

MIKRO-RNS ÉS CLAUDIN EXPRESSZIÓ VIZSGÁLATA HUMÁN HEPATOCELLULÁRIS KARCINÓMÁBAN

Doktori értekezés

Dr. Gyöngyösi Benedek Ond

Semmelweis Egyetem
Patológiai Tudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Kiss András, D.Sc., egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Szentirmay Zoltán, Ph.D., egyetemi tanár
Dr. Katz Sándor, Ph.D., egyetemi tanársegéd

Szigorlati bizottság

elnöke: Dr. Sápi Zoltán, D.Sc., egyetemi tanár
tagjai: Dr. Bodánszky Hedvig, Ph.D., egyetemi magántanár
Dr. Simon Károly, Ph.D., osztályvezető főorvos

Budapest
2016

TARTALOMJEGYZÉK

1 - RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	- 4 -
2 - BEVEZETÉS	- 7 -
2.1 - Hepatocelluláris karcinóma.....	- 7 -
2.1.1 - Epidemiológia és rizikófaktorok	- 7 -
2.1.2 - Patomechanizmus.....	- 9 -
2.1.3 - Diagnosztika.....	- 10 -
2.1.4 - Patológiai megjelenés.....	- 11 -
2.1.5 - Kezelés	- 13 -
2.1.5.1 - Sorafenib (Nexavar®)	- 13 -
2.1.5.2 - Egyéb célzott terápiás lehetőségek a HCC kezelésében	- 16 -
2.2 - Mikro-RNS-ek.....	- 17 -
2.2.1 - A mikro-RNS-ek biogenezeise	- 17 -
2.2.1.1 - A klasszikus útvonal.....	- 18 -
2.2.1.2 - Az alternatív útvonal	- 20 -
2.2.2 - A mikro-RNS-ek lebomlása	- 20 -
2.2.3 - A mikro-RNS-ek hatásmechanizmusa	- 22 -
2.2.3.1 - A mikro-RNS-ek szerkezete.....	- 22 -
2.2.3.2 - Mikro-RNS-indukált poszttranszkripcionális géncsendesítés.....	- 23 -
2.2.3.3 - Mikro-RNS-indukált génaktiváció.....	- 26 -
2.2.4 - A mikro-RNS-ek elérhetősége rutin patológiai és citológiai mintákban	- 28 -
2.2.5 - A mikro-RNS-ek szerepe HCC-ben és a sorafenib terápiában	- 29 -
2.3 - Sejtkapcsoló struktúrák és claudinok	- 31 -
2.3.1 - Claudin-1	- 33 -
2.3.1.1 - Claudin-1 és HCV	- 34 -
2.3.2 - Claudin-2.....	- 34 -
2.3.3 - Claudin-3 és claudin-4	- 34 -
2.3.4 - Claudin-7.....	- 35 -
3 - CÉLKITŰZÉSEK	- 36 -
4 - ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	- 37 -
4.1 - Betegek és szövetminták	- 37 -
4.1.1 - Beteganyag I. – Sorafenib és HCC miRNS-ek	- 37 -
4.1.2 - Beteganyag II. – Claudinok és HCC	- 38 -
4.2 - Immunhisztokémia.....	- 39 -
4.2.1 - Immunhisztokémiai reakciók	- 39 -
4.2.2 - Az immunreakciók értékelése, morfológia	- 40 -
4.3 - Western blot	- 40 -
4.4 - mikro-RNS kifejeződés meghatározása kenetektől.....	- 41 -
4.4.1 - mikro-RNS izolálás citológiai kenetektől	- 41 -
4.4.2 - Reverz transzkripció és valós idejű PCR	- 41 -

4.6 - Statisztikai analízis.....	- 42 -
5 - EREDMÉNYEK	- 43 -
5.1 - Sorafenibbel kezelt HCC esetek mikro-RNS vizsgálata	- 43 -
5.1.1 - miRNS izolálás lehetőségének vizsgálata HCC FNAB mintákból.....	- 43 -
5.1.1 - A sorafenib kezelés előtti mikro-RNS expresszió és a klinikopatológiai jellemzők összefüggései	- 43 -
5.1.2 - A sorafenibbel kezelt betegek utánkövetése	- 47 -
5.2 - Reszekált HCC esetek claudin expressziós vizsgálata.....	- 50 -
5.2.1 - Immunhisztokémiai vizsgálatok eredménye	- 50 -
5.2.1.1 - Claudin-1 – Emelkedett expresszió cirrózisban és HCC-ben	- 51 -
5.2.1.2 - Claudin-7 – Emelkedett expresszió cirrózisban és HCC-ben	- 53 -
5.2.1.3 - Claudin-2 – Csökkent expresszió HCC-ben.....	- 54 -
5.2.1.4 - Claudin-3 – Változatlan expresszió cirrózisban és HCC-ben	- 55 -
5.2.1.5 - Claudin-4 – Az epeutakra és egy HCC altípusra korlátozódik	- 55 -
5.2.1.6 - A HCV hatása a vizsgált claudinok expressziójára.....	- 56 -
5.2.2 - Az immunreakciók specifitásának ellenőrzése Western blottal	- 58 -
5.2.3 - Claudin expresszió összevetése HCC differenciáltsági fokkal és túlélési adatokkal.....	- 59 -
6 - MEGBESZÉLÉS.....	- 61 -
7 - KÖVETKEZTETÉSEK	- 72 -
8 - ÖSSZEFOGLALÁS.....	- 73 -
9 - SUMMARY	- 74 -
10 - IRODALOMJEGYZÉK.....	- 75 -
11 - SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE.....	- 102 -
12 - KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	- 104 -

1 - RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ADAM	a disintegrin and metalloproteinase domain	CR	complete response
AFP	alfa fõtoprotein	cSL	cirrhotic surrounding liver
AG	Aktiengesellschaft	CT	computed tomography
Ago	Argonaute	CSDC2	cold shock domain containing protein C2
Akt	protein kinase B	DAB	diamino-benzidine
ARE	AU-rich element	DCP	decapping protein
Bcl-2	B-cell CLL/lymphoma 2	DCR	disease control rate
BCLC	Barcelona Clinic Liver Cancer	DGCR8	DiGeorge syndrome critical region gene 8
Bmf	Bcl2 modifying factor	DNS	dezoxiribonukleinsav
BSC	best supportive care	Drosha	drosha ribonuclease III
c-Abl	ABL proto-oncogene 1	E-	epithelial-cadherin
CAF1	chromatin assembly factor-1	cadherin	
CCR4	chemokine receptor 4	ECL	enhanced chemiluminescence
CD81	cluster of differentiation 81	ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
CDKN	cyclin-dependent kinase inhibitor complementer	EDTA	etilén-diamino-tetra-acetát
cDNS	dezoxiribonukleinsav	EGFR	epidermal growth factor receptor
cHCC	cirrhotic hepatocellular carcinoma	eIF4E	eukaryotic translation initiation factor 4E
CI	confidence interval	eIF4G	eukaryotic translation initiation factor 4E
c-Jun	proto-oncogene	EpCAM	epithelial cell adhesion molecule
c-Kit	proto-oncogene	ERK	extracellular signal-regulated kinase
cldn	claudin	Exp-5	exportin-5
c-MET	hepatocyte growth factor receptor	FFPE	formalin-fixed, paraffin-embedded
c-Myc	myelocytomatosis viral oncogene homolog	FGF	fibroblast growth factor
CPE	Clostridium perfringens enterotoxin		
Cq	quantitation cycle		

Flt-3	fms related tyrosine kinase 3	miRISC	miRNA induced silencing complex
FNAB	fine needle aspiration biopsy	miRNP	miRNA ribonucleoprotein particle
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	miRNS	mikro-RNS
Ge-1	enhancer of mRNA decapping 4	MR	magnetic resonance imaging
GTP	guanosine triphosphate	mRNS	messenger ribonukleinsav
GW test	glicin(G)-triptofán(W) test	mTOR	mammalian target of rapamycin
GW182	glicin(G)-triptofán(W) ismét-lődéseket tartalmazó protein	ncHCC	non cirrhotic hepatocellular carcinoma
HBV	hepatitis B virus	ncSL	non cirrhotic surrounding liver
HBx	hepatitis B x protein	NICE	The National Institute for Health and Care Excellence
HCC	hepatocellular carcinoma	NL	normal liver
HCV	hepatitis C virus	nt	nukleotid
HepPar-1	hepatocyte paraffin-1	NOT	deadeniláz komplex tagja
HGDN	high grade dysplastic nodule	OS	overall survival
HGF	hepatocyte growth factor	PABP1	polyadenylate-binding protein 1
HNF-1α	hepatocyte nuclear factor-1 α	PAZ	Piwi Argonaut Zwillie
HR	hazard ratio	P-body	processing body
HRP	horseradish peroxidase	PCR	polymerase chain reaction
hsp70	heat shock protein 70	PD-1	programmed cell death protein-1
JAM	junctional adhesion molecule	PDGFR	platelet-derived growth factor receptor
kDa	kilodalton	PFS	progression-free survival
K-W teszt	Kruskal-Wallis teszt	PI3K	phosphoinositide-3-kinase, foszfoinozítid-3-kináz
LGDN	low grade dysplastic nodule	PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
LRN	large regenerative nodule	PR	partial response
MAGI-1	membrane-associated guanylate kinase	pre-miRNS	prekurzor mikro-RNS
Mcl-1	myeloid cell leukemia 1	pri-miRNS	primer mikro-RNS
MEK	MAPK/ERK kinase		

PTEN	phosphatase and tensin homolog	SR-B1	scavenger receptor class B member1
Raf	rapidly accelerated fibrosarcoma	TCF-1	T cell factor-1
Ran	ras-related nuclear protein	TJ	tight junction
Ras	retrovirus-associated DNA sequences	TM	transzmembrán
RCK	DEAD box RNS helicase	TNFα	tumor necrosis factor- α
RET	proto-oncogene	TRAIL	tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand
RNáz	ribonukleáz	TRBP	TAR RNA binding protein
RNS	ribonukleinsav	TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethane
SD	stable disease	TU	transcriptional unit
SDS	sodium-dodecyl-sulphate	UTR	untranslated region
SHARP	Sorafenib Hepatocellular Carcinoma Assessment Randomized Protocol	VEGF	vascular endothelial growth factor
siRNS	kis interferáló ribonukleinsav	VEGFR	vascular endothelial growth factor receptor
SMAD4	SMAD family member 4	Wnt	wingless-type MMTV integration site family
		XRN-2	5'-3' exoribonuclease 2
		ZO-1	zonula occludens-1

2 - BEVEZETÉS

2.1 - Hepatocelluláris karcinóma

A hepatocelluláris karcinóma (HCC) a máj primér daganatainak több mint 80-90%-át teszi ki [1], világszerte a hatodik leggyakoribb rosszindulatú daganat, mely évente mintegy 782 ezer embert érint [2]. Habár az utóbbi időben egyre jobban és jobban megismerjük ezt a daganattípust, a HCC egyike azon daganatoknak az Egyesült Államokban és Kanadában, melynek halálozása továbbra is nő [3]. Mindemellett a HCC a korábbi harmadik helyről a második helyre került a leggyakoribb daganatos halálokok listáján világszerte [2, 4]. Agresszivitását jól mutatja, hogy a betegek diagnózistól számított medián túlélése 6-9 hónap között mozog, az 5 éves túlélés pedig mindössze 20%-os [5].

2.1.1 - Epidemiológia és rizikófaktorok

A HCC előfordulási gyakorisága jelentős földrajzi különbségeket mutat. Ez alapján megkülönböztethetünk magasabb (pl. Afrika, Kína, Tajvan) és alacsonyabb incidenciájú területeket (pl. Európa, Észak- és Dél-Amerika) [6]. A HCC esetek >80%-a a magas incidenciájú területeken fordul elő, az összes eset kb. 50%-a Kínában [7]. Érdekes módon az utóbbi időkben a magas incidenciájú területeken csökkenő, míg az alacsonyabb érintettségű területeken emelkedő tendenciák figyelhetők meg előfordulásában. A pontos okok nem teljesen tisztázottak, de például az ázsiai területeken bevezetett hepatitisz B vírus elleni vakcináció biztosan közrejátszott az ott megfigyelhető pozitív változásban, míg a növekvő tendenciák mögött a HCV elterjedtsége, valamint a nem alkoholos zsírmáj gyakoriságának emelkedése állhat a fejlett országokban [8].

Etiológiájában számos endogén és környezeti rizikófaktor szerepel, melyeket az **1. táblázat** mutat. A HCC esetek nagy többsége (>70%) cirrózis talaján alakul ki, premalignus elváltozásokból, többlépcsős folyamat eredményeképp [9]. Ennek fényében minden olyan környezeti, fertőzőes vagy genetikai ártalom, mely májcirrózis kialakulásához vezet, a HCC kialakulására is predisponál. Míg a magas HCC

incidenciájú területeken a HBV fertőzés a vezető kóroktani tényező, addig a kevésbé érintett területeken a HCV fertőzés és az alkoholos májbetegség a legfőbb kórok [10]. Fontos megemlíteni, hogy ezeken a területeken a cukorbetegség, valamint az elhízás és metabolikus szindróma talaján kialakuló zsírmáj és szteatohepatitisz is egyre inkább szerepet játszik a HCC incidenciájának növekedésében [10].

Ismert, hogy férfiakban 2-4-szer gyakoribb az előfordulás, mint nőkben. Ez egyrészt a férfiak nagyobb arányú rizikófaktoroknak való kitettségének (dohányzás, alkohol, HBV, HCV fertőzés), valamint direkt androgénhatásnak tudható be [7].

