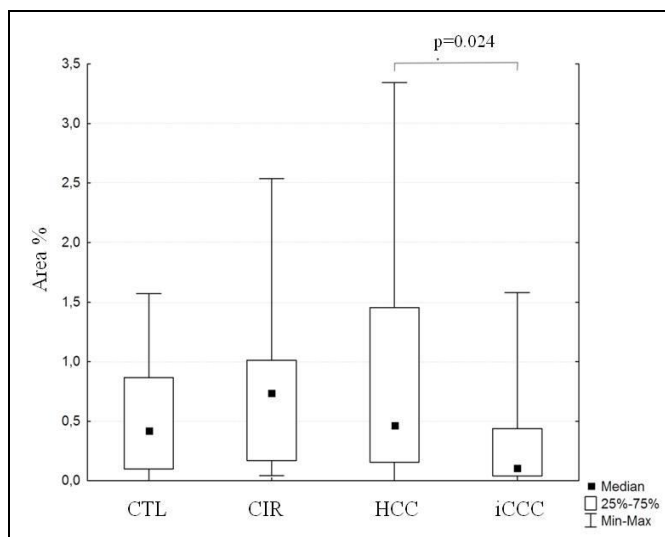


30. ábra. Hasnyálmirigy ductalis adenocarcinómában szenvedő betegek túlélésének összefüggése Kaplan–Meier görbe alapján

A daganat differenciáltsága és a túlélési adatok között szignifikáns korrelációt észleltünk ($p=0.02$). Korompay A, Borka K, Lotz G et al. Tricellulin expression in normal and neoplastic human pancreas. Histopathology, 2012.

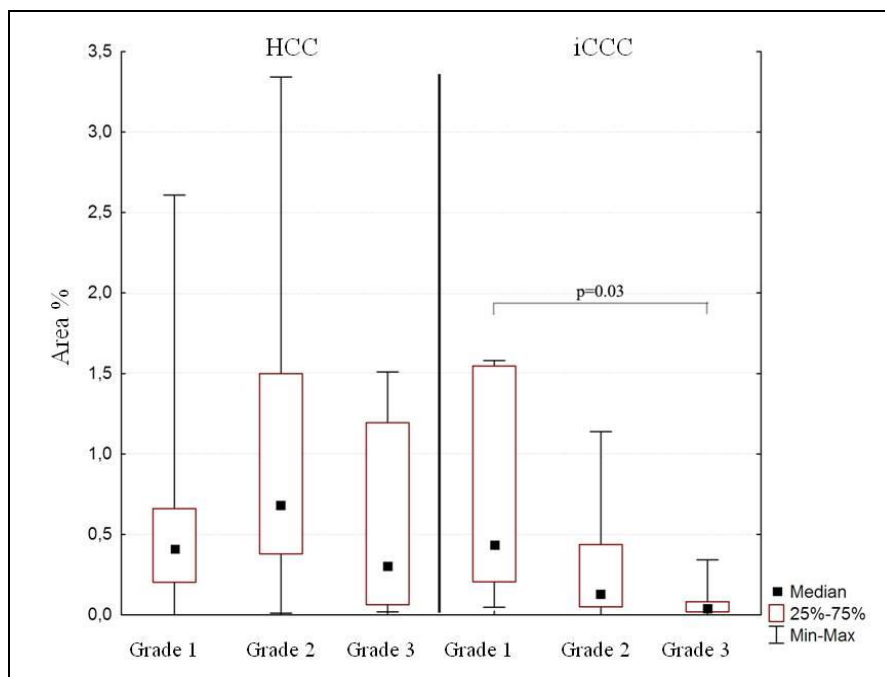
4.3.2. Májjal kapcsolatos vizsgálatok

Digitális morfometria alapján nem tapasztaltunk szignifikáns tricellulin-expresszióbeli különbséget a normál májszövetben, a cirrhotikus májban és a vizsgált primer májdaganatokban (HCC, iCC; 31. ábra). Érdekes módon a hepatocelluláris carcinomák közel felében a normál májszövet tricellulin-expressziójának kétszeresét mértük, ráadásul néhány HCC-ban kifejezettebb tricellulin-termelődést észleltünk a normál májszövetéhez képest. Hepato- és cholangiocellularis vizsgálataink során sem a daganat differenciáltsága, sem a tumor mérete, sem a betegek életkora között nem tapasztaltunk összefüggést. Részben eltérő eredményeket kaptunk az intrahepatikus cholangiocarcinomák elemzésekor: ebben a vizsgálati csoportban a HCC-hoz képest szignifikánsan csökkent tricellulin expressziót detektáltunk. Ellentétben a hepatocelluláris carcinomákban azonosítottakkal, a tricellulin expressziója az iCC-csoporton belül, a tumor differenciáltságával is szignifikáns összefüggést mutatott: a grade 3, rosszul differenciált daganatok tricellulin expressziója kifejezetten csökkent a grade 1, jól differenciált tumorokban észlelt fehérjemennyiséghez képest ($p < 0,05$; 32. ábra).



31. ábra. Tricellulin immunhisztokémiai vizsgálataink morfometriai elemzése kontroll májszövetben, cirrhotikus májban, HCC-ban és iCC-ban

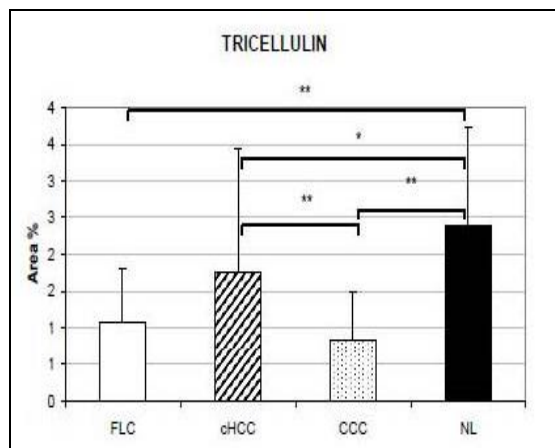
Az általunk vizsgált csoportok esetében a tricellulin fehérje expresszióját tekintve nem tapasztaltunk szignifikáns különbségeket (Mann-Whitney U-teszt). CTL: kontroll máj; CIR: cirrhosis; HCC: hepatocelluláris carcinoma; iCC: intrahepatikus cholangiocellularis carcinoma. Somorácz A, Korompay A, Törzsök P et al. Tricellulin expression and its prognostic significance in primary liver carcinomas. *Pathol Oncol Res.*, 2014.



32. ábra. Tricellulin expresszió morfometriai elemzése különböző differenciáltságú hepatocellularis és intrahepatikus cholangiocarcinomában

Az eltérő differenciáltságú HCC-csoportok tricellulin expressziójában az elvégzett Mann-Whitney U-teszt alapján nem észlelhető jelentős különbség, míg a rosszul differenciált cholangiocarcinomák esetében a vizsgált fehérje szignifikáns csökkenését tapasztaltuk a grade 1 csoportban észleltekhöz képest. Somorácz A, Korompay A, Törzsök P et al. Tricellulin expression and its prognostic significance in primary liver carcinomas. Pathol Oncol Res., 2014.

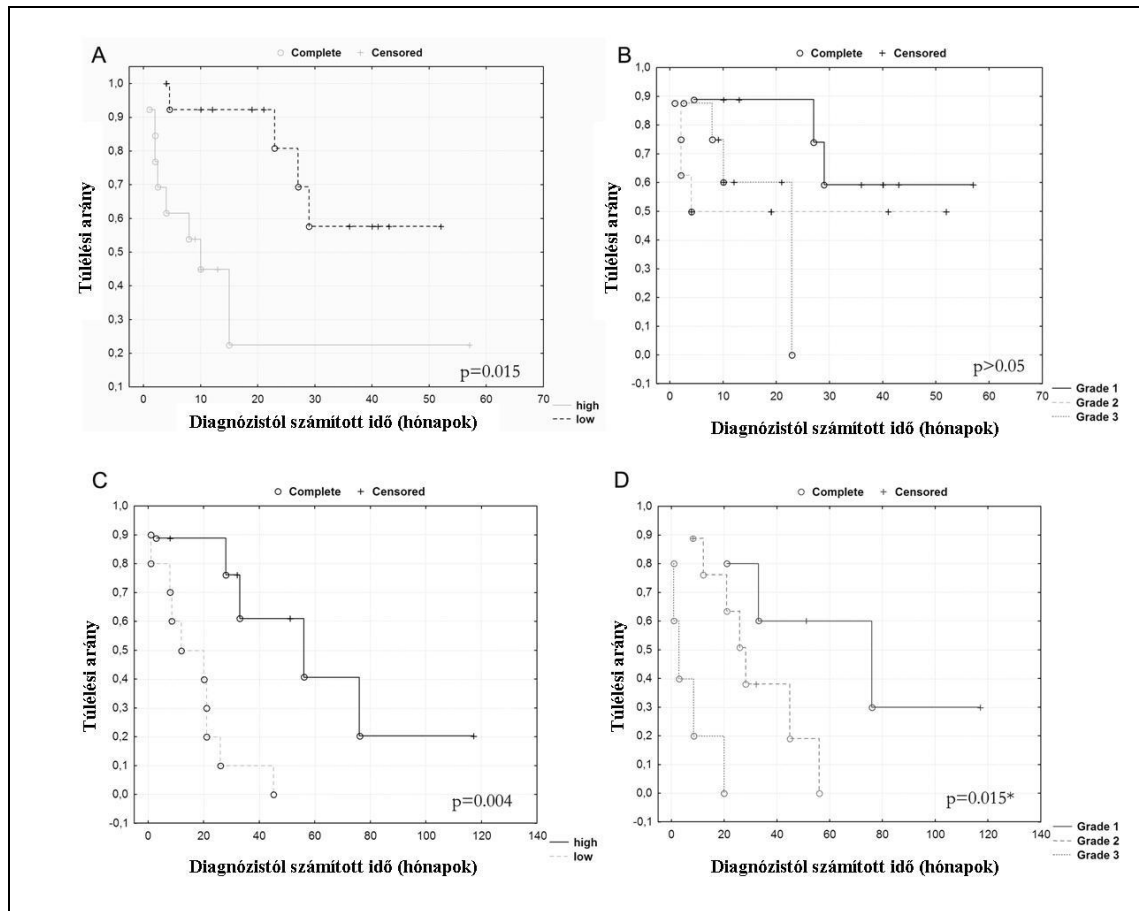
Munkacsoportunk FLHCC-vel kapcsolatos kutatási eredményei szerint a normál májban észlelt TRIC-expresszió szignifikánsan magasabb volt mind a cholangiocarcinoma-csoportban észleltekhöz, mind pedig a hepatocellularis daganatok, illetve a vizsgált FLHCC-k során kapott értékekhez képest; a daganatos minták körében pedig a konvencionális HCC-csoportban a TRIC-fehérje szignifikánsan erőteljesebben termelődött a CC-csoportban detektáltakhoz képest (33. ábra). A korábban már részletezett, ép és malignusan transzformált májszövet TRIC-expressziós mintázatára irányuló vizsgálatunk, illetve az ezen munka során felmerült diszkrepancia vélhetően a kis esetszámból adódik; pontosításához további vizsgálatok végzése szükséges.



33. ábra. FLHCC, konvencionális HCC, CC és normál májszövet TRIC-expressziójának morfometriai elemzése

Normál májszövetben szignifikánsan magasabb TRIC-kifejeződés észlelhető a FLHCC-, konvencionális HCC- és CC-csoportban észleltekhöz képest. Szignifikanciahatár: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Patonai A, Erdélyi-Belle B, Korompay A et al. Claudins and tricellulin in fibrolamellar hepatocellular carcinoma. Virchows Arch., 2011.

Digitális morfometriai elemzéseink szerint a tricellulin-pozitív területek százalékának átlagértékét véve alapul, a hepato- és cholangiocellularis daganatok 'tricellulin-high' és 'tricellulin-low' profillal rendelkeznek. Az elvégzett Spearman-féle rangkorreláció alapján a daganat differenciáltsága, mérete és a betegek életkora független tényezőnek tekinthető. A májtumorok túlélésének vizsgálatához szintén Kaplan–Meier elemzést alkalmaztunk, mely alapján nem észleltünk összefüggést a tumor kiérettsége, mérete vagy az életkor és a teljes túlélés között, ugyanakkor a tricellulin fehérjét kifejezetten expresszáló HCC-k esetében a túlélési idő szignifikánsan rövidebb volt ($p < 0,05$). Univariációs Cox-regresszió alapján a 'tricellulin-high' – csoport kockázati aránya szintén szignifikánsan magasabb (3,12; CI: 1,35-7,2; $p < 0,01$). Cholangiocarcinomák esetében a 'tricellulin high'-csoport túlélése szignifikánsan jobbnak mutatkozott a 'tricellulin low'-hoz képest ($p < 0,05$). Az epeúti daganatok differenciáltságával csökkenő tricellulin-expresszió szignifikáns különbségeket eredményezett a túlélésben is ($p < 0,05$; 34. ábra).

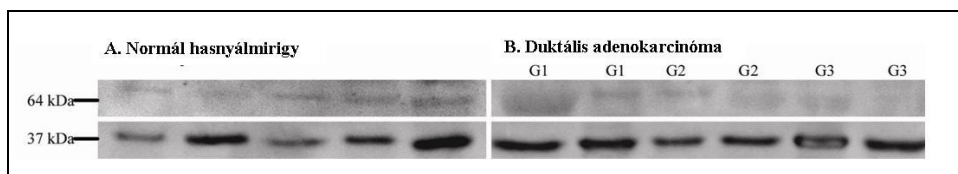


34. ábra. HCC-k és iCC-k túlélésének Kaplan–Meier elemzése

HCC-ban az erőteljes tricellulin expresszió rosszabb prognózissal társult (A), míg a daganatok differenciáltsága nem mutatott összefüggést a túléléssel (B). Intrahepatikus epeúti tumorok esetében a magas tricellulin fehérje-expressziót jellemzően a jól differenciált, grade 1 daganatokban észleltük, mely jobb túlélési mutatókkal korrelált (C); ez tükröződik a tumor grade és túlélések közötti összefüggések vizsgálatakor is (D). Somorácz A, Korompay A, Törzsök P et al. Tricellulin expression and its prognostic significance in primary liver carcinomas. *Pathol Oncol Res.*, 2014.

4.4. Western-blot

Hasnyálmiriggyel kapcsolatos kutatásaink során a tricellulin fehérje jelenlétének megerősítése céljából végzett Western-blot alapján mind normál pancreasban, mind ductalis adenocarcinomákban észleltük jelenlétét. Vizsgálatunk során mindkét szövettípusban 64 kDa közelében detektáltunk fehérjeterméket (35. ábra). Az öt kontroll hasnyálmirigyminta mindegyike esetében mérsékelt intenzitású sávot azonosítottunk (A), míg a tumoros mintákban a grade emelkedésével, azaz a dedifferenciációval parallel kifejezetten csökkenő terméksávokat detektáltunk (B).