Ezek mellett számos, kevésbé gyakori etiológiai tényező is ismert, úgymint hemokromatózis, aflatoxin mérgezés, pajzsmirigy-alulműködés, stb.

1. táblázat – A HCC ismert rizikófaktorai (Mazzanti és mtsai. 2016 alapján) [10]

Gyakori:

- Kor
- Etnikum
- Férfi nem
- Májcirrózis
- Krónikus HBV fertőzés
- Krónikus HCV fertőzés
- Alkoholizmus
- Zsírmáj
- Nem alkoholos eredetű szteatohepatitisz
- Elhízás, metabolikus szindróma
- II-es típusú cukorbetegség

Ritkább:

- Anabolikus hormonok
- Ösztrogén tartalmú fogamzásgátlók
- Hemokromatózis
- Aflatoxin-B1 mérgezés
- Tirozinémia, galaktozidémia, fruktozémia
- Alfa-1 antitripszin hiány
- Genetikai faktorok
- Pajzsmirigy-alulműködés

2.1.2 - Patomechanizmus

A HCC kialakulása a legtöbb esetben hosszú, akár több évtizedig is eltartó folyamat, melyet az esetek döntő többségében a krónikus májkárosodás talaján bekövetkező megváltozott mikrokörnyezet, gyulladásos folyamatok és fibrózis indítanak be, melyek hatásaként számos jelátviteli útvonal károsodik. Mindezek mellett a genetikai alterációk felhalmozódása is közrejátszik a malignus elfajulás kialakulásában [11]. Habár az elmúlt évtizedekben számos, a HCC molekuláris patogenezisében fontos útvonalat sikerült azonosítani, pontos, átfogó mechanizmust nem sikerült egyértelműen kimutatni. Ez egyrészt az etiológiai faktorok különbözőségének tudható be, vagyis annak, hogy milyen talajon alakul ki a daganat (a HBV például DNS vírusként a genomba beépülve inzerciós mutagenézissel, valamint a HBx-proteinen keresztül vezethet malignus elfajuláshoz [12], míg a HCV fehérjéin keresztül képes a gazdasejtek jelátviteli útvonalaival interferálni [13]). Másrészt nagymértékben köszönhető a daganatok igen nagyfokú heterogenitásának, mely megmutatkozhat a különböző tumornodulusok között, de még egyazon noduluson belül is. A máj ovális sejtjeiből kialakuló daganatos őssejt-teória magyarázhatná e nagyfokú heterogenitást, azonban mindeztidáig nem sikerült meggyőzően azonosítani ezen sejteket [14]. Ami egyértelműnek tűnik, az a májparenchyma cirrotikus átalakulásának szerepe, hiszen a krónikus hepatitisz fertőzések vagy alkoholfogyasztás önmagukban viszonylag csekély módon emelik a HCC rizikóját, míg a cirrózis megjelenésével exponenciálisan nő a daganat kialakulásának valószínűsége [7].

Többféle mechanizmust is felfedeztek, melyek a májrák kialakulását támogatják a cirrózis stádiumában. A telomér felgyorsult rövidülését mutatták ki például krónikus májbetegségekből, mely előregedett hepatocyták felhalmozódásához vezet cirrózisban, valamint a telomér diszfunkció kromoszomális instabilitást is eredményez, melyek a HCC kialakulásához szolgáltatnak jó alappal [15]. Emellett a telomér rövidülés a hepatocyták csökkent proliferációjához is vezet, mely mellett az abnormálisan proliferáló májsejtek hamar lépéselőnybe kerülhetnek [7]. Annál is inkább, mert a HCC daganatsejtekben éppen ellenkezőleg, a telomeráz komplex reaktivációja történik, lehetővé téve ezen sejtek korlátlan proliferációját [16]. Továbbá a cirrózisban létrejövő parenchymavesztést ellensúlyozandó visszacsatolós mechanizmusok útján

növekedési faktorok, gyulladásos citokinek aktiválódnak, melyek mind elősegíthetik egy autonóm fókusz növekedését is [7].

Ezen általánosabb mechanizmusok mellett számos tumorsuppresszor és onkogén megváltozott működését, valamint számos jelátviteli útvonal károsodását is leírták HCC-ben. A Wnt/ β -catenin, a p53 és a foszfatidilinozitol-3-kináz (PI3K) útvonalak nagyon gyakran érintettek, melyek sokszor az etiológiára is engednek következtetni [17]. Az angiogenezisért felelős VEGF és FGF útvonalak is fontos szerepet játszanak; a HCC-s esetek 50%-ában kimutatható továbbá az PI3K/Akt/mTOR útvonal aktiválódása VEGFR, PDGFR, EGFR tirozin-kináz receptorokon keresztül [10]. A Ras/Raf/MEK/ERK jelátvitel érintettsége mellett kimutatták a HGF tirozin-kináz receptorának (c-MET) túlműködését is, mely terápiás célpontként is hasznosíthatónak tűnik [18].

2.1.3 - Diagnosztika

A HCC korai diagnosztikája sajnos gyakran nehéz feladat, hiszen a betegek a tünetszegény kórlefolysis miatt legtöbbször csak későn jelentkeznek, valamint leggyakrabban egy már cirrotikusan átalakult, göbös májparenchymában kell a daganatos gócot felfedezni. A cirrózisban szenvedő betegek szorosabb utánkövetésével, monitorozásával, valamint a nem-invazív képalkotó eljárások fejlődésével remélhetőleg ebben javulás lesz tapasztalható. A cirrótikus betegek utánkövetésének fontosságát emeli ki az a nemrégiben megjelent kutatás, mely a halálozási esélyek 38%-os csökkenését találta azon betegeknél, akik a HCC diagnózisa előtti 2 évben legalább egy képalkotó vizsgálaton átestek [19].

Az jelenlegi diagnosztikus ajánlások cirrotikus betegekben a vizsgált lézió nagyságán alapszanak, melyet első lépésben hasi ultrahangvizsgálattal állapítanak meg [3, 20]. Mivel az 1 cm-nél kisebb léziók esetén kicsi a HCC valószínűsége, ezért ilyen esetekben csak a betegek rendszeres, félévenkénti ultrahangos utánkövetése javasolt. Az 1 cm-nél nagyobb léziók esetén képalkotó vizsgálatokkal is lehetséges diagnózist felállítani (multidetektoros, dinamikus CT vagy MR), azonban csak abban az esetben, ha a HCC-re karakterisztikus érrajzolat egyértelműen kimutatható. Két cm-nél nagyobb tumorok esetén ehhez elegendő egy dinamikus képalkotó, 1-2 cm közötti daganatok

esetén két különböző dinamikus képalkotó egybehangzó leletei szükségesek. Fontos, hogy atípusos érrajzolat esetén mindig kötelező a diagnosztikus mintavétel core-biopsziával vagy vékonytű aspirációval. A magyarországi ajánlások szerint továbbá az 1 cm-nél nagyobb elváltozásokból mindenképpen indokolt citológiai vagy hisztológiai vizsgálat, mert nem áll rendelkezésre a dinamikus képalkotás összes lehetősége [21]. Nem cirrotikus májban kialakult tumorok esetén szintén a patológiai mintavétel a javasolt diagnosztikai eljárás.

Szérum markerek tekintetében továbbra sem rendelkezünk olyan tumormarkerrel, mely megfelelő specificitással és szenzitivitással rendelkezve, önmagában megbízhatóan diagnosztizálná a HCC-t. A legismertebb és arany standardként elfogadott alfa-fötóprotein (AFP) mellett mára további szérum markerek is bekerültek a diagnosztikus palettába (pl. dez- γ -karboxiprotrombin, fukozilált AFP) [22], de ezek is inkább a betegség követésében illetve a klinikai döntéshozatalban nyújthatnak nagy segítséget.

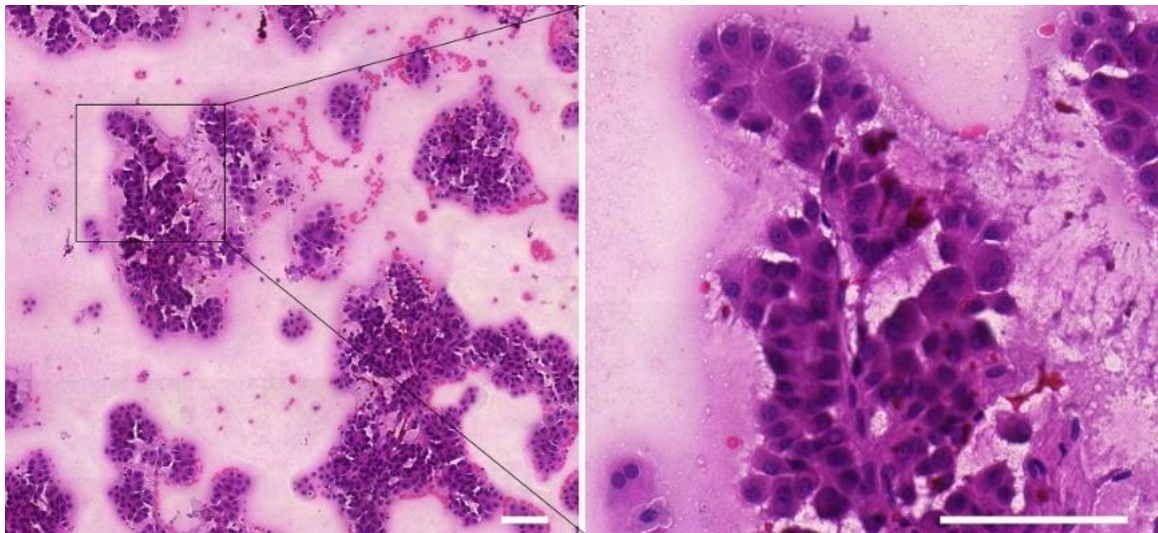
2.1.4 - Patológiai megjelenés

A cirrózis talaján jelentkező HCC-k kialakulásának első lépcsője a premalignus elváltozásnak tekinthető kissejtes *diszplasztikus fókuszok* megjelenése, melyek 1 mm-nél kisebb átmérőjűek. Az ún. *diszplasztikus nodulusok* már 1 mm feletti, makroszkóposan is észlelhető nagyságúak, melyek expanzív növekedésüknél fogva általában jól elhatárolódnak a környező májszövetből. A bennük észlelhető strukturális vagy sejttípus alapján különíthető el az alacsony (LGDN) és magas grádusú diszplasztikus nodulus (HGDN), melyeket néha nehéz elkülöníteni az ún. nagy regeneratív nodulustól (LRN), mely azonban nem tekinthető premalignus elváltozásnak [9].

A spektrum következő pontján a már valóban malignus *kis HCC* áll, mely definíció szerint a 2 cm-nél kisebb tumorokat öleli fel. Ezen csoporton belül klinikopatológiai szempontból jól elkülöníthető az ún. korai HCC és a *progredivált HCC*. A *korai HCC* általában magasan differenciált és szabálytalan noduláris megjelenésű, melyet szinte csak a strómális invázió különít el a HGDN-től, míg a *progredivált HCC* szabályosan noduláris, általában közepesen differenciált daganat, gyakori mikrovaskuláris invázióval [23].

A klasszikus, kifejezett HCC-k növekedési mintázata szerint makroszkóposan noduláris, masszív és diffúz formákat ismerünk. A valódi tok ritka, gyakori azonban az expanszió során összenyomott környező májszövet által alkotott áltok. Klinikai döntésekben fontos és sajnos gyakori jelenség az nagyérinvázió jelenléte. Mikroszkóposan trabekuláris, acináris, szcirrózus, szolid, világos sejtes, fibrolamelláris, kis sejtes, valamint kevert kolangio-hepatocelluláris formák különíthetők el [9].

HCC-re jellemző vonások továbbá *vékonytű aspirációs mintákon* a kenet szemcsézettsége, a vastag, >2 sejtsort tartalmazó, faágszerűen elágazódó megjelenés, atípusos csupasz sejtmagok, esetenként epe, intracitoplazmatikus zsírcseppek és glikogén, valamint a tumorsejt aggregátumokat átszelő, ún. transzgresszív endotélium jelenléte [24]. (1. ábra)



1. ábra – Hepatocelluláris karcinóma vékonytű aspirációval nyert mintájának reprezentatív képe. (Saját ábra, lépték = 100 μ m.)

A szövettani markerek közül a hsp70, glypican-3, glutaminszintetáz immunhisztokémiai vizsgálata segíthet a HCC diagnózis felállításában kérdéses esetekben, hiszen a hátról kettő pozitivitása esetén biztos a malignitás diagnózisa [25]. Ezek mellett fontos diagnosztikus segítséget jelenthetnek még a hepatocytaspecifikus antitest (HepPar), a survivin, citokeratinok, carcinoembrionális antigén, agrin, syndecan-1, egyes claudinok és vaszkuláris markerek.