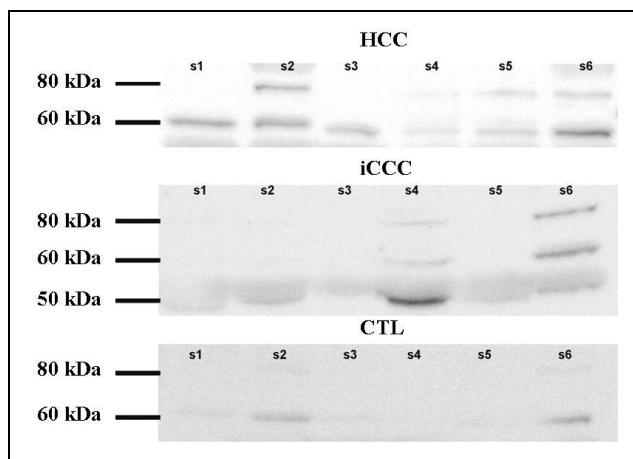
35. ábra. A Western-blot elemzés eredményei hasnyálmirigyszövetekben

A, Közepes erősségű terméksávok a kontroll pancreasban; **B**, A daganatos grade emelkedésével, azaz a differenciáltság csökkenésével párhuzamosan észlelhető csökkenő intenzitású terméksávok. A kontrollfehérjeként alkalmazott GAPDH-t 37 kDa-nál, ismert molsúlyánál detektáltuk; a tricellulin 64 kDa környékén volt kimutatható. Korompay A, Borka K, Lotz G et al.

Tricellulin expression in normal and neoplastic human pancreas. Histopathology, 2012.

Kontroll májmintáink esetében 60 kDa közelében specifikus fehérjetermék megjelenését észleltük.

Hepatocelluláris carcinómákban a vizsgált minták mindegyikében, 60 kDa közelében figyeltünk meg fehérjekötődést; érdekes módon a minták kétharmadában egy nagyobb, 80 kDa környéki termék is megfigyelhető volt. Epeúti tumorokat vizsgálva a minták egyharmadában, jól differenciált daganatokban kimutattuk a fehérjét; hasonlóan a HCC-csoporthoz, a cholangiocarcinómák esetében is észlelhető volt egy nagyobb, 80 kDa körüli fehérjetermék, emellett az epeúti tumorokban 50 kDa közelében is specifikus terméket azonosítottunk (36. ábra).

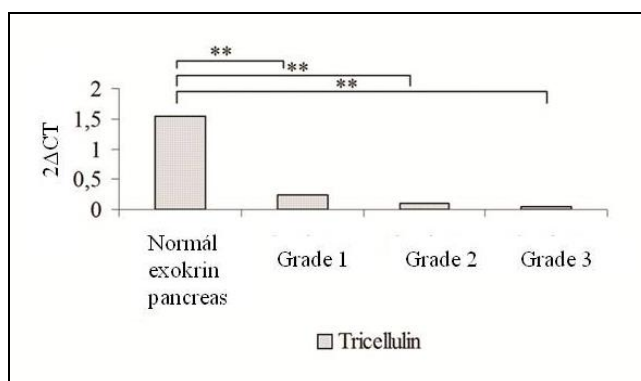


36. ábra. A Western-blot elemzés eredményei májban és primer malignus májtumorokban

Közepes erősségű terméksávok a HCC-csoport mindegyik tagjában 60 kDa közelében; néhány minta esetében 80 kDa molsúlynál is észlelhető termék. Az iCC-carcinómákban hasonló eredményeket tapasztaltunk; ezen daganatok körében 50 kDa-nál is detektáltunk fehérjeterméket. Somorácz A, Korompay A, Törzsök P et al. Tricellulin expression and its prognostic significance in primary liver carcinomas. Pathol Oncol Res., 2014.

4.5. RT-PCR

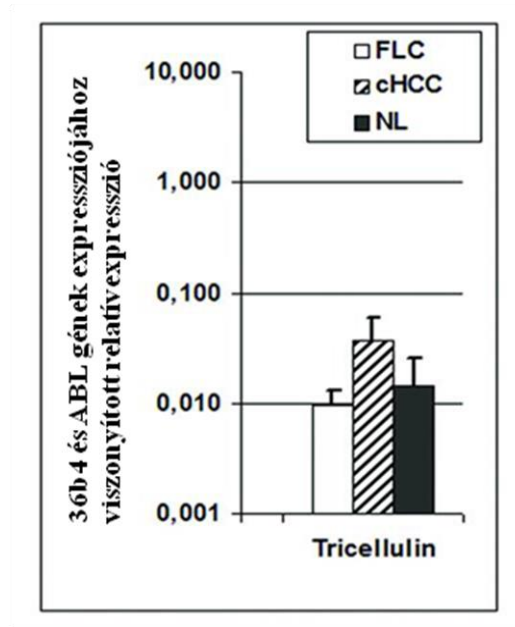
A tricellulin-mRNS relatív expressziója kvantitatív valós idejű RT-PCR vizsgálataink alapján a normál hasnyálmirigyszövetben szignifikánsan magasabbnak bizonyult mind a grade 1 ductalis adenocarcinomákhoz ($p=0,0002$), mind a közepesen differenciált, grade 2 adenocarcinomákhoz ($p=0,0001$), mind pedig a differenciálatlan, grade 3 exocrin daganatokhoz képest ($p=0,0002$). A pancreasdaganatokon belül a különböző differenciáltságú csoportok között szignifikáns tricellulin-mRNS-expresszióbeli különbségeket nem észleltünk, azonban a vizsgált fehérje mRNS-e a grade 3 csoportban a grade 1 és grade 2 daganatokhoz képest, a grade 2 adenocarcinomákban pedig a jól differenciált, grade 1 malignómákhoz viszonyítva a tumorok grádusának növekedésével egyértelműen csökkenő tendenciát mutatott (37. ábra).



37. ábra. Tricellulin-mRNS expresszió elemzése hasnyálmirigyben és ductalis adenocarcinomákban kvantitatív valós idejű RT-PCR alapján

A vizsgált normál pancreasszövethez képest szignifikánsan alacsonyabb tricellulin-mRNS detektálható a különböző differenciáltságú ductalis adenocarcinomákban. Jól látható, a daganatok grádusának emelkedésével a tricellulin-mRNS expressziója csökkenő tendenciát mutat. Szignifikanciahatár: $** = p < 0,01$. Korompay A, Borka K, Lotz G et al. Tricellulin expression in normal and neoplastic human pancreas. Histopathology, 2012.

Májdaganatok esetében a legmagasabb TRIC-mRNS-expressziót a konvencionális HCC-csoportban észleltük; RNS-szintű vizsgálataink alapján legkevésbé a FLHCC termelte a vizsgált mRNS-t (38. ábra). Szignifikáns különbségeket nem tapasztaltunk.



38. ábra. TRIC mRNS-expresszió vizsgálata normál májban, illetve konvencionális HCC-k és FLHCC-k körében 36b4 és ABL háztartási gének expressziójához viszonyítva.

Patonai A, Erdélyi-Belle B, Korompay A et al. Claudins and tricellulin in fibrolamellar hepatocellular carcinoma. Virchows Arch., 2011.

5. MEGBESZÉLÉS

A rosszindulatú hasnyálmirigy- és májdaganatok tekintetében – akárcsak a többi malignoma esetében is – a túlélési mutatókat leginkább a tumorok differenciáltsága és a betegség stádiuma határozza meg. Tekintve, hogy korai stádiumban mind a hepatikus-, mind a hasnyálmirigy-daganatok igen szerény tünettannal bírnak, a pontos diagnózis legtöbbször már a betegség előrehaladott fázisában születik meg; ez pedig tovább korlátozza az egyébként is szűkös terápiás lehetőségeket.

A primer pancreasdaganatok és májtumorok világszerte intenzív kutatások tárgyát képezik egyrészt a szerény, aspecifikus tüneteikből adódó kései diagnózisuk következtében relatíve rossz túlélési mutatóik, másrészt a rosszindulatú daganatos betegségek között is kiemelkedő agresszivitásuk, gyógyszeres kezelésre adott mérsékelt válaszreakcióik miatt. Bár kialakulásukat, genetikai hátterüket, terápiás lehetőségeiket az utóbbi években számos kutató- és gyógyszerfejlesztő csoport munkája nyomán jobban megismertük, a malignus daganatok közül még mindig a legrosszabb prognózisúak közé tartoznak. Számos genetikai eltérés is elősegíti kialakulásukat: a ductalis adenocarcinomák főképp a k-ras mutáció vagy a her2/neu gén overexpressziója, illetve egyes tumorszuppresszorok; a p53, BRCA2 vagy SMAD4 gének inaktivációja révén alakulnak ki (152-154), míg az endocrin daganatok hátterében leggyakrabban a MEN-1 gén mutációja vagy a VHL inaktivációja is szerepet játszhat (155). A primer malignus májdaganatok hátterében szintén egyre több genetikai eltérést sikerült kimutatni, ezek közül külön is megemlítendő az onkogén vírusok, így a HBV, HCV, HPV-16 és -18, illetve a HTLV-1 (156). A mismatch repair során szükséges MSH-3, -4, -5 és -6-ot érintő missense vagy nonsense mutációk szintén részt vehetnek a hepatocellularis carcinomák kialakulásában, akárcsak a nukleotid excíziós repair génjeiben történt pontmutációk is. Az utóbbi néhány esztendőben fontos genomikai vizsgálatok folynak a humán telomeráz-reverz transzkriptáz (157) és TP53 májdaganatok kialakulásában játszott szerepével kapcsolatban is. A primer májdaganatok egy ritka altípusában, a fibrolamellaris hepatocellularis carcinomában számos speciális genetikai eltérés is megfigyelhető; az mTOR jelátviteli útvonalakat

érintő mutációk mellett számos esetben a DNAJB1-PRKACA gének fúziója és BRCA2-mutáció is kimutatható (158, 159).

Az utóbbi esztendőkből a sejtbíológíának és a daganatkutatásnak közös, új tudományága született: a barriológia, mely az élő szervezetben működő hámsejtek és legfőképpen a sejteket összekötő kapcsolóstruktúrák felépítését és funkcióját kutatja. Ismert, hogy a szervezetben bárhol elhelyezkedő két hámsejt között – anatómiai helytől függően – néhány nanométeres rés van, melyet számos ponton különböző felépítésű és funkciójú sejtkapcsoló rendszerek kötnek össze. Ezek feladata elhelyezkedésüktől függően más és más, azonban közülük számos alapvető fontosságú az élő szervezet fiziológiás egyensúlyának fenntartása szempontjából: közös, kettős feladatuk a 'kapu'- és a 'kerítés'-funkció, melyek révén egyrészt a sejtek közötti résen keresztül folyó korlátlan anyagáramlást szabályozzák és gátolják, másrészt bizonyos makromolekulák átengedéséért felelősek (160). A sejtkapcsoló struktúrákat alkotó fehérjék a laterális diffúzió és paracelluláris transzport szabályozása mellett a sejtpolaritás és a sejtek integrációjának megőrzésében is alapvető fontosságúak (161). Az utóbbi években a sejtkapcsoló-struktúrák rengeteg alkotófehérjéjét azonosították; számos további közülük még felfedezésre vár.

A fiziológiás folyadék egyensúly fenntartásán túl a sejtkapcsoló fehérjéknek komoly szerepük van egyes betegségek kialakulásában is: a gyulladásos bélbetegségek (162), különböző krónikus bőrbetegségek (163), iontranszport-zavarok hátterében számos esetben sejtkapcsoló fehérjék mennyiségi vagy minőségi zavarára derült fény. A barriológia egyik fontos célterülete a daganatkutatás; ma már egyértelmű, hogy a sejtek közötti kapcsolatok megváltoznak, gyakran fellazulnak a daganatelőző, premalignus állapotokban is (164-166); s ez különösen jellemző a már kialakult rosszindulatú daganatokban: azok progressziója során és a szisztémás áttétképződési mechanizmusok hátterében is sok esetben kimutatható a sejt-sejt közötti kapcsolatok és a kapcsoló struktúrákat alkotó fehérjék expressziós profiljának megváltozása. A legtöbb esetben – feltehetően a carcinogenesis során fellépő szövet- és sejttani dezintegráció részeként – a proteinek expressziója a daganatos szövetekben csökken, azonban számos daganattípusban ennek épp ellenkezője figyelhető meg (167-170).

A tight junction típusú sejtkapcsolatoknak ma már két formáját ismerjük, a két sejt közötti 'bicelluláris' és a három sejt találkozási pontjában elhelyezkedő 'tricelluláris' junctiókat. A sejtkapcsoló struktúrák közül a legfelületesebben, elsődleges barrierként elhelyezkedő tight junction (TJ) a két szomszédos sejtet összekapcsolva övszerűen körbefut; alkotó fehérjéit molekuláris jellegzetességeik alapján két nagy csoportba, a claudinok körébe és a TAMP-családba sorolhatjuk (171). Az occludin, mint elsőként azonosított bicelluláris TJ-protein és a ma már 27 ismert altípussal bíró (71), szintén két sejt között elhelyezkedő claudinok megváltozott fehérje- vagy mRNS-szintű expressziója következtében megváltozik a sejtek közti kapcsolat erőssége és minősége, s ez a daganatképződésben, a tumorprogresszióban és a daganatok invazivitásának fokozódásában is szerepet játszhat (172, 173).

A daganatok kialakulásának igen fontos további momentuma az epithelialis-mesenchymális transitio jelensége, melynek során a hámsejtek elvesztik polaritásukat, illetve hámeredetű markereiket és kötőszövetre emlékeztető sejtekké alakulnak. A folyamatot a mesenchymális markerek (vimentin) expressziójának fokozódása és számos sejtkapcsoló fehérje termelődésének megváltozása is kíséri (174-176). Jól ismert, hogy mind az EMT, mind a sejt-sejt közötti kapcsolatok elvesztése fontos lépés nemcsak a carcinogenesis, hanem a tumorprogresszió és a metastasis-képződés folyamatában is (177-179).

Minthogy a rosszindulatú daganatos megbetegedések túlnyomóan epitheliális eredetűek, a hámsejtek közötti megfelelő erősségű sejtkapcsolat egyensúlyának felborulása igen lényeges momentum a daganatos transzformáció lépései során. Mindez logikusan magyarázza a hámeredetű daganatok nagyrészt kimutatható sejtkapcsoló proteinek downregulációját vagy overexpresszióját. Sok esetben a daganatok kialakulásában játszott molekuláris mechanizmusok még részben vagy egészben ismeretlenek, azonban számos sejtkapcsoló fehérje sejtciklust szabályozó, transzkripciós faktorok expresszióját módosító vagy intracelluláris jelátviteli útvonalakat reguláló szerepét már megismertük (180, 181).

Mindezek alapján kutatásunk célja volt egy új sejtkapcsoló fehérje vizsgálata humán ép és malignusan transzformált hasnyálmirigy- és májdaganatokban, különös tekintettel a

protein esetleges daganatdifferentiálódásban/differentiáltságban és az elemzett tumortípusok prognózisában betöltött szerepére.

A sejtkapcsoló struktúrák vizsgálata több évtizedre tekint vissza; humán pancreas Langerhans-sejtjeiben már negyven éve leírták jelenlétüket (182).

Bár a TJ-fehérjék (claudinok, occludin és tricellulin) pontos szerepe a mai napig még nincs teljesen tisztázva, a hámsejtek barrierfunkciójának megőrzésében, a paracelluláris transzportmechanizmusok és a laterális diffúzió szabályozásában (183), a sejtek regenerációs képességében, és az utóbbi néhány esztendő kutatási eredményei alapján a carcinogenesisben, illetve a tumorprogresszióban és metastasis-képződésben is fontos szerepük van (184, 185). Sok közülük sejt- és szövetspecifikus expressziót mutat. Tudjuk, hogy a sejtkapcsoló fehérjék a differenciáció folyamatában kritikus fontosságúak; a sejtek polaritásának megőrzése elemi szükséglet a fiziológiás funkció kialakulásában és fenntartásában. Számos rosszindulatú daganat kialakulása, illetve progressziója során egyértelműen észlelhető a TJ-fehérjék expressziójának megváltozása, s ennek következtében a sejtkapcsoló struktúrák átrendeződése, fellazulása, dezorganizációja. A sejtek közötti adhézio csökkenésének logikus következménye a daganatok kifejezettebb inváziós képessége és metasztatikus potenciálja, egyszersmind a rosszabb prognózis. Egyes daganattípusokban fokozott TJ-fehérje expresszió észlelhető az ép szövetekhez képest; elképzelhető, hogy ez valamiféle adaptációs válasz a barrierfunkció megőrzésére és a szabályozatlanná váló permeabilitás mérséklésére.

Erre a folyamatra jellemző példa a cervicalis intraepithelialis neoplasia (CIN): míg a tumorelőző állapot esetében a CLDN-1 fehérje expressziója emelkedik, az invazív cervicalis carcinomákban ugyanezen protein termelődése a sejtek dezorganizációjával összefüggésben lecsökken (103). Néhány rosszindulatú daganat esetében az ép szövethez képest eleve alacsonyabb TJ-fehérje expresszió társul: CLDN-4 emlődaganatokban (102), CLDN-7 fej-nyaki tumorokban (186) vagy a CLDN-23 egyes gyomordaganatokban; más típusúakban azonban fokozott TJ-protein-termelődés figyelhető meg – jó példa lehet erre a CLDN-1 colorectalis- és nyelőcső tumorokban (187); a CLDN-3- és -4 exocrin hasnyálmirigy-daganatokban, vagy a CLDN-10 a primer hepatocellularis carcinomákban (84, 188).

A primer pancreas- és májdaganatok kialakulásának és a betegség progressziójának háttérében számos genetikai és epigenetikai változás állhat; a sejtadhézió molekuláris és szerkezeti szintű változásainak minél alaposabb, részletesebb megismerése fontos információt nyújthat a hasnyálmirigy- és májdaganatok keletkezésének és progressziójának megértéséhez, ezen keresztül pedig lehetőséget adhat új terápiás eszközök fejlesztésére.

Az általunk vizsgált tricellulin, melyet 2005-ben már egérgyomorban, -duodenumban és -vesében detektáltak, a TAMP-fehérjék MARVEL-családjához tartozó transzmembrán protein; expresszióját ezidáig számos sejtvonalban elemezték. Szöveti szinten kevés munkacsoport elemezte; humán hallószervben, bőr Langerhans- és dendritikus sejtekben, nazális hámsejtekben, gyomorszövetben és csírasejtekben vizsgálták. Mutációját igazolták egy öröklődő siketség-szindrómában, illetve védőszerepük ismert felső légúti fertőzéseket okozó vírusok antigénjeivel szemben is. Ahogyan a tricellulinnal szerkezetileg és funkcionálisan is sok hasonlóságot mutató claudinok egyes altípusáról (CLDN-3 és -4) igazolták, hogy a *Clostridium perfringens* enterotoxinjának receptora (84), az általunk vizsgált tricellulinnak is leírták fontos infektológiai vonatkozásait: egyes *Rickettsia*-, *Listeria*- és *Burkholderia*-fajok mellett a *Shigella* és a *Pseudomonas aeruginosa* is a tricelluláris junctiókat preferálva, a tricellulin aktív közreműködésével jut a sejtekbe és okoz citotoxikus károsodást (189, 190).

Néhány humán malignomában is folytak tricellulinnal kapcsolatos kutatások; tüdőcarcinomák esetében a fehérje jelenlétét nem sikerült igazolni. Munkacsoportunk korábban humán májban és fibrolamelláris HCC-ban azonosította a fehérjét és leírta a protein tumorban észlelt expressziójának változását normál májszövethez képest (133).

A tricellulin jelenlétét több humán pancreas ductussejt- és adenocarcinoma sejtvonalban már igazolták. Humán pancreas adenocarcinoma sejtvonal (HPAC) vizsgálata során derült fény a tricellulin-expresszió egyik fő szabályozója, a JNK-útvonal szerepére is (124). Más kutatócsoportok munkája alapján hasnyálmirigy ductalis sejtekből származó sejtvonalakban a protein kináz-C is a tricellulin kifejeződés fontos regulátora, szöveti szinten azonban még nem vizsgálták azt. A carcinogenesisben, tumorprogresszióban

betöltött esetleges szerepe is tisztázatlan maradt primer hasnyálmirigy- és májdaganatok vonatkozásában.

A tricellulinnal sok szerkezeti és funkcionális hasonlóságot mutató claudinok hasnyálmirigyben való előfordulását számos kutatócsoport vizsgálta: Rahner és munkacsoportja CLDN-2 fehérje jelenlétét írta le patkány hasnyálmirigyének ductussejtjeiben, a CLDN-3 és -4 proteint mind a ductus-, mind az acinussejtekben azonosította (191). Más kutatási eredmények humán hasnyálmirigy nagy ductusaiban, ductulusaiban és az acinussejtekben is kifejezett CLDN-1 és -4 expressziót észleltek, azonban az endocrin hasnyálmirigy-területek az általuk vizsgált fehérjéket nem expresszálták (192). Egyes vizsgálatok eredménye szerint normál humán exocrin pancreas CLDN -1, -2, -3, -4 és -7 fehérjét expresszál, míg az endocrin hasnyálmirigy CLDN-3 és -7 proteint termel. Borka és munkatársainak 2008-ban végzett kutatásai alapján a normál humán hasnyálmirigy exocrin részében, azaz a ductus- és acinussejtekben CLDN-1, -3, -4 és -7 expresszálódik; a CLDN-2 csak a ductalis eredetű sejtekben mutatható ki (87). Mindezek alapján elmondható, hogy a pancreas felépítésében részt vevő három, eltérő differenciációt mutató sejtspecifikus claudin expressziós mintázattal rendelkezik. Ductus hámsejtekben a CLDN-1, -2, -3, -4 és -7, az acinus sejtekben a CLDN-1, -3, -4 és -7, az endocrin differenciációt mutató sejtekben pedig csak a CLDN-3 és -7 fehérje mutatható ki.

Ductalis hasnyálmirigy-tumorokban magas CLDN-1, -4 és -7 fehérje-expresszió észlelhető, míg a CLDN-3 és -7 termelődés az endocrin daganatokra jellemző mintázat. Az egyébként főképp endothelialisan elhelyezkedő CLDN-5 és a CLDN-7 közös expressziója segít elkülöníteni a pancreas solid pseudopapillaris tumorait az acinussejtes carcinomáktól és a pancreatoblastomáktól. Bár egyértelmű bizonyítékaink egyelőre nem állnak rendelkezésre, a fehérje-expressziós mintázat alapján az egyes pancreasdaganat-típusok eltérő CLDN-expressziós mintázata utalhat a TJ-fehérjék szövetspecifikus funkcióira is, más kutatási eredmények szerint azonban visszautalhatnak a pancreas fejlődésére. Ezt a koncepciót támasztja alá a pancreas ductalis rendszere és az extrahepaticus epeutak közös fejlődése, valamint a normál epeutakban illetve cholangiocarcinomákban megfigyelhető magas CLDN-4 expresszió.

A tény, hogy humán pancreasdaganatokban a CLDN-fehérjék expressziója megváltozik, lehetőséget ad e fehérjék jövőbeli potenciális diagnosztikus és terápiás célpontként való használatára is.

A TRIC és occludin fehérjét kódoló gének az egerek 13. és a humán 5. kromoszómáján való tandem elhelyezkedése is minden valószínűség szerint fejlődéstani alapokon nyugszik (106). A TRIC és az occludin fehérjék együttműködését az is jól jelzi, hogy az occludin génjének kiütése következtében a TRIC a tricellularis pontokból áthelyeződik a bicellularis sejtkapcsoló struktúrák területére. RNS-interferencia révén a TRIC expressziójának csökkenése következtében mind a bicellularis, mind a tricellularis junctiókban elhelyezkedő hámsejtek barrierfunkciójának károsodása figyelhető meg (105).

A hasnyálmirigy fejlődése során a progenitor sejtekből elsőként az exocrin pancreas alakul ki; az endocrin egység a már kifejlődött exocrin hasnyálmirigyet alkotó sejtek további differenciálódása révén fejlődik ki. Könnyen elképzelhető, hogy a sejtkapcsoló fehérjék eltérő expressziós mintázata ezt a fejlődéstani különbséget tükrözi. Ezt a koncepciót támasztják alá humán pancreasszöveteken végzett vizsgálataink eredményei is; míg az exocrin hasnyálmirigyben a TRIC fehérje expresszáldott, addig a hasnyálmirigy Langerhans-szigetei nem termelték a vizsgált proteint.

Egyes korábbi kutatások eredményeivel korrelálva az általunk végzett immunhisztokémiai reakciók során intenzíven, pontszerűen halmozódó TRIC-expressziót detektáltunk a tricellularis junctióknak megfelelően, míg a két sejt között kapcsolatot létesítő, bicellularis sejtkapcsolatok területén gyengébb, lineárisan megjelenő protein-expressziót azonosítottunk. Az elvégzett immunfluoreszcens vizsgálataink alapján TRIC és occludin kolokalizációt észleltünk az exocrin pancreas sejteinek apicalis pólusának megfelelően, megerősítve egyrészt a két fehérje közeli genetikai és strukturális hasonlóságát, másrészt a TRIC leginkább apicalis sejtkapcsoló rendszerben való elhelyezkedését.

A fentebb részletezett expresszióbeli különbséget észleltük a hasnyálmirigy különböző eredetű daganataiban is: az endocrin pancreasdaganatok kiérettségüktől függetlenül nem mutattak TRIC-expressziót, míg az exocrin eredetű, ductalis adenocarcinomák, illetve

az acinussejtes daganatok mind fehérjeszintű, mind mRNS-szintű vizsgálataink alapján – differenciáltságuk mértékétől függően – expresszálják a TRIC-t. Kutatásaink alapján a jól differenciált, grade I ductalis daganatok esetében kifejezett fehérje- és mRNS-expresszió volt észlelhető, a rosszul differenciált, kevésbé kiérett típusokban azonban az intenzív fehérje- és RNS-szintű expresszió szignifikánsan lecsökkent; jelezve ezzel is az intercellularis kapcsolatok fellazulását és az agresszívebb biológiai viselkedést. A TJ fehérjék expressziójának csökkenése számos más daganattípus és sejtkapcsoló fehérje esetében már ismert; eredményeinkhez hasonlóan a legtöbb esetben az expresszió mérséklődése egyenes arányban állt a daganat dedifferenciálódásának mértékével.

A vizsgálatunk során kapott eredmények, az exocrin és endocrin pancreaszövet és -daganatok TRIC expressziója közötti különbségek a későbbiekben hatékony segítséget nyújthatnak a célzott terápiás lehetőségek tekintetében: a tumornövekedés esetleg gátolhatóvá válik akár egy CLDN-4-célzott, *C. perfringens* enterotoxin és *P. aeruginosa* exotoxin fúziós molekula révén (193); emellett a jól differenciált ductalis adenocarcinomák esetében is elképzelhető célzott terápia bevezetése (194).

A hepatociták, illetve az epeúti hámsejtek közötti sejtkapcsoló struktúrák épsége kiemelt fontosságú a vér-epeúti barrier megőrzésében és az ennek révén megvalósuló szabályozott transzportfolyamatok megfelelő működésében, legfőképpen a fiziológias epeelválasztás során (195, 196). A TJ fehérjék downregulációja és overexpressziója a carcinogenesis során a legtöbb daganattípusban egyaránt megfigyelhető. Szerepük a daganatok kialakulásában és fennmaradásában, progressziójában igen sokrétű; gyakran befolyásolják előnyösen vagy hátrányosan a daganatok viselkedését. Sok közülük akár ugyanazon a tumortípuson belül is tumorszuppresszorként vagy promoterként működik.

A carcinogenesis során a primer májdaganatokban is megfigyelhető a TJ-fehérjék expressziójának megváltozása: a HCC-k egy részében a CLDN-1 termelésének csökkenése agresszívebb biológiai viselkedéssel és rosszabb prognózissal társul (197), a CLDN-10 overexpressziója a tumoros invázió elősegítése révén szintén negatív faktor a betegség túlélésében (198). Érdekes kutatási eredmény, hogy míg a CLDN-5 fiziológias esetben csak a sinusoidokat alkotó sejtekben és a HCC-k érkepleteiben figyelhető meg, a primer májsejtrákok egy altípusában, a fibrolamellaris HCC-ban a tumorsejtek felszínén is kimutatható (133, 199). Az iCC-k esetében az occludin jelenléte mellett a

CLDN-1, -2, -4 és -10 expressziója is megfigyelhető (200). Egyes vizsgálatok alapján az iCC-k közel felében a CLDN-18 protein is expresszálódik, jelenlétük korai nyirokcsomó-áttétképződéssel és rossz túlélési mutatókkal társul (201).