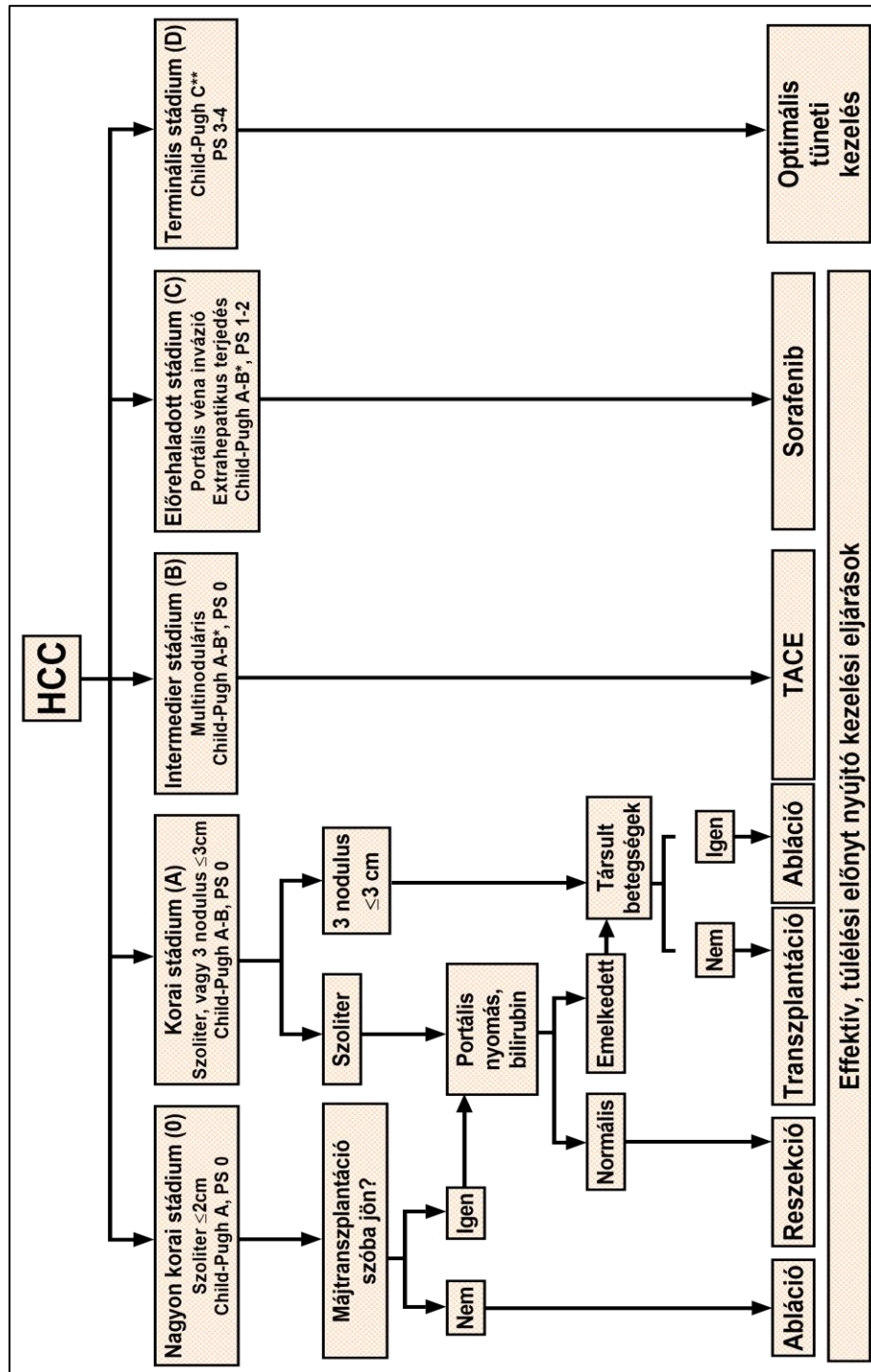
2.1.5 - Kezelés

A HCC-vel jelentkező betegek kezelése a mai napig kihívás elé állítja a kezelőorvosokat, akik lehetőség szerint multidiszciplináris csapat tagjaiként hozzák meg klinikai döntéseiket. A HCC kezelési lehetőségei két csoportra oszthatók: potenciálisan kuratív, valamint palliatív kezelésekre [10]. Előbbi csoportba tartoznak a sebészi reszekció, a transzplantáció, valamint az ablációs beavatkozások. Ezen lehetőségek – habár nagyon jó túlélési rátákat érhetnek el velük – csak korai stádiumú, kevésbé kiterjedt esetekben alkalmazhatók. Fontos megjegyezni, hogy a HCC-s betegek csak mintegy 15-35%-a kezelhető sebészileg, melynek oka, hogy a korszerű diagnosztika ellenére a HCC-k nagy része továbbra is csak későn, már előrehaladott stádiumban kerül diagnózisra. Ezen esetekben a már említett palliatív ellátás jöhet szóba, úgymint a transzarteriális beavatkozások (embolizáció, kemoperfúzió, vagy kemoembolizáció), illetve a célzott terápia sorafenib segítségével.

A pontos kezelési algoritmus tehát nagyban függ a betegség stádiumától, melyet különböző szakmai kritériumok alapján állapítanak meg. A leggyakrabban használt BCLC (Barcelona Clinic Liver Cancer) kritériumrendszer nagy előnye, hogy nem csak a tumor előrehaladottságát, hanem a beteg teljesítőképességét, valamint májfunkcióit is számításban veszi [3]. A pontos stádiumokon alapuló kezelési algoritmus a **2. ábrán** látható.

2.1.5.1 - Sorafenib (Nexavar®)

Előrehaladott stádiumú betegek esetében sokáig csak a palliatív kezelés jöhetett szóba, hiszen a hagyományos kemoterápiás szerek nem biztosítottak szignifikáns túlélési előnyt. A legaktívabb szer – a doxorubicin – is csak 10% körüli részleges remissziót tudott biztosítani, továbbá a kombinált és egyéb kezelések sem javítottak a betegek túlélésén [26]. A sorafenib (Nexavar®, Bayer Pharma AG) bevezetése terápiás mérföldkövet jelentett az előrehaladott stádiumú HCC-s betegek kezelésében, hiszen ez volt az első szisztémás, molekulárisan célzott terápia, mely szignifikáns mértékben növelte a betegek túlélését [27]. Bevezetését követően a sorafenib lett a más terápiás modalitásokkal már nem kezelhető, előrehaladott stádiumú betegek elsővonalbeli kezelése.



2. ábra – A hepatocelluláris karcinóma kezelési algoritmus (Bruix és mtsai. 2016 alapján) [3]

A sorafenib hatásosságát mind a nyugati, mind a keleti populációkban, tehát eltérő etiológiájú régiókban bizonyították. A 2008-as, európai, amerikai és ausztrál összefogással végbevitt SHARP (Sorafenib Hepatocellular Carcinoma Assessment Randomized Protocol) tanulmány 602 előrehaladott stádiumú, még nem kezelt HCC-s beteget vont be randomizált, kettős vak, placebokontrollált, fázis III vizsgálatába [27]. A

betegek Child-Pugh 'A' májfunkciókkal, <2 ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) teljesítőképességi státusszal és döntően HCV-s etiológiával rendelkeztek. A sorafenibbel kezelt betegek szignifikánsan hosszabb teljes túlélést mutattak (10,7 hónap) a placebóval kezelt betegekhez mérten (7,9 hónap), míg a radiológiai progresszióig eltelt medián idő is megkétszereződött a placebóval kezelt betegekhez képest (5,5 hónap vs. 2,8 hónap). A későbbi, ázsiai betegpopuláción végzett Asia-Pacific vizsgálat megerősítette a SHARP tanulmány eredményeit, szignifikáns túlélési előnyt mutatva egy döntően HBV etiológiájú HCC-s populáción is [28].

Ezen szisztémás, célzott terápia valódi mérföldkő jellegét jól mutatja, hogy habár a sorafenib csak 3 hónappal hosszabb túlélést biztosított a betegeknek, mégis a SHARP vizsgálat volt az első azon korábbi, az elmúlt 30 évben történt kb. 100 randomizált tanulmány közül, mely egyáltalán túlélési előnyt mutatott előrehaladott HCC-ben [5].

A sorafenib terápiás dózisa napi 2 x 400 mg szájon át. A mellékhatások között leggyakoribbként a hasmenés, kimerültség, alopecia, fertőzés, kéz-láb bőrreakció, kiütések és hipertónia szerepelnek.

Molekuláris hatásmechanizmus szempontjából a sorafenib multi-kináz inhibitornak tekinthető. Eredetileg a Raf-1 (C-Raf) kináz gátlásán keresztül a Ras / Raf / MEK1/2 / ERK1/2 útvonalat célozva fejlesztették ki [29], azonban később számos más szerin/treonin- és tirozin-kináz receptorról kiderült, hogy a sorafenib targetje: B-Raf, *b-rafV600E*, VEGFR-1,2,3, PDGFR- β , FGFR-1, Flt-3, c-Kit, RET [30]. Ezen túlmenően kináz független hatásmechanizmusai is ismertek, például a mitokondriális légzési lánc stabilitásának csökkentése és oxidatív stressz kiváltása [31].

Sajnos a sorafenib terápia jelentős költségekkel jár (egy kínai tanulmány a sorafenib kezelés költségeit \$19495 dollárra becsülte a \$897 dolláros optimális tüneti kezeléssel (BSC – best supportive care) összevetve [32]), és a betegek nagy hányadában a daganat a kezelés ellenére is progrediál. Az eredeti SHARP és Asia-Pacific tanulmányokban is a betegség kontroll arány (DCR (disease control rate) = CR (complete response) + PR (partial response) + SD (stable disease)) mindössze 43%- és 53%-osnak bizonyult, ami azt jelenti, hogy a betegek kb. fele egyáltalán nem reagál a sorafenib kezelésre [27, 28].

Több próbálkozás is történt olyan biomarkerek azonosítására, melyek előre jeleznék a HCC-s betegek sorafenibre adott válaszkészségét. A PDGFR- β és c-Met expressziója szignifikáns összefüggést mutatott a sorafenib-kezelt betegek progressziójával és a terápia hatásosságával [33], míg az Mcl-1 és pERK kifejeződése a teljes túléléssel korrelált [34]. Más lehetséges prediktív markerekként például a c-Jun N-terminális kináz aktivációját [35], a szérum kolinészteráz emelkedett szintjét [36], a plazma VEGF koncentrációt és a VEGF – VEGFR gén polimorfizmusokat említhetjük [37].

Ezen próbálkozások ellenére mindmáig nem rendelkezünk olyan széles körben elfogadott és validált prediktív biomarkerrel/ekkel, melyek megbízhatóan előre tudnák jelezni a sorafenibre adott terápiás választ. Ezen hiány további, ilyen irányú kutatásokat tesz indokolttá.

2.1.5.2 - Egyéb célzott terápiás lehetőségek a HCC kezelésében

Jelenleg számos kutatás zajlik a sorafenib-nél hatékonyabb terápiás szerek azonosítására. Ezek többsége fázis I-es vagy II-es vizsgálatokban történik, azonban már fázis III-as vizsgálatok is történtek, illetve zajlanak. Több gyógyszert is vizsgáltak elsővonalbeli szerként mind önálló, mind a sorafenibbel való kombinációs alkalmazásban, valamint másodvonalbeli, azaz hatástalan sorafenib terápia utáni kezelési lehetőségként egyaránt. Sajnálatos módon az eddig lezárult vizsgálatok többsége nem mutatott szignifikánsan jobb túlélési rátákat a sorafenibhez képest, például sunitinib, brivanib, linifanib, sorafenib+erlotinib, sorafenib+everolimus [38], másodvonalbeli brivanib, ramcicirumab, everolimus (lásd [39]). A jelenleg zajló fázis III-as vizsgálatok közül a nivolumabbal (PD-1 gátló immunmodulátor monoklonális antitest) (clinicaltrials.gov NCT02576509), a regorafenibbel (multi-kináz inhibitor) (RESORCE trial, clinicaltrials.gov NCT01774344), illetve a tivantinibbel (c-Met inhibitor a MET-et magasan expresszáló HCC-k esetén hatékony) (METIV-HCC trial, clinicaltrials.gov NCT01755767) történő kezelések mutatkoznak a legígéretesebbnek.

Mindemellett azonban jelen pillanatban a sorafenib továbbra is az egyetlen, validált, túlélési előnyt nyújtó, elsővonalbeli kezelés az előrehaladott stádiumú HCC-ben szenvedő betegek számára.

2.2 - Mikro-RNS-ek

A mikro-RNS-ek a nem kódoló RNS-ek családjába tartozó, rövid, mindössze 19-23 nukleotid hosszúságú, kis, egyszálú RNS-molekulák, melyek a génexpresszió poszttranszkripcionális szabályozásában töltenek be kulcsszerepet.

Becslések szerint az állati gének kb. 1%-a kódol miRNS-t [40], és a humán gének 30%-a (egyések szerint akár 60%-a) áll feltételezhetően miRNS-mediált szabályozás alatt [41, 42], ami a nagy, szabályozó molekulacsaládok körébe emeli őket. Számos biológiai fontos folyamatban mutatták ki kritikus szabályozó szerepüket: egyedfejlődés ütemezése, organogenezis, sejtproliferáció, sejt differenciáció, apoptózis, jelátviteli útvonalak, hemopoiesis, gazdasejt-vírus interakció, karcinogenezis, stb.

Mára több, mint 2500 humán miRNS-t azonosítottak, de újabb és újabb tagok felfedezésére is lehet számítani különféle bioinformatikai algoritmusok előrejelzései szerint [43].

A mikro-RNS-ek az RNS interferencia enzimrendszerét felhasználva szintetizálódnak két ribonukleáz aktivitású protein közreműködésével: a Drosha nevű enzim a sejtmagon belüli, a Dicer nevű pedig a citoplazmában történő módosításokért felelős. Jellegzetességük, hogy a mikro-RNS-ek prekursor molekulái kettős szálúak, szemben az egyszálú hírvivő RNS-sel. Az érett, egyszálú mikro-RNS-eket később az Argonaute (Ago) családba tartozó fehérjék kötik meg, és együtt épülnek be az ún. RISC effektor komplexbe (ld. később).