Bár a TJ-fehérjék overexpressziója vagy termelődésének csökkenése sok malignus daganat esetében nem korrelál szorosan a betegség prognózisával, a hepatocellularis carcinomák CLDN-1 és -10 expressziója egyes kutatási eredmények alapján irányadónak tűnik a tumorok klinikopatológiai sajátosságai és a prognózis szempontjából: az alacsony CLDN-1 expresszió szerény prognózissal társult, miként a kifejezett CLDN-10 expresszió is (ez a hepatocellularis carcinomák közel 40%-ban kimutatható) (188, 202). A májsejtek által alkotott primer epeutak felépítésében és a sejtek közötti kapcsolódásban a CLDN-1 és -2 fehérje játszik fontos szerepet, míg az endothelsejtekből felépülő sinusoidokban a CLDN-5 jelenlétét sikerült igazolni. A nagyobb intrahepatikus epeutakban a CLDN-3, -4, -7, -8 és -10 proteinek felelősek a barrierfunkció fenntartásáért. A CLDN-1 fehérjének a határolófunkción túl néhány esztendővel ezelőtt új funkcióját is leírták; a hepatitis-C vírus ko-receptoraként funkcionál (203).

Humán májjal kapcsolatos vizsgálataink során az epeútrendszer minden szintjén észleltünk TRIC-expressziót, a canaliculusoktól egészen a nagy epevezetékig. A pancreasszövet elemzése során tapasztaltakhoz hasonlóan a májsejtek és a cholangiocyták esetében a vizsgált protein a tricellularis junctiók területén akkumulálódott; a két sejtet összekapcsoló régiókban gyengébb intenzitással, lineáris elhelyezkedésben azonosítottuk.

A vizsgált ép és daganatosan transzformált hasnyálmirigyben tapasztaltakkal ellentétben, a normál májszövetben és az epeúti, illetve májcarcinomákban a TRIC fehérje expressziója mind az immunpozitivitás, mind az intenzitás mértékének tekintetében igen széles tartományban mozgott. Egyes közelmúltban napvilágot látott kutatások eredményei szerint a májban elhelyezkedő TJ-proteinek közül kettő, a CLDN-1 és az occludin kolokalizációban helyezkedik el az általunk is vizsgált TRIC-fehérjével (106); a HCV-koreceptoraként mindemellett szerepet játszik a vírus hepatocytákba való jutásáért. *In vitro* vizsgálatok révén derült fény az említett fehérjék szerepére a HCV hepatocytába jutásának kései fázisában, hasonlóan a CLDN-6 és -9 funkciójához (204,

205). Tekintve, hogy a TRIC-fehérje mind az occludinhoz, mind a claudinokhoz számos szempontból igen nagyfokú hasonlóságot mutat, fölmerül a lehetősége e fehérje HCV-internalizációban betöltött szerepének is.

Vizsgálatunk során a hepatocellularis carcinomákban – hasonlóan az ép májszövetben észleltekhöz – a TRIC-expresszió erősen különbözőnek bizonyult, szignifikáns különbséget itt nem tapasztaltunk. Hat HCC–peritumoralis cirrhotikus májszövet-pár vizsgálata során öt pár esetében észleltük a már daganatos szövet magasabb TRIC-expresszióját, melynek háttérében feltételeztük a TRIC hepatocarcinogenesisben betöltött esetleges szerepét – természetesen ennek tisztázására további vizsgálatok szükségesek. Jelen májjal kapcsolatos vizsgálatunk eredményei részlegesen eltérnek a korábbi munkánk során (normál májszövet, konvencionális HCC és FLHCC TRIC-expressziós mintázatának elemzése) észleltektől (Patonai és mtsai, 2011), ez föltehetően az első munka kis esetszámából adódik. Érdekes különbség a hasnyálmirigyszövetekkel végzett kutatásaink eredményeihez képest, hogy májdaganatok esetében nem észleltünk összefüggést a fehérje expressziója, illetve a daganat differenciáltsága között. További különös eredménynek tekinthető, hogy a HCC-k közel 20%-ában nuclearis elhelyezkedésben volt megfigyelhető a vizsgált fehérje.

A TJ-proteinek magi lokalizációja már hosszú ideje ismert (94, 206); számos esetben utalhat a fehérje eltérő biológiai viselkedésére, amely a későbbiekben akár poszttranszlációs módosulások révén vezethet genetikai eltérésekhez. Jó példa lehet erre a melanóma-sejtekben PKA-indukált foszforiláció révén sejtmagba jutó CLDN-1 (207). Vizsgálataink során a magi reakciók mellett gyenge membránpozitivitást is észleltünk, ez is alátámasztja a TRIC fehérje intracellularis elhelyezkedésének megzavart regulációját.

A hasnyálmirigy ductalis adenocarcinomái esetében megfigyelt, a dedifferenciálódással arányosan csökkenő TRIC-expresszió az intrahepatikus cholangiocarcinomákban is csökkent; a mirigyképződés tendenciájának csökkenésével a TRIC-fehérje megjelenése is mérséklődött.

HCC-k esetében a magas TRIC-expresszió – hasonlóan a CLDN-10-hez – rosszabb túlélési mutatókkal társult, míg az intrahepatikus cholangiocarcinomák esetében ugyanez a jelenség szignifikánsan jobb túlélési adatokkal társult.

Összességében elsőként vizsgáltuk és írtuk le a TRIC fehérje- és mRNS-szintű jelenlétét humán, ép pancreas- és májszövetben, illetve ezek leggyakrabban előforduló primer daganataiban. A hasnyálmirigy vonatkozásában azonosítottak alapján elmondhatjuk, hogy mind az ép, mind a tumorosan transzformált exocrin pancreas expresszálja a vizsgált molekulát, míg az endocrin eredetű ép szövetben és a daganatokban nem termelődik. Normál humán hepatocytákban és biliaris hámban is sikerült kimutatnunk a TRIC-fehérjét, fölvetve ezzel esetleges szerepét a vér-epe barrier megőrzésében, fönntartásában. A ductalis adenocarcinomák vizsgálatakor szignifikáns negatív összefüggést észleltünk a TRIC-expresszió és a daganatok differenciációja között. A vizsgált hepatocellularis carcinomák esetében differenciáltságtól független, heterogén protein-expressziót észleltünk, míg az epeutakból kiinduló cholangiocarcinomák elemzése alapján a pancreas ductalis adenocarcinomáiban észleltekhöz hasonló eredményre jutottunk; a tumor dedifferenciációjával a TRIC-expressziója csökkent. HCC-k esetében a magas TRIC-expresszió, a cholangiocarcinoma-csoportban pedig az alacsony fehérje-kifejeződés társult rosszabb túlélési mutatókkal.

Eredményeink alapján a TRIC marker lehet az exocrin és endocrin pancreas – illetve ezek daganatainak – elkülönítése során, s mint a sejtheadhézió rendszerének egyik oszlopos tagja, a későbbiekben új célpont lehet a jól differenciált ductalis adenocarcinomák terápiájában. Primer malignus májdaganatok esetében mind a hepatocellularis, mind a cholangiocellularis tumorokban kimutathatónak bizonyult, a hepatocarcinogenesisben és -progresszióban, illetve a daganatos túlélés alakításában betöltött szerepe egyelőre még nem ismert. A TRIC-fehérje a magas TRIC-expresszióval bíró daganatok esetében további vizsgálatok eredményei alapján a jövőben szintén target-terápiára alkalmas célpont lehet.

6. KÖVETKEZTETÉSEK

Vizsgálataink eredményei alapján az alábbi következtetésekre jutottunk:

1. A TRIC-protein az exocrin pancreasban mind az acinusok, mind a ductalis rendszer hámsejtjeiben kimutatható volt; a tricellularis junctióknak megfelelően pontszerű elhelyezkedésben, míg a két sejt közötti, bicellularis kapcsolatoknak megfelelően gyengébb intenzitású, lineáris membránpozitivitás formájában. Az exocrin pancreas ductalis és acinaris rendszerében észlelt TRIC-expresszió intenzitásában és lokalizációjában nem észleltünk különbséget. Az endocrin hasnyálmirigyszövetekben a TRIC-protein vizsgálataink alapján nem expresszálódott.
2. Fehérjeszintű és molekuláris vizsgálataink alapján a TRIC mind fehérje-, mind mRNS-szinten kimutatható pancreas ductalis eredetű adenocarcinomákban.
3. Fehérjeszintű vizsgálataink eredményei szerint a normál pancreashoz képest a grade növekedésével párhuzamosan a ductalis adenocarcinomák TRIC-expressziója szignifikánsan alacsonyabb. Molekuláris vizsgálataink szerint normál pancreasban szignifikánsan magasabb TRIC-mRNS-expresszió észlelhető mindhárom differenciáltságú daganattípushoz képest.
4. A TRIC endocrin hasnyálmirigydaganatokban differenciáltságtól függetlenül sem fehérje-, sem mRNS-szinten nem volt kimutatható, hasonlóan a normál endocrin pancreas vizsgálata során észleltekhöz.
5. A pancreas acinussejtes carcinomáiban kifejezett, pontszerű immunreakciót észleltünk a tumorosan transzformált, mirigyszerű struktúrákat alkotó daganatsejtek apicalis pólusának megfelelően.
6. A normál májszövetben heterogén TRIC-expressziót észleltünk: a vizsgált fehérje a hepatocyták és az epeúti hámsejtek felületén is kimutatható volt, hasonlóan a hasnyálmirigy vizsgálatakor már megismert lokalizációhoz. A TRIC fehérje kolokalizációban volt kimutatható CLDN-1-gyel és MRP2-vel, alátámasztva ezzel a TRIC apicalis elhelyezkedését a primer máj- és epeúti sejtekben.
7. A vizsgált macro- és micronodularis cirrhotikus májszövetben is sikerült TRIC fehérjét detektálni. Expressziós mintázatát illetően hasonló eredményre jutottunk a

normál májszövetekben azonosítottakhoz képest; intranodularisan pontszerű és lineáris immunpozitivitást is észleltünk. Érdeemi expresszióbeli különbséget nem igazoltunk a normál májszövet TRIC-kifejeződéséhez képest. Eredményeink szerint nem áll fenn összefüggés a fehérje-expresszió mértéke és a cirrhosis súlyossága között.

8. A TRIC fehérjeszinten kimutatható a különböző differenciáltságú hepatocellularis carcinomákban, az expresszió azonban igen széles határok között mozog.

9. A grade I és grade II tumorok TRIC-expressziója hasonlóan mutatkozott a normál epeúti hámban detektáltakhoz képest; míg a grade III daganatok rendezetlen sejtfészekben csak lineáris membránpozitivitást azonosítottunk, néhány rosszul differenciált daganat erős immunpozitivitást mutatott. Az általunk a vizsgált HCC-k közül hat esetben a daganatsejtek 1–2%-ában magi pozitivitást is észleltünk, ennek pontos magyarázatához további vizsgálatok szükségesek. Hepato- és cholangiocellularis vizsgálataink során sem a daganat differenciáltsága, sem a tumor mérete, sem a betegek életkora között nem tapasztaltunk összefüggést. A tricellulin fehérjét kifejezetten expresszáló HCC-k esetében a túlélési idő szignifikánsan rövidebb volt.

10. Igazoltuk a TRIC fehérje jelenlétét FLHCC-ben, perimembranosus lokalizációban. A protein szignifikánsan magasabban expresszálódott normál májszövetben a FLHCC-hoz képest.

11. Az általunk vizsgált cholangiocarcinomákban a TRIC-fehérje kimutatható volt a daganatosan transzformált sejtek felszínén pontszerű és lineáris elhelyezkedésben egyaránt. Az intrahepatikus CC-csoportot vizsgálva szignifikáns TRIC-expresszió csökkenést észleltünk a daganatok dedifferenciálódásával párhuzamosan. A cholangiocellularis daganatok esetén, szemben a HCC-csoporttal, a TRIC-t kifejezetten expresszáló csoport túlélése szignifikánsan jobbnak mutatkozott.

ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK

1. Munkacsoportunk elsőként vizsgálta és azonosította a TRIC-molekulát fehérje- és mRNS-szinten normál humán pancreasban és a leggyakrabban előforduló primer rosszindulatú hasnyálmirigy-daganatokban, illetve ép humán májszövetben, cirrhotikus májban és egyes elsődleges malignus májtumorokban.
2. Elemzéseink alapján elmondható, hogy a vizsgált molekula mind az ép, mind a malignusan transzformált exocrin pancreasban – különböző mértékben – expresszálódik, míg sem a normál endocrin hasnyálmirigyben, sem a különböző dignitású endocrin pancreasdaganatokban nem mutatható ki.
3. A TRIC-fehérje expressziójának csökkenését észleltük a pancreas ductalis adenocarcinomáinak dedifferenciációja során, melyet mRNS-szintű vizsgálatokkal is megerősítettünk; ez a jelenség alátámasztja a tumorprogresszió során valószínűsíthető sejtközötti dezintegrációt, a sejtkapcsolatok fellazulását és az ennek következtében hatékonyabbá váló metastasisképző potenciált. Ezen eredményeinket túlélési vizsgálatokkal is megerősítettük.
4. Májjal kapcsolatos vizsgálataink eredményei alapján a TRIC mind a hepato-, mind a cholangiocytákban jelen van normál és cirrhotikus szövetekben is. A HCC-k esetében differenciáltsági állapottól függetlenül heterogén fehérje-expressziót észleltünk; intrahepatikus cholangiocarcinomák esetében pedig – a ductalis pancreasdaganatokhoz hasonlóan – a differenciáció csökkenésével arányban csökkenő fehérje-kifejeződést detektáltunk. A vizsgált fehérjét elsőként igazoltuk FLHCC-ban.
5. A májdaganatokat a fehérje-expresszió tekintetében 'TRIC-high' és 'TRIC-low' alcsoportba osztottuk; a vizsgált intrahepatikus cholangiocarcinomák esetében a 'TRIC-high'-csoport teljes túlélése szignifikánsan magasabbnak bizonyult.
6. A HCC-k körében észlelt, néhány százalékban előforduló, magi lokalizációjú TRIC-protein expresszió kapcsán felvetődik a molekula magi szabályozásban betöltött szerepe, esetleg transzkripciós faktorként való működése is – ennek bizonyításához vagy cáfolatához természetesen további vizsgálatok szükségesek.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A primer hasnyálmirigy- és májdaganatok incidenciája világszerte növekvő tendenciát mutat. Későn megjelenő specifikus tüneteik miatt általában előrehaladott stádiumban ismerhetők föl, terápiás lehetőségeik pedig szűkösek. A pontos patológiai diagnózis felállításához egyre nagyobb mértékben járul hozzá a mára már önálló tudományággá fejlődött barriológia, mely a sejtek közötti kapcsolatokat vizsgálja. Bár a tight junction-struktúrák vizsgálata egyelőre az alap kutatás fázisában van, az intercelluláris junctiók pontosabb megismerése a szervezet számos fiziológias és kóros folyamatában való részvételük miatt igen fontos. A sejtkapcsoló struktúrákat alkotó (legtöbbször szövet- és szervspecifikus) sejtkapcsoló fehérjék expressziója diagnosztikus, illetve differenciáldiagnosztikai jelentőséggel bírhat. Számos sejtdhéziós protein szerepe már jól ismert a carcinogenesis, a tumorprogresszió, vagy a metastasisképződés folyamatában; ezekkel kapcsolatban az utóbbi években leginkább a claudinok kerültek a kutatások középpontjába. Munkánk és a jelen értekezés egy még kevésbé ismert, humán pancreasban és májban nem vizsgált fehérje, a tricellulin expressziója, carcinogenesisben, tumordifferenciációban, illetve prognózisban betöltött szerepének megismerését tűzte ki célul humán pancreasban és májban, illetve e szervek primer daganataiban. Vizsgálatainkhoz fehérje- (immunhisztokémiai- és immunfluoreszcens reakciók, Western-blot) és mRNS-kimutatására szolgáló (valós idejű RT-PCR) módszereket használtunk. Eredményeink szerint mind a normál exocrin pancreasban, mind a máj- és epeúti sejtekben kimutatható a tricellulin; azonban e molekulát az endocrin pancreas nem expresszálja. Kutatásaink alapján az exocrin hasnyálmirigy-daganatok és a cholangiocarcinomák tricellulin-expressziója a dedifferenciáció során szignifikánsan csökken, ami alátámasztja e daganatok közös hisztogenezisét és jelezheti az intercellularis kapcsolatok fellazulását a tumorprogresszió során, növelve inváziós és metasztatizáló képességüket. A jól differenciált pancreas ductalis adenoarcinomák és cholangiocarcinomák esetében a magasabb tricellulin-expresszió jobb túlélési mutatókkal társult; érdekes módon a májrákok tricellulint magasan expresszáló alcsoportja rossz prognózist mutatott. Kutatási eredményeink remélhetően hozzájárulhatnak a vizsgált betegségek részletesebb patológiai és klinikai megismeréséhez, és mindezek birtokában a páciensek számára a legmegfelelőbb, leghatékonyabb terápia megtervezéséhez.