2.2.1 - A mikro-RNS-ek biogenezise

Genomiális lokalizációjuk szerint a miRNS gének elhelyezkedhetnek proteinkódoló és nem kódoló transzkripciós egységeken belül (transcriptional unit, TU): ~40%-uk nem kódoló TU-k intronjaiban, ~10%-uk ugyanezek exonjaiban foglal helyet. A proteinkódoló TU-kban található miRNS gének nagy része intronikus lokalizációjú, mely az összes lókuszok ~40%-át teszi ki [44]. A miRNS gének ~80%-a tehát intronon belül helyezkedik el [45].

Egy további csoportosítás szerint az ismert emlős miRNS gének kb. 50%-a található más miRNS lókuszok szoros közelségében, mely clusterek aztán egyetlen policisztronos transzkriptumként íródnak át [46]; egyes esetekben azonban előfordulhat autonóm miRNS-ek saját promoterről való átírása is [47].

Attól függően, hogy a miRNS előállítása független miRNS génről, avagy kis intronról indul el, kétféle útvonalat írtak le: a 'klasszikus' és az alternatív utat. **(3. ábra)**

2.2.1.1 - A klasszikus útvonal

A miRNS-biogenezis klasszikus (avagy kanonikus) útjának első lépése, a miRNS gének transzkripciója RNS polimeráz II által mediált folyamat [47, 48]. Mindemellett megemlítendő, hogy lehetséges a miRNS gének egy kis, Alu szekvenciákkal kapcsolatban lévő csoportja esetében az RNS polimeráz III általi átíródás is [49]. Az RNS polimeráz II által létrehozott transzkriptum egy több kilobázis hosszúságú, hajtű formájú, poli-A farokkal és 7-metil-guanozin sapkával rendelkező primer-miRNS (pri-miRNS) [50].

A pri-miRNS továbbalakítását a Drosha nevű, III-as típusú endoribonukleáz végzi [51], mely processzási folyamat már a transzkripcióval egyidejűleg megkezdődik [52]. A Drosha egy kb. 160 kDa nagyságú, magas szintű evolúciós konzerváltságot mutató fehérje, mely két RNáz III katalitikus doménnel és egy RNS-kötő doménnel rendelkezik [51]. Emlősökben a Drosha target felismerésében a DGCR8 kofaktor segítkezik, mely a duplaszálú RNS-kötő fehérjék családjába tartozik [53]. A két fehérje együtt alkotja az effektor mikroprocesszor komplexet [54]: ez a pri-miRNS-ből az ún. törzs-hurok (stem loop) kihasításával hozza létre a kb. 70 nt hosszúságú prekuzort, a pre-miRNS-t.

Fontos megjegyezni, hogy egyes intronokba lokalizálódó miRNS-ek biogenezise is ezt a klasszikus utat követi: a Drosha általi hasítás itt még a splicing befejezte előtt megtörténik. Megfigyelték, hogy az ilyen, miRNS-eket tartalmazó intronok splicing-ja sokkal lassabban megy végbe, mint a szomszédos intronoké [44].

Következő lépésként a pre-miRNS-eknek a sejtmagból a citoplazmába kell kerülniük további processzációra. Ezt az exportot a RanGTP-dependens, nukleáris transzport receptor családba tartozó Exportin-5 (Exp-5) nevű fehérje mediálja [55]. Az Exp-5 a pre-miRNS-ek 3' túlnyúló részét ismeri föl, ezt követi a Ran kofaktor GTP-kötő

formájának csatlakozása, majd maga a transzport. A folyamat a GTP hidrolízisével a citoplazmában fejeződik be: a komplexet elhagyja a prekursor [56]. Az Exp-5 feladata azonban nem merül ki csupán a transzportban: kutatások azt sugallják, hogy szerepet játszik a pre-miRNS-ek stabilizációjában is [57].

A citoplazmában a pre-miRNS-ek továbbalakítását egy újabb III-as típusú RNáz, a Dicer nevű enzim katalizálja, létrehozva a kb. 22 nt nagyságú miRNS duplexeket [58, 59]. Sejtmagbéli párjához hasonlóan, a Dicer is egy nagy (~200 kDa), szinte minden eukarióta szervezetben megtalálható homológokkal rendelkező [60], endonukleáz aktivitású enzim, mely kofaktorokkal komplexet alkotva fejti ki hatását. A Dicer az RNáz III aktivitású és RNS-kötő doménjei mellett PAZ doménnel is rendelkezik, melynek kulcsfontosságú szerepe van a pre-miRNS 3' túllógó végének megkötésében [61]. A Dicer specifikusan a hajtű alakú pre-miRNS Drosha által definiált végétől kb. 22 nt távolságra végez aszimmetrikus hasítást, eltávolítva a hurok (loop) részt, és így létrehozza a miRNS duplex másik végét [40]. A Dicernek és kofaktorainak ezen túl még fontos szerepe van más proteinnel közreműködve a miRISC (miRNA induced silencing complex) vagy más néven miRNP (miRNA ribonucleoprotein particle) kialakításában.

A miRISC ribonukleoprotein komplex megjelenése egy soktényezős, dinamikus szerveződő folyamat, melynek minden részlete még ma sem tisztázott. Valószínűleg a Dicer általi hasítás után a miRNS/miRNS* duplex egyik végét a TRBP, míg másik végét az Argonaute (Ago) családba tartozó proteinek kötik meg. A duplex két szála közül végül csak az egyik épül be a végső effektor komplexbe, ez a vezető szál (guide strand) vagyis az érett, ~22 nt nagyságú, egyszálú miRNS. Általában az a szál marad meg, amelyik 5' végénél nagyobb a bázispárosodás termodinamikai instabilitása [62]. A kísérő szál (passenger strand, miRNS*) legtöbbször degradálódik, bár leírtak eseteket, melyeknél felhasználódását is megfigyelték [63].

Bizonyos, hogy az Argonaute (Ago) családba tartozó proteinek központi szerepet játszanak a miRISC komplex életében mind strukturális, mind funkcionális szempontból. Emlősökben négy Ago proteint írtak le, AGO1 – AGO4-ig [64], melyek közül az AGO2-nek erőteljes endoribonukleáz aktivitása van [65]. (Az Ago családból ez az egyetlen olyan fehérje, ami jelen van az siRNS útvonal RISC komplexében is, az siRNS által felismert mRNS elhasítását mediálva [66].) Kimutatták, hogy ez az endoribonukleáz (slicer,

szeletelő) aktivitás felelőssé tehető a kísérő miRNS* szál degradációjáért [67]. A másik három Ago protein nem rendelkezik ilyen katalitikus aktivitással: ezekben az esetekben egy, még ismeretlen helikáz csavarja szét a duplex szálait, és távolítja el a kísérő szálát [44]. Ezt figyelembe véve az is megállapítható, hogy az RNáz aktivitással nem rendelkező Ago proteinek nem képesek a target földarabolására, és ez csak az AGO2-t tartalmazó miRISC-ek esetében lehetséges. Gerinceseknél az mRNS hasítása azonban legtöbbször ez utóbbi esetben sem történik meg, az állati miRNS-ek később ismertetett szerkezetéből adódóan [68].

2.2.1.2 - Az alternatív útvonal

A hagyományos útvonal mellett létezik állatokban egy másik miRNS bioszintézis lehetőség is, amely proteinkódoló gének kis intronjairól, az ún. mirtronokról indul [69, 70]. A mirtonokról a splicing során jellegzetes lasszó alakú struktúrák keletkeznek [71, 72], melyekről hiányoznak azok a szegmensek, amelyeket a Drosha/DGCR8 föl tud ismerni. Ezen lasszó alakú struktúrákból aztán egy debranching enzim (lariat-debranching enzim [73]) és más módosulások hatására keletkezik a pre-miRNS, mely ezután csatlakozik a már ismertetett útvonalhoz.

A fő eltérés tehát a klasszikus és az alternatív mirtron bioszintetikus út között az, hogy utóbbihoz nem szükségeltetik a Drosha általi katalízis [74]. Ma még nem tisztázott, hogy a mirtron útvonal mekkora jelentőséggel bír; valószínűnek tűnik, hogy egy ősi bioszintetikus útvonalat jelenít meg, még a Drosha megjelenése előtti időkből [70].

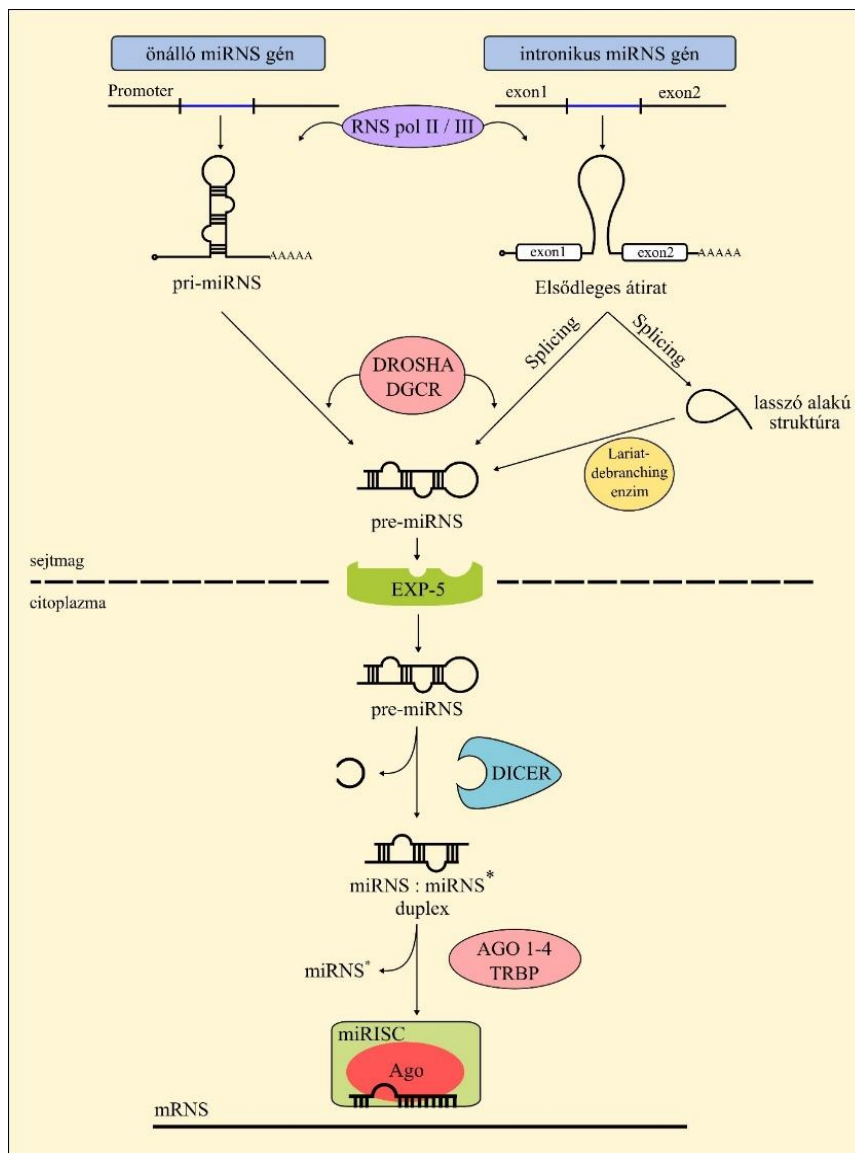
2.2.2 - A mikro-RNS-ek lebomlása

A miRNS-ek biogenezésével ellentétben, a miRNS-ek bomlása viszonylag kevesebb figyelmet kapott mindezidáig. Úgy tűnik, hogy léteznek lassú, illetve gyors turnover-ű miRNS-ek: előbbieket például májban és szívben figyelték meg [75, 76] (több órás vagy akár napos féléletidő), utóbbiakat a retina neuronjaiban [77] (kb. 1 órás féléletidő).

A miRNS-turnover szabályozásának egyik lehetséges módja azok 3' végének modifikációja: adenilálásuk, uridilációjuk vagy metilálásuk nagyobb stabilitást ad nekik,

vagy éppen ellenkezőleg, degradációjukat idézi elő - az adott miRNS-től és az adott szövegtől függően [78].

Az érett miRNS-ek degradációját katalizáló enzimek az exoribonukleáz családba tartoznak: *C. elegans*-ban az XRN-2 5'–3' irányban aktív [79]. Fontos, hogy a komplexben lévő miRNS-hez az exonukleáz nem fér hozzá [79]; a target mRNA hiányában azonban a miRNS disszociál a miRISC-ről és így elérhetővé válik az XRN-2 számára, ami a miRNS bomlását okozza [78]. Az ily módon szabaddá vált Ago protein azután újabb miRNS-sel képezhet komplexet.



3. ábra – A miRNS-ek biogenezise (saját ábra). Az önálló vagy intronikus miRNS gén az RNS polimerázok általi átírás után a Drosha vagy lariat-debranching enzim közreműködésével alakul pre-miRNS-sé, mely az exportin-5 segítségével jut a citoplazmába, ahol a Dicer hasítja tovább miRNS duplexszé, melynek egyik tagja beépül az effektor miRISC komplexbe.