8. SUMMARY

The incidences of primary pancreatic and liver cancer are increasing all over the world. They can show only aspecific symptoms for a long time, so the tumors are often in an advanced stage at the time of the diagnosis. Well known that therapeutical tools are with indeed very scanty success. Organ-or tissue specific epithelial cell junctions and barriology play an increasing role in establishment of the accurate diagnosis. Although studies about tight junctions are in initial phase, the better recognition and understanding of these intercellular junctions is very important for their functions in many physiological and pathophysiological processes. Expression pattern of cell adhesion proteins maybe of diagnostic and differential diagnostic relevance. Many of the cell adhesion proteins have well-known functions in the processes of carcinogenesis, tumorprogression and metastatic potential. Most of them, the claudins are in the focus of research. This thesis aimed to investigate the expression pattern of tricellulin, which is a not well characterized tight junction protein. Further, its role was studied in the carcinogenesis and tumor progression in primary human pancreatic and liver cancer. The protein- and mRNA-expression of the molecule was investigated by using immunohistochemistry, immunofluorescence, Western-blot and real time RT-PCR. Our results showed tricellulin protein expression in both of normal exocrine pancreas and hepatic-cholangiotic part of the liver, but was not revealed in the endocrine pancreas. The expression of tricellulin in the malignant exocrine pancreatic tumors and cholangiocarcinomas showed significantly decreased expression parallel to their dedifferentiation, which might confirm the common histogenesis and indicates the loss of intercellular connections during the tumor progression, increasing the invasive and metastatic potential of these tumors. Better survival datas were associated with higher expression of tricellulin in well-differentiated pancreatic ductal adenocarcinomas and cholangiocarcinomas, whereas high level of the protein in hepatocellular carcinomas denoted worse prognosis. Our results will hopefully contribute to better understanding of the pathological and clinical aspects of investigated diseases and this would provide a solid background to design more appropriate and efficient therapy.

9. IRODALOMJEGYZÉK

1. Logsdon CD, Ji B. (2013) The role of protein synthesis and digestive enzymes in acinar cell injury. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 10: 362-370.
2. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. (2015) Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*, 136: E359-386.
3. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JW, Comber H, Forman D, Bray F. (2013) Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer*, 49: 1374-1403.
4. Hassan MM, Bondy ML, Wolff RA, Abbruzzese JL, Vauthey JN, Pisters PW, Evans DB, Khan R, Chou TH, Lenzi R, Jiao L, Li D. (2007) Risk factors for pancreatic cancer: case-control study. *Am J Gastroenterol*, 102: 2696-2707.
5. Becker AE, Hernandez YG, Frucht H, Lucas AL. (2014) Pancreatic ductal adenocarcinoma: risk factors, screening, and early detection. *World J Gastroenterol*, 20: 11182-11198.
6. <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/pancreas.html>.
7. Hidalgo M. (2010) Pancreatic cancer. *N Engl J Med*, 362: 1605-1617.
8. Sipos B, Henopp T. (2011) [Precursor lesions of pancreatobiliary cancer]. *Pathologe*, 32 Suppl 2: 224-231.
9. <http://cebedu.es/wordpress/modelo-pancreatico-de-progresion-tumoral/>.
10. Murphy SJ, Hart SN, Lima JF, Kipp BR, Klebig M, Winters JL, Szabo C, Zhang L, Eckloff BW, Petersen GM, Scherer SE, Gibbs RA, McWilliams RR, Vasmatazis G, Couch FJ. (2013) Genetic alterations associated with progression from pancreatic intraepithelial neoplasia to invasive pancreatic tumor. *Gastroenterology*, 145: 1098-1109 e1091.
11. Delpu Y, Hanoun N, Lulka H, Sicard F, Selves J, Buscail L, Torrisani J, Cordelier P. (2011) Genetic and epigenetic alterations in pancreatic carcinogenesis. *Curr Genomics*, 12: 15-24.
12. Iacobuzio-Donahue CA, Klimstra DS, Adsay NV, Wilentz RE, Argani P, Sohn TA, Yeo CJ, Cameron JL, Kern SE, Hruban RH. (2000) Dpc-4 protein is expressed in virtually all human intraductal papillary mucinous neoplasms of the

- pancreas: comparison with conventional ductal adenocarcinomas. *Am J Pathol*, 157: 755-761.
13. Kaur S, Kumar S, Momi N, Sasson AR, Batra SK. (2013) Mucins in pancreatic cancer and its microenvironment. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 10: 607-620.
 14. Papadatos-Pastos D, Thillai K, Rabbie R, Ross P, Sarker D. (2014) FOLFIRINOX - a new paradigm in the treatment of pancreatic cancer. *Expert Rev Anticancer Ther*, 14: 1115-1125.
 15. Okuyama R, Aruga A, Hatori T, Takeda K, Yamamoto M. (2013) Immunological responses to a multi-peptide vaccine targeting cancer-testis antigens and VEGFRs in advanced pancreatic cancer patients. *Oncoimmunology*, 2: e27010.
 16. Falasca M, Kim M, Casari I. (2016) Pancreatic cancer: Current research and future directions. *Biochim Biophys Acta*.
 17. House MG, Schulick RD. (2006) Endocrine tumors of the pancreas. *Curr Opin Oncol*, 18: 23-29.
 18. Capurso G, Festa S, Valente R, Piciucchi M, Panzuto F, Jensen RT, Delle Fave G. (2012) Molecular pathology and genetics of pancreatic endocrine tumours. *J Mol Endocrinol*, 49: R37-50.
 19. <http://www.zuniv.net/physiology>.
 20. Cloyd JM, Poultides GA. (2015) Non-functional neuroendocrine tumors of the pancreas: Advances in diagnosis and management. *World J Gastroenterol*, 21: 9512-9525.
 21. Fazio N, de Braud F, Delle Fave G, Oberg K. (2007) Interferon-alpha and somatostatin analog in patients with gastroenteropancreatic neuroendocrine carcinoma: single agent or combination? *Ann Oncol*, 18: 13-19.
 22. Oberg K, Casanovas O, Castano JP, Chung D, Delle Fave G, Deneffe P, Harris P, Khan MS, Kulke MH, Scarpa A, Tang LH, Wiedenmann B. (2013) Molecular pathogenesis of neuroendocrine tumors: implications for current and future therapeutic approaches. *Clin Cancer Res*, 19: 2842-2849.
 23. Oberg K, Knigge U, Kwekkeboom D, Perren A. (2012) Neuroendocrine gastro-entero-pancreatic tumors: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*, 23 Suppl 7: vii124-130.

24. Lowery MA, Klimstra DS, Shia J, Yu KH, Allen PJ, Brennan MF, O'Reilly EM. (2011) Acinar cell carcinoma of the pancreas: new genetic and treatment insights into a rare malignancy. *Oncologist*, 16: 1714-1720.
25. Chaudhary P. (2015) Acinar Cell Carcinoma of the Pancreas: A Literature Review and Update. *Indian J Surg*, 77: 226-231.
26. La Rosa S, Sessa F, Capella C. (2015) Acinar Cell Carcinoma of the Pancreas: Overview of Clinicopathologic Features and Insights into the Molecular Pathology. *Front Med (Lausanne)*, 2: 41.
27. Bien E, Godzinski J, Dall'igna P, Defachelles AS, Stachowicz-Stencel T, Orbach D, Bisogno G, Cecchetto G, Warmann S, Ellerkamp V, Brennan B, Balcerska A, Rapala M, Brecht I, Schneider D, Ferrari A. (2011) Pancreatoblastoma: a report from the European cooperative study group for paediatric rare tumours (EXPeRT). *Eur J Cancer*, 47: 2347-2352.
28. Saif MW. (2007) Pancreatoblastoma. *JOP*, 8: 55-63.
29. Souzaki R, Tajiri T, Kinoshita Y, Tanaka S, Koga Y, Suminoe A, Hara T, Kohashi K, Oda Y, Taguchi T. (2010) Successful treatment of advanced pancreatoblastoma by a pylorus-preserving pancreatoduodenectomy after radiation and high-dose chemotherapy. *Pediatr Surg Int*, 26: 1045-1048.
30. Rappaport AM. (1980) Hepatic blood flow: morphologic aspects and physiologic regulation. *Int Rev Physiol*, 21: 1-63.
31. Gray's Anatomy 39e – www.graysanatomyonline.com. Elsevier Ltd.
32. Nault JC. (2014) Pathogenesis of hepatocellular carcinoma according to aetiology. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 28: 937-947.
33. Nishikawa H, Kita R, Kimura T, Osaki Y. (2014) Transcatheter arterial embolic therapies for hepatocellular carcinoma: a literature review. *Anticancer Res*, 34: 6877-6886.
34. Patel A, Sun W. (2014) Molecular targeted therapy in hepatocellular carcinoma: from biology to clinical practice and future. *Curr Treat Options Oncol*, 15: 380-394.
35. Chuma M, Terashita K, Sakamoto N. (2015) New molecularly targeted therapies against advanced hepatocellular carcinoma: From molecular pathogenesis to clinical trials and future directions. *Hepatol Res*, 45: E1-E11.

36. Abdul-Al HM, Wang G, Makhoulf HR, Goodman ZD. (2010) Fibrolamellar hepatocellular carcinoma: an immunohistochemical comparison with conventional hepatocellular carcinoma. *Int J Surg Pathol*, 18: 313-318.
37. Edmondson HA. (1956) Differential diagnosis of tumors and tumor-like lesions of liver in infancy and childhood. *AMA J Dis Child*, 91: 168-186.
38. El-Serag HB, Davila JA. (2004) Is fibrolamellar carcinoma different from hepatocellular carcinoma? A US population-based study. *Hepatology*, 39: 798-803.
39. Yamamoto M, Ariizumi S, Yoshitoshi K, Saito A, Nakano M, Takasaki K. (2006) Hepatocellular carcinoma with a central scar and a scalloped tumor margin resembling focal nodular hyperplasia in macroscopic appearance. *J Surg Oncol*, 94: 587-591.
40. Sheppard KJ, Bradbury DA, Davies JM, Ryrie DR. (1983) High serum vitamin B12 binding capacity as a marker of the fibrolamellar variant of hepatocellular carcinoma. *Br Med J (Clin Res Ed)*, 286: 57.
41. Kakar S, Burgart LJ, Batts KP, Garcia J, Jain D, Ferrell LD. (2005) Clinicopathologic features and survival in fibrolamellar carcinoma: comparison with conventional hepatocellular carcinoma with and without cirrhosis. *Mod Pathol*, 18: 1417-1423.
42. Hammill CW, Wong LL. (2008) Intrahepatic cholangiocarcinoma: a malignancy of increasing importance. *J Am Coll Surg*, 207: 594-603.
43. Leelawat K, Narong S, Wannaprasert J, Ratanashu-ek T. (2010) Prospective study of MMP7 serum levels in the diagnosis of cholangiocarcinoma. *World J Gastroenterol*, 16: 4697-4703.
44. Leelawat K, Narong S, Wannaprasert J, Leelawat S. (2011) Serum NGAL to Clinically Distinguish Cholangiocarcinoma from Benign Biliary Tract Diseases. *Int J Hepatol*, 2011: 873548.
45. Subrungruanga I, Thawornkunob C, Chawalitchewinkoon-Petmitrc P, Pairojkul C, Wongkham S, Petmitrb S. (2013) Gene expression profiling of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev*, 14: 557-563.
46. Ramirez-Merino N, Aix SP, Cortes-Funes H. (2013) Chemotherapy for cholangiocarcinoma: An update. *World J Gastrointest Oncol*, 5: 171-176.

47. Kiran RP, Pokala N, Dudrick SJ. (2007) Incidence pattern and survival for gallbladder cancer over three decades--an analysis of 10301 patients. *Ann Surg Oncol*, 14: 827-832.
48. Furuse M. (2009) Knockout animals and natural mutations as experimental and diagnostic tool for studying tight junction functions in vivo. *Biochim Biophys Acta*, 1788: 813-819.
49. Tsukita S, Yamazaki Y, Katsuno T, Tamura A. (2008) Tight junction-based epithelial microenvironment and cell proliferation. *Oncogene*, 27: 6930-6938.
50. Kondoh M, Yagi K. (2007) Tight junction modulators: promising candidates for drug delivery. *Curr Med Chem*, 14: 2482-2488.
51. Tsukita S, Furuse M. (2000) Pores in the wall: claudins constitute tight junction strands containing aqueous pores. *J Cell Biol*, 149: 13-16.
52. Ichikawa-Tomikawa N, Sugimoto K, Satohisa S, Nishiura K, Chiba H. (2011) Possible involvement of tight junctions, extracellular matrix and nuclear receptors in epithelial differentiation. *J Biomed Biotechnol*, 2011: 253048.
53. Balkovetz DF. (2006) Claudins at the gate: determinants of renal epithelial tight junction paracellular permeability. *Am J Physiol Renal Physiol*, 290: F572-579.
54. Raleigh DR, Marchiando AM, Zhang Y, Shen L, Sasaki H, Wang Y, Long M, Turner JR. (2010) Tight junction-associated MARVEL proteins marveld3, tricellulin, and occludin have distinct but overlapping functions. *Mol Biol Cell*, 21: 1200-1213.
55. Krug SM, Gunzel D, Conrad MP, Rosenthal R, Fromm A, Amasheh S, Schulzke JD, Fromm M. (2012) Claudin-17 forms tight junction channels with distinct anion selectivity. *Cell Mol Life Sci*, 69: 2765-2778.
56. Mariano C, Sasaki H, Brites D, Brito MA. (2011) A look at tricellulin and its role in tight junction formation and maintenance. *Eur J Cell Biol*, 90: 787-796.
57. Van Itallie CM, Anderson JM. (2013) Claudin interactions in and out of the tight junction. *Tissue Barriers*, 1: e25247.
58. Van Itallie CM, Anderson JM. (2014) Architecture of tight junctions and principles of molecular composition. *Semin Cell Dev Biol*, 36: 157-165.
59. Yu AS. (2015) Claudins and the kidney. *J Am Soc Nephrol*, 26: 11-19.

60. Klymkowsky MW, Savagner P. (2009) Epithelial-mesenchymal transition: a cancer researcher's conceptual friend and foe. *Am J Pathol*, 174: 1588-1593.
61. Jiang JH, Liu C, Cheng H, Lu Y, Qin Y, Xu YF, Xu J, Long J, Liu L, Ni QX, Yu XJ. (2015) Epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer: Is it a clinically significant factor? *Biochim Biophys Acta*, 1855: 43-49.
62. Medici D, Hay ED, Goodenough DA. (2006) Cooperation between snail and LEF-1 transcription factors is essential for TGF-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition. *Mol Biol Cell*, 17: 1871-1879.
63. Pan L, Chen J, Yu J, Yu H, Zhang M. (2011) The structure of the PDZ3-SH3-GuK tandem of ZO-1 protein suggests a supramodular organization of the membrane-associated guanylate kinase (MAGUK) family scaffold protein core. *J Biol Chem*, 286: 40069-40074.
64. Katsuno T, Umeda K, Matsui T, Hata M, Tamura A, Itoh M, Takeuchi K, Fujimori T, Nabeshima Y, Noda T, Tsukita S. (2008) Deficiency of zonula occludens-1 causes embryonic lethal phenotype associated with defected yolk sac angiogenesis and apoptosis of embryonic cells. *Mol Biol Cell*, 19: 2465-2475.
65. Islas S, Vega J, Ponce L, Gonzalez-Mariscal L. (2002) Nuclear localization of the tight junction protein ZO-2 in epithelial cells. *Exp Cell Res*, 274: 138-148.
66. Balda MS, Matter K. (2000) The tight junction protein ZO-1 and an interacting transcription factor regulate ErbB-2 expression. *EMBO J*, 19: 2024-2033.
67. Huerta M, Munoz R, Tapia R, Soto-Reyes E, Ramirez L, Recillas-Targa F, Gonzalez-Mariscal L, Lopez-Bayghen E. (2007) Cyclin D1 is transcriptionally down-regulated by ZO-2 via an E box and the transcription factor c-Myc. *Mol Biol Cell*, 18: 4826-4836.
68. Niessen CM. (2007) Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function. *J Invest Dermatol*, 127: 2525-2532.
69. Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S. (1993) Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol*, 123: 1777-1788.
70. Muthusamy A, Lin CM, Shanmugam S, Lindner HM, Abcouwer SF, Antonetti DA. (2014) Ischemia-reperfusion injury induces occludin

- phosphorylation/ubiquitination and retinal vascular permeability in a VEGFR-2-dependent manner. *J Cereb Blood Flow Metab*, 34: 522-531.
71. Mineta K, Yamamoto Y, Yamazaki Y, Tanaka H, Tada Y, Saito K, Tamura A, Igarashi M, Endo T, Takeuchi K, Tsukita S. (2011) Predicted expansion of the claudin multigene family. *FEBS Lett*, 585: 606-612.
 72. Tsukita S, Furuse M. (1998) Overcoming barriers in the study of tight junction functions: from occludin to claudin. *Genes Cells*, 3: 569-573.
 73. Lal-Nag M, Morin PJ. (2009) The claudins. *Genome Biol*, 10: 235.
 74. Furuse M, Fujita K, Hiiragi T, Fujimoto K, Tsukita S. (1998) Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol*, 141: 1539-1550.
 75. Morita K, Furuse M, Fujimoto K, Tsukita S. (1999) Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96: 511-516.
 76. Hewitt KJ, Agarwal R, Morin PJ. (2006) The claudin gene family: expression in normal and neoplastic tissues. *BMC Cancer*, 6: 186.
 77. Rosenthal R, Milatz S, Krug SM, Oelrich B, Schulzke JD, Amasheh S, Gunzel D, Fromm M. (2010) Claudin-2, a component of the tight junction, forms a paracellular water channel. *J Cell Sci*, 123: 1913-1921.
 78. Van Itallie CM, Mitic LL, Anderson JM. (2011) Claudin-2 forms homodimers and is a component of a high molecular weight protein complex. *J Biol Chem*, 286: 3442-3450.
 79. Furuse M, Hata M, Furuse K, Yoshida Y, Haratake A, Sugitani Y, Noda T, Kubo A, Tsukita S. (2002) Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol*, 156: 1099-1111.
 80. Nadarajah L, Khosravi M, Dumitriu S, Klootwijk E, Kleta R, Yaqoob MM, Walsh SB. (2014) A novel claudin-16 mutation, severe bone disease, and nephrocalcinosis. *Lancet*, 383: 98.
 81. Veshnyakova A, Protze J, Rossa J, Blasig IE, Krause G, Piontek J. (2010) On the interaction of *Clostridium perfringens* enterotoxin with claudins. *Toxins (Basel)*, 2: 1336-1356.

82. English DP, Santin AD. (2013) Claudins overexpression in ovarian cancer: potential targets for Clostridium Perfringens Enterotoxin (CPE) based diagnosis and therapy. *Int J Mol Sci*, 14: 10412-10437.
83. Romanov V, Whyard TC, Waltzer WC, Gabig TG. (2014) A claudin 3 and claudin 4-targeted Clostridium perfringens protoxin is selectively cytotoxic to PSA-producing prostate cancer cells. *Cancer Lett*, 351: 260-264.
84. Walther W, Petkov S, Kuvardina ON, Aumann J, Kobelt D, Fichtner I, Lemm M, Piontek J, Blasig IE, Stein U, Schlag PM. (2012) Novel Clostridium perfringens enterotoxin suicide gene therapy for selective treatment of claudin-3- and -4-overexpressing tumors. *Gene Ther*, 19: 494-503.
85. <http://www.kumc.edu/school-of-medicine/internal-medicine/nephrology/faculty/alan-yu/yu-lab.html>.
86. Offner S, Hekele A, Teichmann U, Weinberger S, Gross S, Kufer P, Itin C, Baeuerle PA, Kohleisen B. (2005) Epithelial tight junction proteins as potential antibody targets for pancarcinoma therapy. *Cancer Immunol Immunother*, 54: 431-445.
87. Borka K, Kaliszky P, Szabo E, Lotz G, Kupcsulik P, Schaff Z, Kiss A. (2007) Claudin expression in pancreatic endocrine tumors as compared with ductal adenocarcinomas. *Virchows Arch*, 450: 549-557.
88. Holczbauer A, Gyongyosi B, Lotz G, Torzsok P, Kaposi-Novak P, Szijarto A, Tatrai P, Kupcsulik P, Schaff Z, Kiss A. (2014) Increased expression of claudin-1 and claudin-7 in liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Pathol Oncol Res*, 20: 493-502.
89. Yovchev MI, Grozdanov PN, Zhou H, Racherla H, Guha C, Dabeva MD. (2008) Identification of adult hepatic progenitor cells capable of repopulating injured rat liver. *Hepatology*, 47: 636-647.
90. Cheung ST, Leung KL, Ip YC, Chen X, Fong DY, Ng IO, Fan ST, So S. (2005) Claudin-10 expression level is associated with recurrence of primary hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res*, 11: 551-556.
91. Mee CJ, Grove J, Harris HJ, Hu K, Balfe P, McKeating JA. (2008) Effect of cell polarization on hepatitis C virus entry. *J Virol*, 82: 461-470.

92. Halasz J, Holczbauer A, Paska C, Kovacs M, Benyo G, Verebely T, Schaff Z, Kiss A. (2006) Claudin-1 and claudin-2 differentiate fetal and embryonal components in human hepatoblastoma. *Hum Pathol*, 37: 555-561.
93. Moldvay J, Jackel M, Paska C, Soltesz I, Schaff Z, Kiss A. (2007) Distinct claudin expression profile in histologic subtypes of lung cancer. *Lung Cancer*, 57: 159-167.
94. Ikari A, Watanabe R, Sato T, Taga S, Shimobaba S, Yamaguchi M, Yamazaki Y, Endo S, Matsunaga T, Sugatani J. (2014) Nuclear distribution of claudin-2 increases cell proliferation in human lung adenocarcinoma cells. *Biochim Biophys Acta*, 1843: 2079-2088.
95. Aung PP, Mitani Y, Sanada Y, Nakayama H, Matsusaki K, Yasui W. (2006) Differential expression of claudin-2 in normal human tissues and gastrointestinal carcinomas. *Virchows Arch*, 448: 428-434.
96. Chandrasekharan B, Jeppsson S, Pienkowski S, Belsham DD, Sitaraman SV, Merlin D, Kokkotou E, Nusrat A, Tansey MG, Srinivasan S. (2013) Tumor necrosis factor-neuropeptide Y cross talk regulates inflammation, epithelial barrier functions, and colonic motility. *Inflamm Bowel Dis*, 19: 2535-2546.
97. Kojima T, Sawada N. (2012) Regulation of tight junctions in human normal pancreatic duct epithelial cells and cancer cells. *Ann N Y Acad Sci*, 1257: 85-92.
98. Jun KH, Kim JH, Jung JH, Choi HJ, Chin HM. (2014) Expression of claudin-7 and loss of claudin-18 correlate with poor prognosis in gastric cancer. *Int J Surg*, 12: 156-162.
99. Haseloff RF, Dithmer S, Winkler L, Wolburg H, Blasig IE. (2015) Transmembrane proteins of the tight junctions at the blood-brain barrier: structural and functional aspects. *Semin Cell Dev Biol*, 38: 16-25.
100. Gyorffy H, Holczbauer A, Nagy P, Szabo Z, Kupcsulik P, Paska C, Papp J, Schaff Z, Kiss A. (2005) Claudin expression in Barrett's esophagus and adenocarcinoma. *Virchows Arch*, 447: 961-968.
101. Fang D, Das KM, Cao W, Malhotra U, Triadafilopoulos G, Najarian RM, Hardie LJ, Lightdale CJ, Beales IL, Felix VN, Schneider PM, Bellizzi AM. (2011) Barrett's esophagus: progression to adenocarcinoma and markers. *Ann N Y Acad Sci*, 1232: 210-229.

102. Szasz AM, Tokes AM, Micsinai M, Krenacs T, Jakab C, Lukacs L, Nemeth Z, Baranyai Z, Dede K, Madaras L, Kulka J. (2011) Prognostic significance of claudin expression changes in breast cancer with regional lymph node metastasis. *Clin Exp Metastasis*, 28: 55-63.
103. Sobel G, Paska C, Szabo I, Kiss A, Kadar A, Schaff Z. (2005) Increased expression of claudins in cervical squamous intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma. *Hum Pathol*, 36: 162-169.
104. Szabo I, Kiss A, Schaff Z, Sobel G. (2009) Claudins as diagnostic and prognostic markers in gynecological cancer. *Histol Histopathol*, 24: 1607-1615.
105. Ikenouchi J, Furuse M, Furuse K, Sasaki H, Tsukita S. (2005) Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. *J Cell Biol*, 171: 939-945.
106. Ikenouchi J, Sasaki H, Tsukita S, Furuse M. (2008) Loss of occludin affects tricellular localization of tricellulin. *Mol Biol Cell*, 19: 4687-4693.
107. Staehelin LA. (1973) Further observations on the fine structure of freeze-cleaved tight junctions. *J Cell Sci*, 13: 763-786.
108. Gunzel D, Fromm M. (2012) Claudins and other tight junction proteins. *Compr Physiol*, 2: 1819-1852.
109. Chiba H, Osanai M, Murata M, Kojima T, Sawada N. (2008) Transmembrane proteins of tight junctions. *Biochim Biophys Acta*, 1778: 588-600.
110. Riazuddin S, Ahmed ZM, Fanning AS, Lagziel A, Kitajiri S, Ramzan K, Khan SN, Chattaraj P, Friedman PL, Anderson JM, Belyantseva IA, Forge A, Friedman TB. (2006) Tricellulin is a tight-junction protein necessary for hearing. *Am J Hum Genet*, 79: 1040-1051.
111. Westphal JK, Dorfel MJ, Krug SM, Cording JD, Piontek J, Blasig IE, Tauber R, Fromm M, Huber O. (2010) Tricellulin forms homomeric and heteromeric tight junctional complexes. *Cell Mol Life Sci*, 67: 2057-2068.
112. Higashi T, Tokuda S, Kitajiri S, Masuda S, Nakamura H, Oda Y, 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: 966-977.