2.2.3 - A mikro-RNS-ek hatásmechanizmusa

2.2.3.1 - A mikro-RNS-ek szerkezete

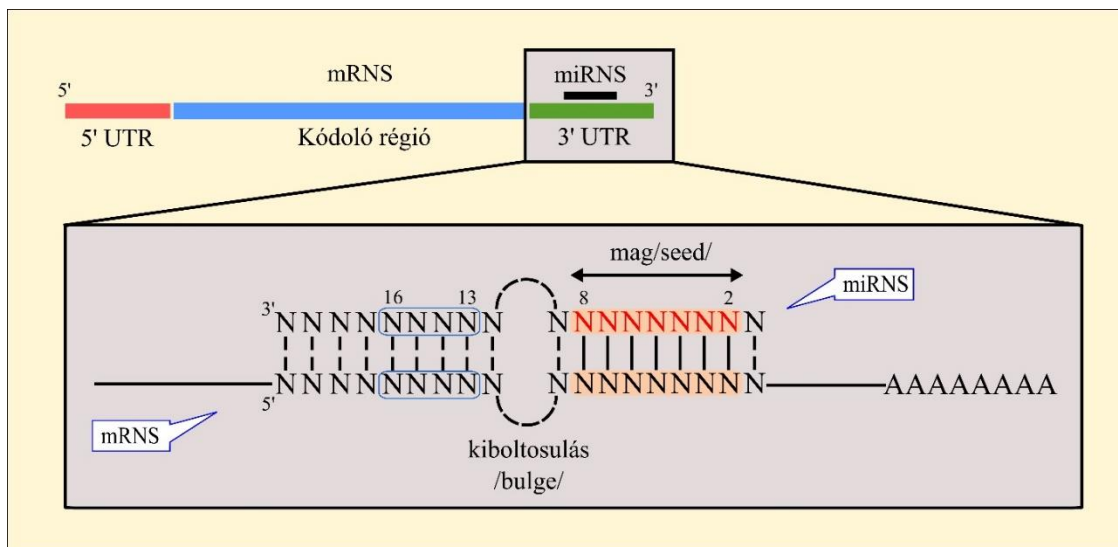
A miRISC-be való beépülésük után a miRNS-ek fő feladata az lesz, hogy az effektor fehérjéket a target mRNS-hez irányítsák. Ezt alátámasztja az a megfigyelés, hogy HeLa sejtekben a miRNS-ek represszív hatását utánozni lehetett az Ago proteinek mRNS-hez történő, miRNS-től független kapcsolásával [80]. A végrehajtás fő karmesterei tehát az Ago fehérjék.

Az állati miRNS-ek számára a target mRNS 3' végénél elhelyezkedő, nem transzlálódó régiójában (3' UTR, untranslated region) találhatók kötőhelyek, melyek szekvenciája csupán részleges komplementaritást mutat a bekötődő miRNS-ekkel. Kevés kivételtől eltekintve a miRNS-ek nem a target földarabolását váltják ki, hanem a transzláció megakadályozásán keresztül fejtik ki hatásukat.

A miRNS – mRNS interakció létrejöttéhez bizonyos feltételeknek teljesülniük kell a miRNS-ek target felismerése során [81]. A legalapvetőbb követelmény, hogy a miRNS 7 nukleotid hosszú ún. mag (seed) régiója (az 5' végtől számított 2-8. nukleotid) teljesen komplementer módon kapcsolódjon a targettel. Egy másik szabály, hogy a miRNS–mRNS duplex központi régiójában viszont bázispárosodási hibáknak (mismatch) és ennek következtében széttartásnak (kiboltosulás, bulge) kell jelen lennie. A harmadik feltétel, hogy a miRNS 3' régiójában még legalább néhány bázispárosodás létrejöjjön, különösen a 13 - 16. nukleotid közötti szakaszon. **(4. ábra)**

További jellegzetessége az állati miRNS–mRNS rendszernek, hogy egy-egy hírvivő RNS több kötőhelyet is tartalmaz ugyanazon vagy különböző miRNS-ek számára [82]. Az egymástól meghatározott távolságra bekötődő miRNP komplexek közötti szinergista együttműködés fontosnak bizonyul a hatékony géncsendesítő hatás elérésében [83].

A miRNS-ek hatása tehát pleiotróp és redundáns [74] (egy miRNS sokféle targeten kifejthet hatást, és egy target több miRNS szabályozása alatt állhat), mely differenciált és finoman hangolt szabályozásra ad módot.



4. ábra – miRNS csatlakozása az mRNS 3' UTR-jéhez (Filipowicz és mtsai, 2008 alapján) [84]. A miRNS-mRNS kapcsolódás feltétele a mag régió teljes komplementaritása a targettel. További jellegzetesség a középső régiókban a bázispárosodási hibák jelenléte, valamint a miRNS 3' régiójának megfelelően még legalább néhány bázispárosodás létrejötte. N – nukleotid.

2.2.3.2 - Mikro-RNS-indukált poszttranszkripcionális géncsökkentés

Ismert, hogy a miRNS-ek géncsökkentő hatásukat targetjeik transzlációjának megakadályozásával fejtik ki. E gátlás mikéntjére azonban máig nem született konszenzus, számos eltérő mechanizmust írtak le, a főbb irányvonalak a következők [84-86]: (1) a transzláció iniciációjának gátlása, (2) gátlás az iniciáció után, (3) az mRNS destabilizációja. A transzlációsán inaktív mRNS molekulák diszkrét citoplazmatikus granulumokban akkumulálódnak (4). **(5. ábra)**

(1) A transzláció iniciációjának gátlása

A transzláció megkezdését a miRNS-ek többféle módon képesek megakadályozni. **(5.1. ábra)**

a.) Az egyik modell szerint a miRISC az eIF4E eukarióta iniciációs faktorról kompetitív antagonizmusban áll, gátolva annak bekötődését az mRNS 5' sapkájához (5' cap). Ezt alátámasztják azok a megfigyelések, miszerint eIF4E-t tartalmazó, tisztított eIF4F-komplex sejtmentes rendszerben történő alkalmazásával a miRNS-ek gátló hatását ellensúlyozni lehetett [87], továbbá, hogy kísérletes körülmények között a miRNS-ek megakadályozták az mRNS 40S iniciációs alegységgel történő kapcsolódását [88]. A

kompetíció egyik lehetséges magyarázata az, hogy az AGO2 fehérje központi doménje az eIF4E sapka-kötő doménjével szekvencia-homológiát mutat [89], tehát akár az AGO2 is rendelkezhet sapka-kötő aktivitással. Ez a modell tehát kézenfekvő magyarázatot ad arra is, miért van szükség miRNP-k többszörös kötődésére a mRNS-hez a megfelelő effektivitás eléréséhez (ti. több miRNP nagyobb eséllyel szorítja le az eIF4E-t az 5' sapkáról).

- b.) Egy másik hipotézis szerint a miRNP az mRNS deadenilációját idézi elő [90], melynek következtében az mRNS poli-A farka és az ehhez kötődő PABP1 (polyadenylate-binding protein 1) eltűnik. A PABP1 normálisan az eIF4E-vel létesít kapcsolatot az eIF4G közvetítésével, és így alakul ki az mRNS cirkuláris formája. PABP1 hiányában az mRNS nem lesz képes fölvenni ezt a transzlációhoz szükséges cirkuláris alakot, tehát tulajdonképpen az mRNS cirkularizációja gátlódik.
- c.) Az iniciáció miRNS-ek általi gátlásának harmadik lehetséges módja a riboszóma start kodonnál történő összeszerelődésének megakadályozása. Ezt a miRNP-ek azáltal érik el, hogy azzal a fehérjével asszociálódnak, amelyek a 60S alegység 40S alegységgel való kapcsolódását gátolja, nevezetesen az eIF6-tal [91].

(2) Poszt-iniciációs gátlás

Egyes kísérleti eredmények arra engednek következtetni, hogy a miRNS-ek a transzláció elongációs fázisát is képesek blokkolni (**5.2. ábra**). Ezt a feltevést azokra a megfigyelésekre alapozták, miszerint a miRNS-ek és target mRNS-eik a poliszómákkal egy frakcióban voltak kimutathatók [92], valamint hogy a represszált mRNS-ek aktív poliszómákkal kapcsolatban maradtak, habár a fehérje termék nem jelent meg a sejtben [93]. Ennek magyarázatára két lehetséges mechanizmust írtak le:

- a.) A miRNS-ek a riboszómák mRNS-ről történő korai disszociációját okozzák az ún. „drop-off” modell szerint [94].
- b.) A miRNS-ek a készülő fehérjék gyors, kotranszlációs degradációját idézik elő, egy még ismeretlen proteáz közreműködésével [93].

(3) mRNS destabilizáció

Sokáig azt gondolták, hogy a miRNS-ek transzlációs gátlásukat cél mRNS-ük mennyiségének megváltoztatása nélkül érik el. Újabb kutatások azonban kimutatták,

hogy a miRNS-ek általi represszió gyakran társul az mRNS-ek degradációjával [95, 96] (5.3. ábra). Ez a degradáció azonban nem a teljes komplementaritás okozta mRNS földarabolódást jelenti, hanem az mRNS a.) 5' sapkájának és b.) 3' poli-A farkának elvesztésével kezdődik, miRNP-k által mediálva. Kimutatták, hogy a deadenilációban központi szerepe van az AGO fehérjékhez kapcsolódó GW182 proteinnek, ami a deadeniláz komplex mRNS-hez irányításában játszik szerepet. A deadeniláció effektor molekulái a CAF1-CCR4-NOT komplexben helyezkednek el. Az 5' sapka eltávolítását a DCP (decapping protein) család tagjai katalizálják, számos aktivátor segítségével.

Ma még nem teljesen tisztázott, hogy az mRNS destabilizációja vajon független repressziós mechanizmus (*in vitro* lehetségesnek tűnik [96, 97]), vagy a transzlációs gátlás következménye.

(4) *P*-testek (*P*-body, *processing body*)

A miRNS-ek által elcsendesített mRNS-ek ezek után a citoplazma egy dinamikusan szerveződő struktúrájában, az ún. *P*-testekben (GW-testekként is ismertek) akkumulálódnak. Itt vagy degradálódnak vagy ideiglenesen tárolódnak [98].

Az mRNS-ek degradációja – vagy legalábbis utolsó lépései – tehát ezen *P*-testekben mehet végbe, exonukleázok közreműködésével. A *P*-testekben számos, az mRNS katabolizmusban fontos fehérje van jelen, de a miRNS útvonal faktorai is megtalálhatók bennük [99]. A *P*-testekben akkumulálódnak például a fent említett deadeniláz (CAF1-CCR4-NOT) és decapping komplexek tagjai, exonukleázok, valamint a GW182 és Ago proteinek is [84].

Kutatások erős korrelációt találtak a miRNS-ek általi represszió és a mikroszkóposan is látható *P*-testek megjelenése között [100], azonban az is nyilvánvalónak tűnik, hogy ezen *P*-testek megléte nem feltétele a miRNS-ek általi csendesítésnek [101]. A *P*-testek megjelenése tehát inkább csak következménye, mintsem oka a transzlációs gátlásnak.

Összefoglalva tehát úgy tűnik, hogy a miRISC-ek elsősorban a transzláció gátlásán keresztül fejtik ki hatásukat, és ennek folyamányaként, következményeként a

transzlálódni nem tudó mRNS-ek – szintén a miRISC-ek által rekrutált – katabolikus faktorok célpontjaivá válnak. Emellett lehetséges, hogy a miRNP-k elsődlegesen az mRNS destabilizációját és degradációját indukálják, és ezzel eleve lehetetlenné teszik a transzlációt. (5. ábra)

Mint láttuk, a miRNS-ek számos mechanizmussal képesek egy adott gén expresszióját befolyásolni, azonban teljes bizonyossággal még nem állapítható meg, hogy ezek *in vivo* is teljesen egyedi és független mechanizmusok-e. Lehetséges, hogy a miRNS-ek primeren egy közös mechanizmussal okozzák a target csendesítését, és a fentebb vázolt hatások csak a primer esemény következményeiként, sejtípustól és targettől függő módon jelentkeznek [84].

2.2.3.3 - Mikro-RNS-indukált génaktiváció

Habár az eddigi kutatások alapján úgy tűnik, hogy a miRNS-ek legfőbb szerepe elsősorban a gének kifejeződésének negatív szabályozásában van, egyes esetekben kimutatták ezzel ellentétes hatásukat is.