113. Ogasawara N, Kojima T, Go M, Ohkuni T, Koizumi J, Kamekura R, Masaki T, Murata M, Tanaka S, Fuchimoto J, Himi T, Sawada N. (2010) PPARgamma agonists upregulate the barrier function of tight junctions via a PKC pathway in human nasal epithelial cells. *Pharmacol Res*, 61: 489-498.
114. Krug SM, Amasheh S, Richter JF, Milatz S, Gunzel D, Westphal JK, Huber O, Schulzke JD, Fromm M. (2009) Tricellulin forms a barrier to macromolecules in tricellular tight junctions without affecting ion permeability. *Mol Biol Cell*, 20: 3713-3724.
115. Krug SM, Schulzke JD, Fromm M. (2014) Tight junction, selective permeability, and related diseases. *Semin Cell Dev Biol*, 36: 166-176.
116. Takasawa A, Kojima T, Ninomiya T, Tsujiwaki M, Murata M, Tanaka S, Sawada N. (2013) Behavior of tricellulin during destruction and formation of tight junctions under various extracellular calcium conditions. *Cell Tissue Res*, 351: 73-84.
117. Ohkuni T, Kojima T, Ogasawara N, Masaki T, Ninomiya T, Kikuchi S, Go M, Takano K, Himi T, Sawada N. (2009) Expression and localization of tricellulin in human nasal epithelial cells in vivo and in vitro. *Med Mol Morphol*, 42: 204-211.
118. Ireton K. (2013) Molecular mechanisms of cell-cell spread of intracellular bacterial pathogens. *Open Biol*, 3: 130079.
119. Stevens JM, Galyov EE, Stevens MP. (2006) Actin-dependent movement of bacterial pathogens. *Nat Rev Microbiol*, 4: 91-101.
120. Zuk A, Hay ED. (1994) Expression of beta 1 integrins changes during transformation of avian lens epithelium to mesenchyme in collagen gels. *Dev Dyn*, 201: 378-393.
121. del Barrio MG, Nieto MA. (2002) Overexpression of Snail family members highlights their ability to promote chick neural crest formation. *Development*, 129: 1583-1593.
122. Ikenouchi J, Matsuda M, Furuse M, Tsukita S. (2003) Regulation of tight junctions during the epithelium-mesenchyme transition: direct repression of the gene expression of claudins/occludin by Snail. *J Cell Sci*, 116: 1959-1967.

123. Masuda R, Semba S, Mizuuchi E, Yanagihara K, 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.
124. Kojima T, Fuchimoto J, Yamaguchi H, Ito T, Takasawa A, Ninomiya T, Kikuchi S, Ogasawara N, Ohkuni T, Masaki T, Hirata K, Himi T, 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: 720-733.
125. Yamaguchi H, Kojima T, Ito T, Kimura Y, Imamura M, Son S, Koizumi J, Murata M, Nagayama M, Nobuoka T, Tanaka S, Hirata K, Sawada N. (2010) Transcriptional control of tight junction proteins via a protein kinase C signal pathway in human telomerase reverse transcriptase-transfected human pancreatic duct epithelial cells. *Am J Pathol*, 177: 698-712.
126. Yu AS, McCarthy KM, Francis SA, McCormack JM, Lai J, Rogers RA, Lynch RD, Schneeberger EE. (2005) Knockdown of occludin expression leads to diverse phenotypic alterations in epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 288: C1231-1241.
127. Nayak G, Lee SI, Yousaf R, Edelmann SE, Trincot C, Van Itallie CM, Sinha GP, Rafeeq M, Jones SM, Belyantseva IA, Anderson JM, Forge A, Frolenkov GI, Riazuddin S. (2013) Tricellulin deficiency affects tight junction architecture and cochlear hair cells. *J Clin Invest*, 123: 4036-4049.
128. Schluter H, Moll I, Wolburg H, Franke WW. (2007) The different structures containing tight junction proteins in epidermal and other stratified epithelial cells, including squamous cell metaplasia. *Eur J Cell Biol*, 86: 645-655.
129. Kubo A, Nagao K, Yokouchi M, Sasaki H, Amagai M. (2009) External antigen uptake by Langerhans cells with reorganization of epidermal tight junction barriers. *J Exp Med*, 206: 2937-2946.
130. Hermo L, Pelletier RM, Cyr DG, Smith CE. (2010) Surfing the wave, cycle, life history, and genes/proteins expressed by testicular germ cells. Part 5: intercellular junctions and contacts between germ cells and Sertoli cells and their regulatory interactions, testicular cholesterol, and genes/proteins associated with more than one germ cell generation. *Microsc Res Tech*, 73: 409-494.

131. Kikuchi S, Ninomiya T, Tatsumi H, Sawada N, Kojima T. (2010) Tricellulin is expressed in autotypic tight junctions of peripheral myelinating Schwann cells. *J Histochem Cytochem*, 58: 1067-1073.
132. Kondoh A, Takano K, Kojima T, Ohkuni T, Kamekura R, Ogasawara N, Go M, Sawada N, 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: 861-868.
133. Patonai A, Erdelyi-Belle B, Korompay A, Somoracz A, Straub BK, Schirmacher P, Kovalszky I, Lotz G, Kiss A, Schaff Z. (2011) Claudins and tricellulin in fibrolamellar hepatocellular carcinoma. *Virchows Arch*, 458: 679-688.
134. Mariano C, Silva SL, Pereira P, Fernandes A, Brites D, Brito MA. (2011) Evidence of tricellulin expression by immune cells, particularly microglia. *Biochem Biophys Res Commun*, 409: 799-802.
135. Soini Y. (2012) Tight junctions in lung cancer and lung metastasis: a review. *Int J Clin Exp Pathol*, 5: 126-136.
136. Nguyen KH, Suzuki H, Wakasugi T, Hohchi N, Hashida K, Ohbuchi T. (2013) Different expressions of erbB1/2 and tight junction proteins in hypertrophic inferior turbinates and nasal polyps. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 270: 945-951.
137. Mariano C, Palmela I, Pereira P, Fernandes A, Falcao AS, Cardoso FL, Vaz AR, Campos AR, Goncalves-Ferreira A, Kim KS, Brites D, Brito MA. (2013) Tricellulin expression in brain endothelial and neural cells. *Cell Tissue Res*, 351: 397-407.
138. Iwamoto N, Higashi T, Furuse M. (2014) Localization of angulin-1/LSR and tricellulin at tricellular contacts of brain and retinal endothelial cells in vivo. *Cell Struct Funct*, 39: 1-8.
139. Masuda S, Oda Y, Sasaki H, Ikenouchi J, Higashi T, Akashi M, Nishi E, Furuse M. (2011) LSR defines cell corners for tricellular tight junction formation in epithelial cells. *J Cell Sci*, 124: 548-555.
140. Furuse M, Oda Y, Higashi T, Iwamoto N, Masuda S. (2012) Lipolysis-stimulated lipoprotein receptor: a novel membrane protein of tricellular tight junctions. *Ann N Y Acad Sci*, 1257: 54-58.

141. McEwen AE, Escobar DE, Gottardi CJ. (2012) Signaling from the adherens junction. *Subcell Biochem*, 60: 171-196.
142. Troyanovsky S. (2012) Adherens junction assembly. *Subcell Biochem*, 60: 89-108.
143. Shapiro L, Kwong PD, Fannon AM, Colman DR, Hendrickson WA. (1995) Considerations on the folding topology and evolutionary origin of cadherin domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92: 6793-6797.
144. Gulino-Debrac D. (2013) Mechanotransduction at the basis of endothelial barrier function. *Tissue Barriers*, 1:e24180.
145. Miyoshi J, Takai Y. (2005) Molecular perspective on tight-junction assembly and epithelial polarity. *Adv Drug Deliv Rev*, 57: 815-855.
146. Delva E, Tucker DK, Kowalczyk AP. (2009) The desmosome. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1: a002543.
147. Kowalczyk AP, Green KJ. (2013) Structure, function, and regulation of desmosomes. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 116: 95-118.
148. Cirillo N. (2014) 150th anniversary series: desmosomes in physiology and disease. *Cell Commun Adhes*, 21: 85-88.
149. Hatzfeld M, Wolf A, Keil R. (2014) Plakophilins in desmosomal adhesion and signaling. *Cell Commun Adhes*, 21: 25-42.
150. Sonnenberg A, Liem RK. (2007) Plakins in development and disease. *Exp Cell Res*, 313: 2189-2203.
151. Lowndes M, Rakshit S, Shafriz O, Borghi N, Harmon RM, Green KJ, Sivasankar S, Nelson WJ. (2014) Different roles of cadherins in the assembly and structural integrity of the desmosome complex. *J Cell Sci*, 127: 2339-2350.
152. Gnani A, Licchetta A, Scarpa A, Azzariti A, Brunetti AE, Simone G, Nardulli P, Santini D, Aieta M, Delcuratolo S, Silvestris N. (2013) Carcinogenesis of pancreatic adenocarcinoma: precursor lesions. *Int J Mol Sci*, 14: 19731-19762.
153. Konner J, O'Reilly E. (2002) Pancreatic cancer: epidemiology, genetics, and approaches to screening. *Oncology (Williston Park)*, 16: 1615-1622, 1631-1612; discussion 1632-1613, 1637-1618.
154. Ryan DP, Hong TS, Bardeesy N. (2014) Pancreatic adenocarcinoma. *N Engl J Med*, 371: 2140-2141.

155. Chen M, Van Ness M, Guo Y, Gregg J. (2012) Molecular pathology of pancreatic neuroendocrine tumors. *J Gastrointest Oncol*, 3: 182-188.
156. Totoki Y, Tatsuno K, Covington KR, Ueda H, Creighton CJ, Kato M, Tsuji S, Donehower LA, Slagle BL, Nakamura H, Yamamoto S, Shinbrot E, Hama N, Lehmkuhl M, Hosoda F, Arai Y, Walker K, Dahdouli M, Gotoh K, Nagae G, Gingras MC, Muzny DM, Ojima H, Shimada K, Midorikawa Y, Goss JA, Cotton R, Hayashi A, Shibahara J, Ishikawa S, Guitau J, Tanaka M, Urushidate T, Ohashi S, Okada N, Doddapaneni H, Wang M, Zhu Y, Dinh H, Okusaka T, Kokudo N, Kosuge T, Takayama T, Fukayama M, Gibbs RA, Wheeler DA, Aburatani H, Shibata T. (2014) Trans-ancestry mutational landscape of hepatocellular carcinoma genomes. *Nat Genet*, 46: 1267-1273.
157. Takuma Y, Nouse K, Kobayashi Y, Nakamura S, Tanaka H, Matsumoto E, Fujikawa T, Suzuki M, Hanafusa T, Shiratori Y. (2004) Telomerase reverse transcriptase gene amplification in hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol*, 19: 1300-1304.
158. Cornella H, Alsinet C, Sayols S, Zhang Z, Hao K, Cabellos L, Hoshida Y, Villanueva A, Thung S, Ward SC, Rodriguez-Carunchio L, Vila-Casadesus M, Imbeaud S, Lachenmayer A, Quaglia A, Nagorney DM, Minguez B, Carrilho F, Roberts LR, Waxman S, Mazzaferro V, Schwartz M, Esteller M, Heaton ND, Zucman-Rossi J, Llovet JM. (2015) Unique genomic profile of fibrolamellar hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 148: 806-818 e810.
159. Darcy DG, Chiaroni-Clarke R, Murphy JM, Honeyman JN, Bhanot U, LaQuaglia MP, Simon SM. (2015) The genomic landscape of fibrolamellar hepatocellular carcinoma: whole genome sequencing of ten patients. *Oncotarget*, 6: 755-770.
160. Sawada N, Murata M, Kikuchi K, Osanai M, Tobioka H, Kojima T, Chiba H. (2003) Tight junctions and human diseases. *Med Electron Microsc*, 36: 147-156.
161. Matter K, Balda MS. (2014) SnapShot: Epithelial tight junctions. *Cell*, 157: 992-992 e991.
162. Piche T. (2014) Tight junctions and IBS--the link between epithelial permeability, low-grade inflammation, and symptom generation? *Neurogastroenterol Motil*, 26: 296-302.

163. Kirschner N, Brandner JM. (2012) Barriers and more: functions of tight junction proteins in the skin. *Ann N Y Acad Sci*, 1257: 158-166.
164. Hintsala HR, Siponen M, Haapasaari KM, Karihtala P, Soini Y. (2013) Claudins 1, 2, 3, 4, 5 and 7 in solar keratosis and squamocellular carcinoma of the skin. *Int J Clin Exp Pathol*, 6: 2855-2863.
165. Kushima R, Mukaisho KI, Takemura S, Sugihara H, Hattori T, Vieth M. (2013) [Barrett's esophagus: analyses from human and experimental animal studies]. *Pathologe*, 34: 138-147.
166. Neesse A, Hahnenkamp A, Griesmann H, Buchholz M, Hahn SA, Maghnouj A, Fendrich V, Ring J, Sipos B, Tuveson DA, Bremer C, Gress TM, Michl P. (2013) Claudin-4-targeted optical imaging detects pancreatic cancer and its precursor lesions. *Gut*, 62: 1034-1043.
167. Oliveira SS, Morgado-Diaz JA. (2007) Claudins: multifunctional players in epithelial tight junctions and their role in cancer. *Cell Mol Life Sci*, 64: 17-28.
168. Shang X, Lin X, Alvarez E, Manorek G, Howell SB. (2012) Tight junction proteins claudin-3 and claudin-4 control tumor growth and metastases. *Neoplasia*, 14: 974-985.
169. Tabaries S, Dupuy F, Dong Z, Monast A, Annis MG, Spicer J, Ferri LE, Omeroglu A, Basik M, Amir E, Clemons M, Siegel PM. (2012) Claudin-2 promotes breast cancer liver metastasis by facilitating tumor cell interactions with hepatocytes. *Mol Cell Biol*, 32: 2979-2991.
170. Tsutsumi K, Sato N, Cui L, Mizumoto K, Sadakari Y, Fujita H, Ohuchida K, Ohtsuka T, Takahata S, Tanaka M. (2011) Expression of claudin-4 (CLDN4) mRNA in intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. *Mod Pathol*, 24: 533-541.
171. Cording J, Berg J, Kading N, Bellmann C, Tscheik C, Westphal JK, Milatz S, Gunzel D, Wolburg H, Piontek J, Huber O, Blasig IE. (2013) In tight junctions, claudins regulate the interactions between occludin, tricellulin and marvelD3, which, inversely, modulate claudin oligomerization. *J Cell Sci*, 126: 554-564.
172. Turksen K, Troy TC. (2004) Barriers built on claudins. *J Cell Sci*, 117: 2435-2447.