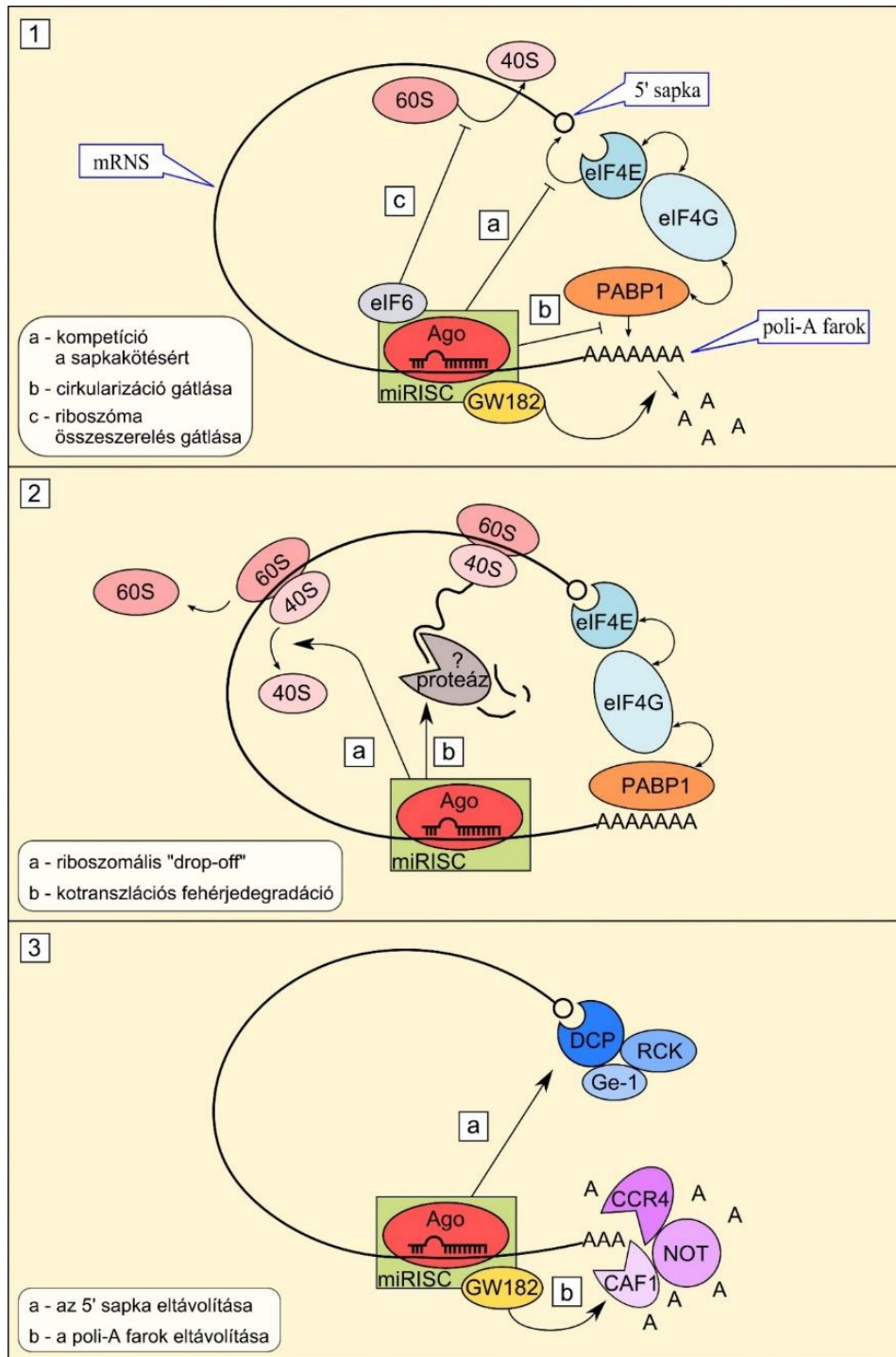
A miR-373 esetében például megfigyelték, hogy az E-cadherin és CSC2 gének promotor régióival komplementer szekvenciát tartalmaz, és ezen gének aktivációját indukálja: egy még ismeretlen mechanizmussal az RNS-polimeráz II dúsulását idézte elő a gének promotor régióinál [102].

A mir-369-3-ról pedig leírták, hogy a TNF α (tumor necrosis factor alpha) mRNS-ének ARE-jéhez (AU rich element, AU-ban gazdag régió) kapcsolódva transzlációs aktivációt idéz elő [103].

Ezen túlmenően egyes miRNS-ek esetében (például let-7) a sejtciklus fázisaitól függő szabályozást figyeltek meg: proliferáló sejtekben transzláció gátlást, míg nyugvó sejtekben a transzláció aktiválását idézték elő [104].

A miRNS-ek által mediált génaktiváció ma még egy kevésbé ismert regulációs mechanizmus, de mindenképpen jelzi, hogy a miRNS-ek génregulációban betöltött szerepe még sokrétűbb lehet, mint azt korábban gondolták [85].

Ezt alátámasztják azok a megfigyelések is, melyekben miRNS-ek bekötődését mRNS-ek 5' UTR-jához [105], egyes miRNS-ek sejtmagba irányuló importját [106], illetve miRNS-indukált DNS-metilációt [107] írtak le, felvetvén a miRNS-ek által mediált, transzkripció szintű szabályozás lehetőségét is.



5. ábra – miRNS-indukált poszttranszkripcionális géncsökkentés lehetséges mechanizmusai (Eulalia és mtsai, 2008 alapján) [108]. [1] A transzláció iniciációjának gátlása, [2] gátlás az iniciáció után, [3] az mRNA destabilizációja.

2.2.4 - A mikro-RNS-ek elérhetősége rutin patológiai és citológiai mintákban

Sokáig a miRNS-ek klinikai jelentőségének tanulmányozása elsősorban frissen fagyasztott minták földolgozásával történt, míg a legkönnyebben hozzáférhető mintaforrás – a rutin patológia citológiai kenetei és formalin-fixált, paraffinba ágyazott (formalin-fixed, paraffin embedded; FFPE) szövetblokkjai – csak kevés figyelmet kapott. Az FFPE blokkokból és citológiai mintákból történő mRNS izolálás ugyanis kis hatékonyságú és relatíve rossz minőségű mintát eredményez [109], ugyanis ezen mintákban a hosszú RNS-ek degradációja (kevesebb, mint 300 bp hosszú darabokra való fragmentálódás [110]), kémiai módosulása és fehérjékkel való keresztkötődése lép fel [111].

A miRNS-ek esetében azonban más a helyzet. FFPE és fagyasztott minták miRNS profiljának összehasonlításakor magas korrelációt ($R^2 > 0,95$) találtak a két csoport között, valamint kimutatták, hogy a formalinos fixálás nem befolyásolja a miRNS-ek expressziós profilját, szemben az mRNS-ek esetében tapasztaltakkal [112, 113]. Továbbá számos kutatás alapján a miRNS-ek jól izolálhatók és eredményesen vizsgálhatók citológiai kenetekből is.

A miRNS-ek tehát sokkal nagyobb stabilitást mutatnak citológiai és FFPE mintákban, mely valószínűleg eredendően rövidebb mivoltuknak köszönhető [112, 113]. A jobb megőrzöttségre utal az is, hogy a miRNS-ek eredményesen izolálhatók akár 25 éves FFPE mintákból is [114].

Mindezen eredmények tehát alátámasztják a citológiai kenetek alkalmazásának jogosultságát a miRNS-ek tanulmányozásában és a jövőben potenciális molekuláris diagnosztikai segédeszközként segíthetik a jobb citológiai diagnózist, valamint akár a terápiás döntéseket.

2.2.5 - A mikro-RNS-ek szerepe HCC-ben és a sorafenib terápiában

A máj patológiás elváltozásai közül a HCC-kben tanulmányozták leginkább a miRNS-ek szerepét, kóros eltéréseit. Számos ilyen irányú vizsgálat kimutatta, hogy miRNS-ek elvesztése vagy fokozott kifejeződése hozzájárulhat HCC-k kialakulásához, egyúttal maguk a miRNS-ek is tumorszuppresszor vagy onkogén útvonalak szabályozása alatt állnak. Több kutatócsoport is jellegzetes miRNS-expressziós változásokról számolt be, valamint az egyes miRNS-ek hepatokarcinogenezisben betöltött funkcióira is megpróbálták fényt deríteni. Ismert továbbá, hogy számos miRNS képes a sejtek különféle toxinokra, gyógyszerekre adott válaszkészségét, szenzitivitását modulálni. Ezek alapján mára már a miRNS-ek klinikai és patológiai gyakorlatban való alkalmazhatósága is körvonalazódni látszik.

A máj legnagyobb mennyiségben jelen lévő mikro-RNS-e a **miR-122**, így nem meglepő, hogy ez a miRNS érintett a hepatokarcinogenezisben is. Több kutatásban is gyakori downregulációt mutatott a vizsgált HCC-kben, és targetjeként elsőként a ciklin G1-et azonosították [115]. Kimutatták, hogy a miR-122-t nem expresszáló humán hepatóma sejtvonalakon (HepG2, Hep3B, SK-Hep-1) e miRNS ectópiás expressziója gátolta azok daganatkeltő potenciálját. Targetjeiként ebben a vizsgálatban az ADAM-10, SRF, IGF1R fehérjéket identifikálták, melyek HCC-kben szignifikánsan magasabb mennyiségben voltak jelen, mint a környező normál, magas miR-122 tartalmú májszövetben [116]. Érdekes módon a miR-122 egyike azon mikro-RNS-eknek, melyek érzékenyítik a sejteket sorafenib kezelésre. *In vitro* kísérletek alapján a miR-122 túltermelése HCC sejtekben szignifikánsan csökkentette a sorafenibbel kezelt tumorsejtek túlélését és növekedését [116].

A **miR-195** a HCC-ben csökkent expressziót mutat, más malignus daganatokhoz hasonlóan. Sejtciklus gátló és apoptózis indukáló hatásai mellett fontos szerepe lehet az angiogenezis gátlásában HCC-ben, hiszen egyik direkt targetje a VEGF [117].

A **miR-221** egy vizsgálatban a HCC-k 71%-ában felülszabályozottságot mutatott. Többek között két ciklin dependens kináz inhibitor kifejeződését gátolva (CDKN1C/p57 és CDKN1B/p27) részt vesz a sejtciklus kontrolljában: a sejteket az S-fázisba léptetve a HCC sejtek proliferációját serkenti [118]. Az is bizonyítottnak tűnik azonban, hogy a miR-221 nem csak a sejtek szaporodását serkentve fejt ki onkogenikus hatást, hanem

apoptózisukat gátolva is. HCC-s mintákban a magas miR-221 következetesen alacsony proapoptotikus Bmf fehérje szinttel társult: sejtkultúra vizsgálatokban a Bmf a miR-221 direkt targetjének bizonyult [119]. A miR-221 és **miR-222** ezen túlmenően a TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand)- indukált sejthalál kivédésében is szerepet játszik, valamint a miR-221-et és miR-222-t overexpresszáló sejtek migrációs és inváziós képessége is fokozott [120]. A PI3K/Akt jelátvitel jól ismert negatív szabályozója továbbá a PTEN, mely a miR-221-222-n kívül a **miR-21** targetje is, mely miRNS magasan overexpresszált HCC-ben. Kísérletes overexpressziója sejtvonalon a tumorsejtek proliferációját, migrációját és invázióját indukálta, és érdekes módon normál májsejtek migrációs képességét is növelte [121]. A miR-222 és **miR-223** deregulációja kétséget kizáróan, egyértelműen megkülönböztette a HCC-t a környező nem tumoros szövetről, virális fertőzöttségtől függetlenül [122]. A miR-223 következetesen alacsony szinten volt jelen HCC-kben, mely miRNS a mikrotubulusok keletkezését befolyásolja, és így a G2/M fázis átmenetet regulálhatja.

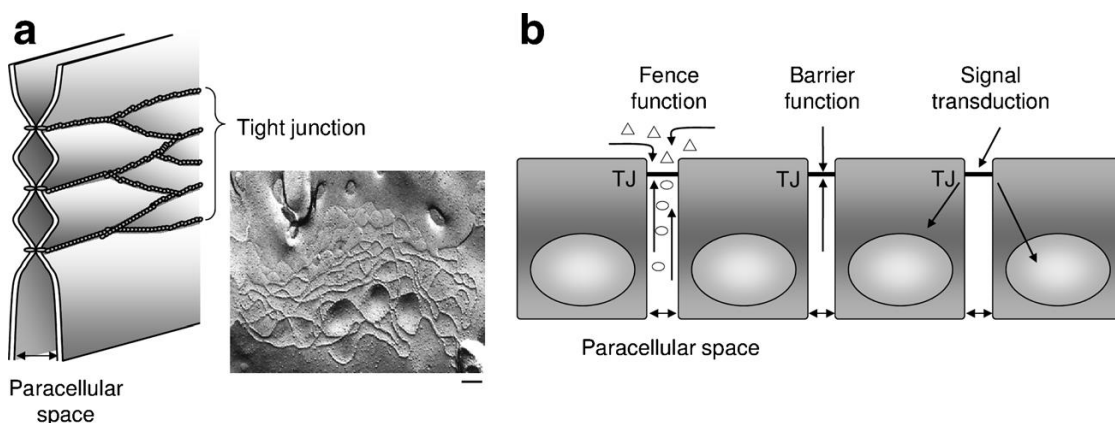
A **miR-17-5p** és **miR-18a** expressziója szignifikáns korrelációt mutatott a HCC differenciáltságának csökkenésével, ami nem meglepő annak fényében, hogy mindkét miRNS az onkogén hatású miR-17-92 klaszter tagja, tehát ún. onkomiR-ként funkcionálnak HCC-ben [123].

A **miR-34a** pedig egy vizsgálatban a HCC-k 75%-ában alacsonyabban fejeződött ki, mint a környéki normális májszövetben. Kiderült, hogy kísérletes overexpressziója a c-Met (vagy HGFR, hepatocytá growth factor receptor) onkogén represszióján keresztül hathatósan gátolta a vizsgált tumorsejtek migrációját és inváziós képességét [124]. Ezen túlmenően érzékenyebbé tette a tumorsejteket a sorafenib-indukált apoptózisra *in vitro* kísérletekben [125].

2.3 - Sejtkapcsoló struktúrák és claudinok

Az epitheliális és endotheliális sejtek egymáshoz és az extracelluláris mátrixhoz történő kapcsolódásáért felelős struktúrák három csoportra oszthatók: kommunikáló (gap junction), horgonyzó (dezmoszóma, hemidezmoszóma, zonula adherens), valamint lezáró kapcsolatok. A lezáró kapcsolat, más néven zonula occludens vagy 'tight junction' (TJ, szoros kapcsolat) a szomszédos sejtek között legapikálisabban elhelyezkedő sejtkapcsoló struktúra, mely kialakításában több mint 50 különböző fehérje vehet részt (6. ábra). Az első tight junction fehérje azonosítása 1993-ra tehető, amikor Furuse és Tsukita japán kutatók izolálták a később occludinnak elnevezett fehérjét [126]. Érdekes módon a tight junction-ök occludinhiányos egerekben is funkcionálisak, mely megfigyelés egy másik, a TJ-ök gerincét alkotó fehérjecsald, a claudinok felfedezéséhez vezetett 1998-ban [127].

A TJ-ök két alapvető funkciót töltenek be a sejtek életében: egyrészt szemipermeábilis barriert jelentenek az ionok, a víz és különböző makromolekulák sejtek közötti, paracelluláris transzportjában ('gate', kapu funkció), másrészt a sejtpolaritás fenntartásában játszanak alapvető szerepet az apikális és bazolaterális membrándomének elválasztása révén ('fence', kerítés funkció). Ezek mellett ma már vitathatatlan a szerepük más fiziológiás és kóros folyamatokban, például szignál transzdukciós útvonalakon keresztül a sejtproliferáció, differenciáció és apoptózis szabályozásában, továbbá kórokozók receptoraiként is szolgálhatnak és célzott terápiás célpontokként is használhatóak lehetnek [128].



6. ábra – A tight junction szerkezete és funkciói (Osana és mtsai. 2016) [129]. Kerítés funkció (fence): az apikális és bazolaterális membrándomének elválasztása; kapu funkció (barrier, gate): szemipermeábilis barriert jelentenek a paracelluláris transzportban; szignál transzdukció: jelátviteli útvonalakon keresztül a sejtfiziológia szabályozása

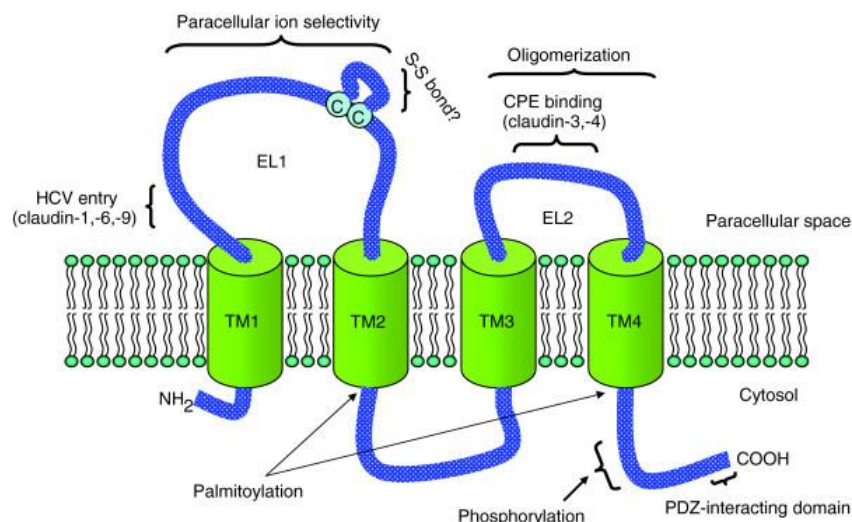
A TJ-ök funkciója nagyban függ alkotóelemeik pillanatnyi összetételétől, mely a sejtek igényei alapján dinamikusan változik. A TJ proteinek közötti kapcsolat tehát sokszor átmeneti és állandó változásban van. Egy TJ alkotóelem felül- vagy alulexpresszációja továbbá nem jelenti a TJ „szorosságának” automatikus változását, inkább az adott fehérje által szabályozott folyamatok megváltozását jelzi.

A TJ fő alkotóelemeit jelentő transzmembrán fehérjék négy fő típusa az occludin, a tricellulin, a claudinok és a JAM (junctional adhesion molecule) fehérjék. Ezek közül a TJ gerincét jelentő claudin molekulacsalád emberekben jelenleg 26 ismert claudinból áll, melyek 12-70%-os szekvencia-homológiát mutatnak, egyes típusaik gyakran együtt expresszálnak, és expressziójuk szövet- illetve szervspecifikus [130]. A claudinok négy transzmembrán doménnel rendelkezve két, eltérő nagyságú extracelluláris hurkot alkotnak, melyek a sejtek között homo- és heterofil kapcsolatokkal zárják az intercelluláris teret. **(7. ábra)** Az intracellulárisan elhelyezkedő N- és C-terminálisukon keresztül adapter fehérjék (pl. ZO-1,2,3, MAGI-1,2, cingulin, symplecin, stb.) közvetítésével végezten az aktin citoskeletonhoz is kötődnek, így a TJ-ök felől érkező szignálok a sejt egészére kihathatnak, míg a sejt belsejéből érkező jelek a TJ szerkezetét és összetételét befolyásolhatják [130].

A claudinok TJ-ökon kívüli lokalizációja is ismert, melyeknek három fő funkciója lehet: 1) sejtek közötti nem konvencionális kötődési pontokként szolgálhatnak, például a claudin-1 a dendritikus sejtek és az epidermisz között, vagy a claudin-2 a metasztatikus emlőrák sejtek és a májsejtek között [131]. 2) más sejtfelszíni receptorokkal kapcsolódhatnak, például integrinokkal vagy T-sejt receptorral [132]. 3) szignál transzdukcióban vehetnek részt, például oszteoklasztokban a claudin-18 a ZO-2 jelátvitelt gátolja, ezáltal csökkenti a csontreszorpciót [133]. Továbbá egyes claudinok nukleáris lokalizációját is leírták, mely felveti ezen fehérjék szerepét a direkt génexpresszió szabályozásban is.

A fentiekből adódóan a claudinok számos betegség patogenezisében szerepet játszanak. A claudinok megváltozott expresszióját írták le a karcinogenezis, a tumorprogresszió és metasztázisképzés folyamataiban, számos baktérium és vírus receptoraiként, belépési kofaktoraiként szolgálnak, továbbá gyulladásos betegségekben is szerepet játszhatnak.

A legjobban ismert és kutatócsoportunk által is vizsgált, ún. „klasszikus” claudinok az 1-es, 2-es, 3-as, 4-es és 7-es, melyek expressziója jelen vizsgálatainknak is tárgya.



7. ábra – A claudinok szerkezete (Lal-Nag és mtsai. 2009) [130]. A claudinok négy transzmembrán doménnel (TM1-4) rendelkezve két, eltérő nagyságú extracelluláris hurkot (EL1, EL2) alkotnak, melyek a sejtek között homo- és heterofil kapcsolatokkal zárják az intercelluláris teret. Az intracellulárisan elhelyezkedő N- és C-terminálisukon keresztül adapter fehérjék (pl. PDZ doménnel rendelkező fehérjék) közvetítésével végezten az aktin citoszkeletonhoz is kötődnek.

2.3.1 - Claudin-1

A claudin-1 az első és talán legtöbbet tanulmányozott claudin, mely a legtöbb emberi szövetben jelen van. Fontos szerepe van a bőr átteresztőképességének meghatározásában, valamint a májsejteken és epeúti hámsejteken expresszáldva az vérepe gát létrehozásában [134]. Ezen fiziológiás funkciói mellett számos betegségben ismert megváltozott kifejeződése. Fokozott expresszióját írták le papilláris pajzsmirigyrákban [135], nyelőcső laphámrákjában [136], cervicalis intraepithelialis neoplasiákban [137], míg csökkent kifejeződését invazív emlőrákban és tüdő adenokarcinómában [138]. Ezen túlmenően, a claudin-1 epitheliális-mezenchimális tranzícióban betöltött direkt szerepét is igazolták HCC sejtvonalakon, oki tényezőként felvetvén a claudin-1 fokozott expresszióját HCC-ben [139].

2.3.1.1 - Claudin-1 és HCV

A máj szempontjából különösen fontos azon felfedezés, miszerint a HCV májsejtekbe jutásához szükséges a vírusok sejtfelszíni receptorokhoz való kötődése. A CD81 és SR-B1 receptorok mellett két TJ protein – az occludin és a claudin-1 – játszik fontos szerepet a HCV internalizációjában [140], tovább két másik claudinnak (claudin-6 és -9) is hasonló szerepet tulajdonítanak, azonban ezek inkább a HCV májsejteken kívüli (fehérvérsejtek, endotél) replikációjában fontosak [141]. Érdekes módon mind a junkcionális (apikális), mind a nem-junkcionális (bazolaterális) claudin-1 megjelenési formáknak lehet szerepe a HCV belépési folyamatában. A HCV továbbá közvetlenül is fokozhatja a claudin-1-nek mint belépési kofaktorának expresszióját [142]. A claudin-1 permisszív szerepét jól mutatja, hogy claudin-1 ellenes antitestekkel megakadályozható a HCV fertőzés, sőt a már meglévő infekció is gyógyíthatónak tűnik humán egér májkimérákon [143].

2.3.2 - Claudin-2

A claudin-2 a legtöbb claudinnal ellentétben az áteresztő TJ-ök kialakításában játszik szerepet, megtalálható a vese proximális tubulusaiban illetve a bélkriptákban [144]. Érdekes módon a claudinok szokásos lineáris immunhisztokémiai festődésétől eltérően a claudin-2 perimembránózus, granuláris immunreakciót ad. Gyakori felülszabályozódását figyelték meg gyulladásos bélbetegségekben, míg expressziója az emlőrákok progressziójával csökken [145].

2.3.3 - Claudin-3 és claudin-4

A claudin-3 és claudin-4 fehérjék akkor kerültek igazán a figyelem középpontjába, amikor felfedezték, hogy a *Clostridium perfringens* enterotoxinjának receptoraiként szolgálnak. Ezen molekulák így hamar daganatellenes terápiás célpontokká váltak, hiszen a claudin-3-at és 4-et magasan expresszáló tumorsejtek célzott elpusztítását teszik lehetővé a toxin direkt sejtekhez juttatásával [146]. A claudin-4 kifejeződését többen az adenokarcinómák jellegzetes tulajdonságának tartják, így fokozott expressziója figyelhető meg például prosztatata karcinómában [147], kolorektális karcinómában és azok májmetasztázisaiban, ovárium karcinómában, hasnyálmirigy karcinómában [148].

2.3.4 - Claudin-7

A claudin-4-hez hasonlóan gyakran emelkedett expressziója számos hámeredetű tumorban [149], míg csökkent expresszióját írták le fej-nyaki daganatokban, emlő duktális adenokarcinómájában [150], prosztatákban [151]. A claudin-1-hez hasonlóan TJ-ön kívüli lokalizációja is ismert a sejtek bazolaterális felszínén, ahol gyakran az EpCAM molekulával alkot komplexet [152]. E komplex szerepét felvetették a sejtadhézió, motilitás és tumorprogresszió szabályozásában is.

3 - CÉLKITŰZÉSEK

A hepatocelluláris karcinóma incidenciája növekvő tendenciát mutat a fejlett világban, mortalitás szempontjából azonban még mindig a legmalignusabb daganatok között tartják számon. A betegek még mindig legtöbbször már előrehaladott stádiumban kerülnek diagnózisra, mely esetben limitált a terápiás eszköztár. A pár éve bevezetett szisztémás, célzott terápia, a sorafenib segíthet a betegség stabilizálásában túlélési előnyt nyújtva, azonban a betegek csak mintegy fele reagál a kezelésre. Jelenleg nem rendelkezünk olyan validált, prediktív biomarkerrel, mely megbízhatóan előre jelezné a sorafenibre adott válaszkészséget. Ismert továbbá, hogy a HCC leggyakrabban krónikus májbetegségek talaján kialakult cirrotikusan átalakult májban fejlődik ki. A daganatok patomechanizmusában gyakran szerepet játszó sejtkapcsolatok, azon belül is a claudin fehérjék megváltozását számos kutatócsoport vizsgálta. Nem teljesen tisztázott azonban, hogy a leggyakrabban vizsgált claudinok kifejeződése hogyan változik a normál – cirrózis – HCC tengelyen, illetve hogyan korrelál a HCV fertőzöttségi státusszal.

Mindezek alapján a következő célkitűzéseket fogalmaztuk meg:

- A HCC-ben gyakran deregulált miRNS-ek kifejeződésének vizsgálata sorafenib kezelés előtti, diagnosztikus vékonytű aspirációs biopsziákon
- Lehetséges összefüggések vizsgálata a kapott miRNS expressziós értékek és a betegek klinikopatológiai jellemzői között
- A sorafenib kezelés előtti miRNS expresszió és a betegek túlélése közötti lehetséges kapcsolatok feltárása, különös tekintettel az irodalomban leírt, hepatokarcinogenezisben releváns, *in vitro* sorafenibre érzékenyítő miRNS-ekre
- A claudin-1, -2, -3, -4 és -7 fehérje expresszió lokalizációjának és erősségének vizsgálata reszekált HCC-ben és az azt körülvevő cirrotikus vagy nem cirrotikus májszövetben
- A claudinok expressziójának összevetése a tumorok differenciáltsági fokával, a betegek túlélésével, valamint a HCV státusszal mind tumoros, mind tumormentes májszövetben, különös tekintettel a claudin-1 mint HCV belépési kofaktor kifejeződésére.

4 - ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Vizsgálatainkat a Semmelweis Egyetem II. Számú Patológiai Intézetének archívumából származó, formalin-fixált, paraffinba ágyazott, valamint aspirációs citológiai mintáit felhasználva végeztük. Vizsgálatainkban összesen 50 HCC-s esetet analizáltunk. A vizsgálatok minden esetben a Semmelweis Egyetem Regionális Etikai Bizottságának engedélyével történtek (#172/2003, #137/2008, #35/2011).