173. Turksen K, Troy TC. (2011) Junctions gone bad: claudins and loss of the barrier in cancer. *Biochim Biophys Acta*, 1816: 73-79.
174. Chien J, Narita K, Rattan R, Giri S, Shridhar R, Staub J, Belefors D, Lai J, Roberts LR, Molina J, Kaufmann SH, Prendergast GC, Shridhar V. (2008) A role for candidate tumor-suppressor gene TCEAL7 in the regulation of c-Myc activity, cyclin D1 levels and cellular transformation. *Oncogene*, 27: 7223-7234.
175. Guo Z, Yuan J, Tang W, Chen X, Gu X, Luo K, Wang Y, Wan B, Yu L. (2007) Cloning and characterization of the human gene RAP2C, a novel member of Ras family, which activates transcriptional activities of SRE. *Mol Biol Rep*, 34: 137-144.
176. Rattan R, Narita K, Chien J, Maguire JL, Shridhar R, Giri S, Shridhar V. (2010) TCEAL7, a putative tumor suppressor gene, negatively regulates NF-kappaB pathway. *Oncogene*, 29: 1362-1373.
177. di Magliano MP, Logsdon CD. (2013) Roles for KRAS in pancreatic tumor development and progression. *Gastroenterology*, 144: 1220-1229.
178. Polyak K, Weinberg RA. (2009) Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer*, 9: 265-273.
179. Wang Y, Shi J, Chai K, Ying X, Zhou BP. (2013) The Role of Snail in EMT and Tumorigenesis. *Curr Cancer Drug Targets*, 13: 963-972.
180. Feng X, Jia S, Martin TA, Jiang WG. (2014) Regulation and involvement in cancer and pathological conditions of MAGI1, a tight junction protein. *Anticancer Res*, 34: 3251-3256.
181. Shiozaki A, Shimizu H, Ichikawa D, Konishi H, Komatsu S, Kubota T, Fujiwara H, Okamoto K, Iitaka D, Nakashima S, Nako Y, Liu M, Otsuji E. (2014) Claudin 1 mediates tumor necrosis factor alpha-induced cell migration in human gastric cancer cells. *World J Gastroenterol*, 20: 17863-17876.
182. Orci L, Malaisse-Lagae F, Ravazzola M, Rouiller D, Renold AE, Perrelet A, Unger R. (1975) A morphological basis for intercellular communication between alpha- and beta-cells in the endocrine pancreas. *J Clin Invest*, 56: 1066-1070.
183. Farquhar MG, Palade GE. (1963) Junctional complexes in various epithelia. *J Cell Biol*, 17: 375-412.

184. Singh AB, Sharma A, Dhawan P. (2010) Claudin family of proteins and cancer: an overview. *J Oncol*, 2010: 541957.
185. Wang Z, Mandell KJ, Parkos CA, Mrsny RJ, Nusrat A. (2005) The second loop of occludin is required for suppression of Raf1-induced tumor growth. *Oncogene*, 24: 4412-4420.
186. Lourenco SV, Coutinho-Camillo CM, Buim ME, Pereira CM, Carvalho AL, Kowalski LP, Soares FA. (2010) Oral squamous cell carcinoma: status of tight junction claudins in the different histopathological patterns and relationship with clinical parameters. A tissue-microarray-based study of 136 cases. *J Clin Pathol*, 63: 609-614.
187. Pope JL, Ahmad R, Bhat AA, Washington MK, Singh AB, Dhawan P. (2014) Claudin-1 overexpression in intestinal epithelial cells enhances susceptibility to adenomatous polyposis coli-mediated colon tumorigenesis. *Mol Cancer*, 13: 167.
188. Huang GW, Ding X, Chen SL, Zeng L. (2011) Expression of claudin 10 protein in hepatocellular carcinoma: impact on survival. *J Cancer Res Clin Oncol*, 137: 1213-1218.
189. Amieva M. (2012) *Shigella* navigates tight corners. *Cell Host Microbe*, 11: 319-320.
190. Nomura K, Obata K, Keira T, Miyata R, Hirakawa S, Takano K, Kohno T, Sawada N, Himi T, Kojima T. (2014) *Pseudomonas aeruginosa* elastase causes transient disruption of tight junctions and downregulation of PAR-2 in human nasal epithelial cells. *Respir Res*, 15: 21.
191. Rahner C, Mitic LL, Anderson JM. (2001) Heterogeneity in expression and subcellular localization of claudins 2, 3, 4, and 5 in the rat liver, pancreas, and gut. *Gastroenterology*, 120: 411-422.
192. Tsukahara M, Nagai H, Kamiakito T, Kawata H, Takayashiki N, Saito K, Tanaka A. (2005) Distinct expression patterns of claudin-1 and claudin-4 in intraductal papillary-mucinous tumors of the pancreas. *Pathol Int*, 55: 63-69.
193. Hashimi SM, Yu S, Alqurashi N, Ipe DS, Wei MQ. (2013) Immunotoxin-mediated targeting of claudin-4 inhibits the proliferation of cancer cells. *Int J Oncol*, 42: 1911-1918.

194. Neesse A, Griesmann H, Gress TM, Michl P. (2012) Claudin-4 as therapeutic target in cancer. *Arch Biochem Biophys*, 524: 64-70.
195. Mitic LL, Van Itallie CM, Anderson JM. (2000) Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions I. Tight junction structure and function: lessons from mutant animals and proteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 279: G250-254.
196. Rao RK, Samak G. (2013) Bile duct epithelial tight junctions and barrier function. *Tissue Barriers*, 1: e25718.
197. Higashi Y, Suzuki S, Sakaguchi T, Nakamura T, Baba S, Reinecker HC, Nakamura S, Konno H. (2007) Loss of claudin-1 expression correlates with malignancy of hepatocellular carcinoma. *J Surg Res*, 139: 68-76.
198. Ip YC, Cheung ST, Lee YT, Ho JC, Fan ST. (2007) Inhibition of hepatocellular carcinoma invasion by suppression of claudin-10 in HLE cells. *Mol Cancer Ther*, 6: 2858-2867.
199. Sakaguchi T, Suzuki S, Higashi H, Inaba K, Nakamura S, Baba S, Kato T, Konno H. (2008) Expression of tight junction protein claudin-5 in tumor vessels and sinusoidal endothelium in patients with hepatocellular carcinoma. *J Surg Res*, 147: 123-131.
200. Nemeth Z, Szasz AM, Tatrai P, Nemeth J, Gyorffy H, Somoracz A, Szijarto A, Kupcsulik P, Kiss A, Schaff Z. (2009) Claudin-1, -2, -3, -4, -7, -8, and -10 protein expression in biliary tract cancers. *J Histochem Cytochem*, 57: 113-121.
201. Shinozaki A, Shibahara J, Noda N, Tanaka M, Aoki T, Kokudo N, Fukayama M. (2011) Claudin-18 in biliary neoplasms. Its significance in the classification of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Virchows Arch*, 459: 73-80.
202. Bouchagier KA, Assimakopoulos SF, Karavias DD, Maroulis I, Tzelepi V, Kalofonos H, Kardamakis D, Scopa CD, Tsamandas AC. (2014) Expression of claudins-1, -4, -5, -7 and occludin in hepatocellular carcinoma and their relation with classic clinicopathological features and patients' survival. *In Vivo*, 28: 315-326.
203. Hamilton JP, Thuluvath PJ. (2008) Claudin-1 and its potential role in HCV entry: another piece of the puzzle. *J Clin Gastroenterol*, 42: 3-4.

204. Fofana I, Zona L, Thumann C, Heydmann L, Durand SC, Lupberger J, Blum HE, Pessaux P, Gondeau C, Reynolds GM, McKeating JA, Grunert F, Thompson J, Zeisel MB, Baumert TF. (2013) Functional analysis of claudin-6 and claudin-9 as entry factors for hepatitis C virus infection of human hepatocytes by using monoclonal antibodies. *J Virol*, 87: 10405-10410.
205. Meertens L, Bertaux C, Cukierman L, Cormier E, Lavillette D, Cosset FL, Dragic T. (2008) The tight junction proteins claudin-1, -6, and -9 are entry cofactors for hepatitis C virus. *J Virol*, 82: 3555-3560.
206. Belgiovine C, Chiodi I, Mondello C. (2011) Relocalization of cell adhesion molecules during neoplastic transformation of human fibroblasts. *Int J Oncol*, 39: 1199-1204.
207. French AD, Fiori JL, Camilli TC, Leotlela PD, O'Connell MP, Frank BP, Subaran S, Indig FE, Taub DD, Weeraratna AT. (2009) PKC and PKA phosphorylation affect the subcellular localization of claudin-1 in melanoma cells. *Int J Med Sci*, 6: 93-101.

10. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

A dolgozat témájában közölt publikációk:

Korompay A, Borka K, Lotz G, Somorácz A, Törzsök P, Erdélyi-Belle B, Kenessey I, Baranyai Z, Zsoldos F, Kupcsulik P, Bodoky G, Schaff Z, Kiss A. (2012) Tricellulin expression in normal and neoplastic human pancreas. *Histopathology*, 60: 76-86.

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

Patonai A, Erdélyi-Belle B, Korompay A, Somorácz A, Törzsök P, Kovalszky I, Barbai T, Rásó E, Lotz G, Schaff Z, Kiss A. (2013) Molecular characteristics of fibrolamellar hepatocellular carcinoma. *Pathol Oncol Res*, 19: 63-70.

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

A doktori munka témájától független publikációk:

Pallagi P, Venglovecz V, Rakonczay Z Jr, Borka K, Korompay A, Ozsvári B, Judák L, Sahin-Tóth M, Geisz A, Schnúr A, Maléth J, Takács T, Gray MA, Argent BE, Mayerle J, Lerch MM, Wittmann T, Hegyi P. (2011) Trypsin reduces pancreatic ductal bicarbonate secretion by inhibiting CFTR Cl⁻ channels and luminal anion exchangers. *Gastroenterology*, 141: 2228-2239.

Székely E, Törzsök P, Riesz P, Korompay A, Fintha A, Székely T, Lotz G, Nyirády P, Romics I, Tímár J, Schaff Z, Kiss A. (2011) Expression of claudins and their prognostic

significance in noninvasive urothelial neoplasms of the human urinary bladder. J Histochem Cytochem, 59: 932-41.

Kemény LV, Hegyi P, Rakonczay Z Jr, Borka K, Korompay A, Gray MA, Argent BE, Venglovecz V. (2011) Substance P inhibits pancreatic ductal bicarbonate secretion via neurokinin receptors 2 and 3 in the guinea pig exocrine pancreas. Pancreas, 40: 793-795.

A doktori munka témájától független magyar nyelvű publikációk:

Székely B, Langmár Z, Somlai K, Szentmártoni G, Szalay K, Korompay A, Szász AM, Kulka J, Bánhidly F, Dank M. (2010) A várandósság alatti emlőrák kezelése. Orv Hetil, 151: 1299-1303.

Székely B, Madaras L, Szentmártoni G, Szász AM, Baranyák Z, Szittya L, Torgyík L, Zergényi E, Borbényi E, Kenessey I, Korompay A, Langmár Z, Bánhidly F, Kulka J, Dank M. (2010) A fiatal- és időskori emlőrák összehasonlítása klinikopatológiai jellemzők alapján. MagyOnkol, 54: 19-26.

Kulka J, Tőkés AM, Tóth AI, Szász AM, Farkas A, Borka K, Járay B, Székely E, Istók R, Lotz G, Madaras L, Korompay A, Harsányi L, László Z, Rusz Z, Molnár BA, Molnár IA, Kenessey I, Szentmártoni G, Székely B, Dank M. (2009) Az emlődaganatok primer szisztémás kemoterápiára adott válasza az immunhisztokémiai fenotípus tükrében. Magy Onkol, 53: 335-343.

11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, Prof. Dr. Schaff Zsuzsának, hogy elfogadott tanítványának, és ittlétem alatt mindvégig gondja volt fejlődésemre – szakmailag és emberileg egyaránt. Sokat tanultam tőle; nemcsak az alaposságot és a tudományos igényességet, hanem a klasszikus értelemben vett 'orvos'-ságot is. Köszönöm, hogy az itt töltött három esztendő alatt biztosította számomra a technikai szükségleteken túl a kutatáshoz szükséges szakmai háttérrel, s hogy sokszor terelgetett az időközben felmerülő ötletek útvesztőjében.

Hálával tartozom Prof. Dr. Tímár Józsefnek, amiért lehetővé tette számomra, hogy az Intézetében eltöltött három év alatt betekintést nyerjek a kutatómunkába, és része lehessen az Intézetnek.

Nagyon köszönöm Dr. Kiss Andrásnak megismerkedésünk óta folyamatosan jelen lévő szakmai odafigyelését, építő kritikáit és gondos(kodó) jelenlétét. Külön hálás vagyok, hogy – bár végül a klinikumban találtam meg a helyemet – a mai napig is gyakran fordulhatok hozzá szakmai és emberi kérdésekben egyaránt.

Köszönettel és hálával tartozom Dr. Borka Katalinnak, hogy egyetemista koromban TDK-témavezetőmként, később PhD-konzulensemként mindig mindenben segítségemre volt; sokszor küzdött helyettem az én érdekeimért is.

Munkatársaim közül külön köszönöm Dr. Lotz Gábornak a fluoreszcens technikák elsajátításában nyújtott segítségét, Dr. Fintha Attilának és Dr. Szász A. Marcellnek a metszetdigitalizáláshoz adott tanácsait, Dr. Kenessey Istvánnak eredményeink statisztikai formába öntése során nyújtott segítségét, Dr. Schönfeld Tibornak, hogy informatikai kérdésekben mindig rendelkezésemre állt.

Szeretném megköszönni a vizsgálataink során használt minták rendelkezésre bocsátását Prof. Dr. Tihanyi Tibornak, Prof. Dr. Kupcsulik Péternek és Dr. Baranyai Zsoltnek, a néhány beteg túlélési adatainak biztosítását pedig Prof. Dr. Bodoky Györgynek.

Köszönöm PhD-hallgató társaimnak, Erdélyi-Belle Boglárkának, Dr. Patonai Attilának, Dr. Somorác Áronnak, Dr. Törzsök Péternek az együtt eltöltött időszakot, a kölcsönös segítségnyújtás elvét, a baráti beszélgetéseket és (nem mindig) szakmai vitákat.

Külön hálás vagyok Azumah Erzsébetnek, Gregor Viktóriának, Kálé Elvirának, Pekár Zoltánnénak, Sklánczné Samodai Erikának és Tordai Hedvignek, hogy nemcsak megtanították a szövettani technikák java részének ismeretét, hanem a három esztendő alatt mindig mindenben segítségemre voltak, sokszor munkaidőn kívül is.

Nagyon köszönöm Dr. Dank Magdolnának és Dr. Torgyík Lászlónak, hogy a klinikumot rajtuk keresztül ismerhettem meg, hogy elfogadtak kollégájuknak, és ottlétem alatt szakmai tudásuk legjavát osztották meg velem. Külön köszönöm, hogy megértették döntésemet, és azóta is mindenben támogatnak.

Hálával tartozom Dr. Iványi Zsoltnak, hogy az aktív klinikai munka mellett is biztosította számomra a dolgozat befejezésének lehetőségét, és mindenben támogatott, sokszor terelgetett, ösztönzött.

Köszönöm a SE II. sz. Patológiai Intézet és a SE-Aneszteziológiai és Intenzív Terápiás Klinika Kútvölgyi Részlege valamennyi dolgozójának a sok, sokszor aprónak tűnő segítségét, odafigyelését. Hogy bármikor, amikor segítséget kértem-kérek, mindig kaptam és kapok: ez nagyon jóleső érzés.

Hálás szeretettel köszönöm családomnak, barátaimnak a kitartó biztatást és bátorítást.