4.1 - Betegek és szövetminták

4.1.1 - *Beteganyag I. – Sorafenib és HCC miRNS-ek*

A mikro-RNS expressziós vizsgálatainkhoz a vizsgált mintákat 20 HCC-s beteg kezelés előtti, vékonytű aspirációs citológiai mintavétellel nyert kenetei jelentették, melyekből 2008 és 2012 között Dr. Székely Eszter, Dr. Járay Balázs és Prof. Dr. Schaff Zsuzsa állította föl a HCC patológiai diagnózisát. A betegek sorafenibbel történt kezelését és utánkövetését az Egyesített Szent István és Szent László Kórház - Rendelőintézet Onkológiai Osztályán Dr. Végh Éva és Prof. Dr. Bodoky György végezték. A betegek beválasztása retrospektív vizsgálatunkba a következő szigorú kritériumok alapján történt: megelőző sebészi, lokoregionális vagy szisztémás kezelésben nem részesültek, későbbi lokoregionális kezelésben nem részesültek, Child-Pugh A vagy B májfunkciókkal, ≤ 1 ECOG teljesítőképességi státusszal, valamint a diagnózistól számított legalább 3 hónap túléléssel rendelkeztek. A vizsgált HCC-s betegek klinikai jellemzőit a **2. táblázat** mutatja.

A medián utánkövetési idő 33,6 hónap volt. A 20 betegből 15 halt meg a vizsgálati időszakban a betegség progressziójának köszönhetően. A teljes túlélést a sorafenib kezelés kezdetétől a halál beálltáig vagy a vizsgálat végéig eltelt idő jelentette, míg a progressziómentes túlélést a sorafenib kezelés kezdetétől a radiológiai progresszióig vagy a vizsgálat befejezéséig eltelt időben határoztuk meg.

2. táblázat – A sorafenibbel kezelt betegek klinikopatológiai jellemzői (n = 20)

Jellemző		N (%) vagy medián [intervallum]
Életkor (év)		68 [52 - 82]
Nem	Férfi	16 (80%)
	Nő	4 (20%)
Etiológia	Vírusos	11 (55%)
	Egyéb	9 (45%)
Tumor szám	Szoliter	6 (30%)
	>1	14 (70%)
Tumor méret (cm)		5 [1,5 - 20]
Child-Pugh osztály	A	16 (80%)
	B	4 (20%)
ECOG státusz	0	13 (65%)
	1	7 (35%)
AFP	<10ng/ml	7 (35%)
	≥10ng/ml	13 (65%)

4.1.2 - Beteganyag II. – Claudinok és HCC

Összesen 30 sebészileg eltávolított, formalin-fixált, paraffinba ágyazott (FFPE) humán HCC-t, valamint környező nem tumoros májrészetet vizsgáltunk. A betegek nem részesültek kemo- vagy radioterápiában a műtét előtt. Kontrollként 6, balesetben elhalálozott emberből származó normál májmintát használtunk. A 2002 és 2006 között gyűjtött szövetminták patológiai diagnózisának újraértékelését, valamint a fibrózis-cirrózis megítélését Dr. Kiss András és Prof. Dr. Schaff Zsuzsa végezték. A betegek medián életkora 63 év (intervallum: 44 – 78 év), a férfi:nő arány 20:10 volt, 24 eset mutatott szoliter megjelenést, az átlagos tumorméret 7,1 cm volt (intervallum: 2 – 22 cm). A tumorok közül 7 grade 1, 10 grade 2, 13 grade 3 differenciáltsági fokot mutatott. Tizenhét (17/30) HCC beteg mutatott HCV szerológiai pozitivitást. A fibrózis-cirrózis megítélése a módosított Ishak fibrózis skála szerint történt [153]: 11/30 esetben volt jelen cirrózis a HCC körüli májban (score 5-6), míg 11/30 esetben volt jelen krónikus hepatitisz fibrózissal, de cirrózis nélkül (score 3-4). A 17 HCV pozitív esetből 6 esetben volt jelen cirrózis, míg 11 esetben krónikus hepatitisz és fibrózis. A 13 HCV negatív eset között 5 alkoholos eredetű cirrózis szerepelt, míg a többi eset nem mutatta krónikus hepatitisz vagy fibrózis jeleit. A vizsgált reszekátumok klinikopatológiai jellemzőit a **3. táblázat**

mutatja. A medián utánkövetési idő 83 hónap volt. A teljes túlélést a sebészi reszekciótól a halál beálltaig vagy a vizsgálat végéig eltelt időben határoztuk meg.

3. táblázat – A sebészileg eltávolított HCC-s minták jellemzői (n=30+6)

	HCV negatív (n)	HCV pozitív (n)	Összesen (n)
Kontroll normál máj	6	-	6
HCC nem cirrózis talajon	8	11	19
HCC cirrózis talaján	5	6	11
Összesen (n)	19	17	36

4.2 - Immunhisztokémia

4.2.1 - Immunhisztokémiai reakciók

A claudinok immunhisztokémiai detektálása FFPE blokkokból készült, 3-5 µm vastagságú metszeteken történt. A reakciókhoz felhasznált elsődleges és másodlagos ellenanyagok listáját és jellemzőit a **4. táblázat** mutatja. Deparaffinálás, feltárás és az endogén peroxidáz blokkolása után az immunhisztokémiai festéseket Ventana ES automata immunfestő készülék (Ventana Medical System Inc., Tucson, AZ, USA) segítségével kiviteleztek. A másodlagos antitestek biotinilált anti-egér ill. anti-nyúl savók voltak (Ventana, Zymed), melyeket 1:100-as hígításban, 1 órán át, szobahőmérsékleten inkubáltunk. Az előhívás avidin-biotin peroxidáz technikát, valamint 3'3'-diaminobenzidin kromogént használva történt a gyártó előírásainak megfelelően (iView DAB Detection Kit, Ventana). Háttérfestésként hematoxylint és kékítő (bluing) reagenst alkalmaztunk. Negatív kontrollhoz a primer antitestet elhagytuk és önmagában az antitest-oldószert használtuk. A reakciók negatívnak bizonyultak.

4. táblázat – Elsődleges claudin ellenes antitestek és jellemzőik

	Típus	Hígítás	Gyártó
Claudin-1	poliklonális (nyúl)	1:80	Zymed (San Francisco, CA, USA)
Claudin-2	monoklonális (egér)	1:80	Zymed (San Francisco, CA, USA)
Claudin-3	poliklonális (nyúl)	1:80	Zymed (San Francisco, CA, USA)
Claudin-4	monoklonális (egér)	1:100	Zymed (San Francisco, CA, USA)
Claudin-7	poliklonális (nyúl)	1:100	Zymed (San Francisco, CA, USA)

4.2.2 - Az immunreakciók értékelése, morfometria

Az immunreakciók elkészülte után minden metszetből 10-15, random kiválasztott, egymást át nem fedő fotót készítettünk, 200x nagyítással (Olympus BX mikroszkóp). A reakciók kvantitatív értékelését Leica Qwin V3 morfometriai szoftverrel végeztük (Leica Microsystems Imaging Solutions Ltd., Cambridge, UK). A program az általunk pozitívnak definiált pixelek számát, ezen keresztül pedig a pozitív immunfestődés százalékos arányát adja meg a teljes vizsgált területhez viszonyítva. A kapott értékeket az epeúti pozitivitást mind kivonva, mind beleszámítva ábrázoltuk. A kiértékelés szempontjából nem releváns területeket nem vettük figyelembe (pl. nekrotikus vagy technikai okok miatt értékelhetetlen területek). Az egyes esetekből készült 10-15 fotón mért adatok átlagértékével számoltunk a statisztikai analízis során.

4.3 - Western blot

A claudin immunreakciók specificitásának ellenőrzésére Western blot vizsgálatokat végeztünk 5 reprezentatív tumoron és környező májmintáikon, fehérjeizolálást követően. A frissen fagyasztott mintákból 50-50 mg-ot lízispufferben homogenizáltunk (100 mM NaCl, 1 % NP-40, 2 mM EDTA, 50 mM TRIS, 20 µg/ml aprotinin, 20 µg/ml leupeptin, 1 mM PMSF, pH 7.5), majd centrifugálás után 30 µg proteint 2x Laemmli pufferrel 10 percig 95°C-on főzve, 10% SDS-poliakrilamid gélen szeparáltunk (200V, 35 perc, 4°C). Nitrocellulóz membránra történő transzfert követően (20V, 16 h, 4°C) a blotokat blokkolás után (5% zsírmentes száraz tej), 1:200 hígított, primer anti-claudin-1, -2, -3, -4, -7 antitestekkel, valamint loading kontrollként anti-GAPDH antitesttel inkubáltuk 4°C-on, egy éjszakán át. Mosást követően megfelelő tormaperoxidáz (HRP)-konjugált másodlagos ellenanyagokat alkalmaztunk (1:2000, DAKO), majd kemilumineszcens előhívást alkalmazva (ECL-Plus, Amersham Biosciences) rögzítettük a detektált jelet.

4.4 - mikro-RNS kifejeződés meghatározása kenetekből

4.4.1 - mikro-RNS izolálás citológiai kenetekből

A vizsgálatokhoz kiemelt FNAB (fine needle aspiration biopsy, vékonytű aspirációs biopszia) minták ismételt áttekintése és mikroszkópos kijelölése után a legalább 2000, jól látható és jól megőrzött daganatos sejtet tartalmazó keneteket használtuk. Az FNAB mintákból az RNeasy FFPE Kit (Qiagen, Hilden, Németország) segítségével történt teljes RNS izolálás. Xilolban való áztatás után először a fedőlemez eltávolítása történt, majd a xilol eltávolítása alkohollal. Steril szike segítségével a sejteket steril csövekbe kapartuk, ahol proteináz K emésztés történt 16 órán át, 55°C-on. Ezután a gyártó protokollja szerint oszlop alapú, miRNS-ekre optimalizált RNS izolálás történt [154]. A reziduális DNS szennyeződés eltávolítása Turbo DNase-zal történt a gyártó protokollja szerint (Ambion, Austin, Texas). Az izolált RNS koncentrációját és tisztaságát NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer segítségével mértük meg.

4.4.2 - Reverz transzkripció és valós idejű PCR

A HCC-ben gyakori eltérő kifejeződést mutató és kutatócsoportunk által korábban kiterjedten tanulmányozott mikro-RNS-ek expresszióját TaqMan MicroRNA Assay-vel, valós idejű PCR-en alapuló módszerrel határoztuk meg. A vizsgálatainkhoz használt 14 miRNS és kis magi U6 assay-azonosítói a következők voltak: miR-17-5p (ID:000393), miR-18a (ID:002422), miR-21 (ID:000397), miR-34a (ID:000426), miR-122 (ID:002245), miR-140 (ID:000462), miR-195 (ID:000494), miR-210 (ID:000512), miR-214 (ID:002306), miR-221 (ID:000524), miR-222 (ID:002276), miR-223 (ID:002295), miR-224 (ID:002099), miR-328 (ID:000543) és U6 (ID:001973).

A cDNS szintézist Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Cat No: 4366596) és TaqMan MicroRNA Assay primerek (for RT) (ABI, Cat Number: 4427975) segítségével végeztük, a gyártó utasításai szerint 10 ng totál RNS-ből, 7,5 µl végtérfogatban. A reverz transzkripció Eppendorf Mastercycler Gradient PCR készülékben történt, a következő hőprofilal: 16°C 30 perc, 42°C 30 perc, 85°C 5 perc, 4°C tartás.

A valós idejű PCR reakciót TaqMan Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG (Applied Biosystems, Cat No.: 4324018) és TaqMan MicroRNA Assay primerek (for real time) (ABI, Cat No.: 4427975) segítségével végeztük, a gyártó utasításai szerint, triplikátumban. A fluoreszcens jel a TaqMan próbákhoz kötött FAM jelzőfesték lehasításakor keletkezett. A valós idejű PCR ABI Prism 7000 Sequence Detection System készülékben futott, a következő hőprofillal: 95°C 10 perc, majd 50 ciklus (95°C 15 mp, 60°C 60 mp), majd 4°C tartás.

A target miRNS-ek expressziójának meghatározását a $2^{Cq(ref)-Cq(target)}$ módszer segítségével végeztük. A referencia meghatározására a NormFinder algoritmust használtuk, három gyakorta használt, lehetséges normalizáló gént (miR-328, miR-140, U6) vizsgálva.

4.6 - Statisztikai analízis

A normalitás vizsgálat eredményei alapján nem-parametrikus tesztekkel hasonlítottuk össze az expressziós értékeket: két csoport esetén Mann-Whitney U tesztet, több, mint két csoport esetén Kruskal-Wallis tesztet és post hoc analízist alkalmaztunk. Kontingencia táblázatok esetén Fisher-féle egzakt tesztet használtunk.

A túlélési analízist (teljes túlélés és progressziómentes túlélés) Kaplan-Meier módszerrel, a kapott túlélési görbék összehasonlítását log-rank teszttel végeztük, a kockázati arány (hazard ratio, HR) meghatározása Cox regresszióval történt.

A statisztikai analíziseket a STATISTICA 9.0 program segítségével végeztük (StatSoft Inc., OK, USA). A különbségeket $p < 0,05$ esetén fogadtuk el statisztikailag szignifikánsnak.

5 - EREDMÉNYEK

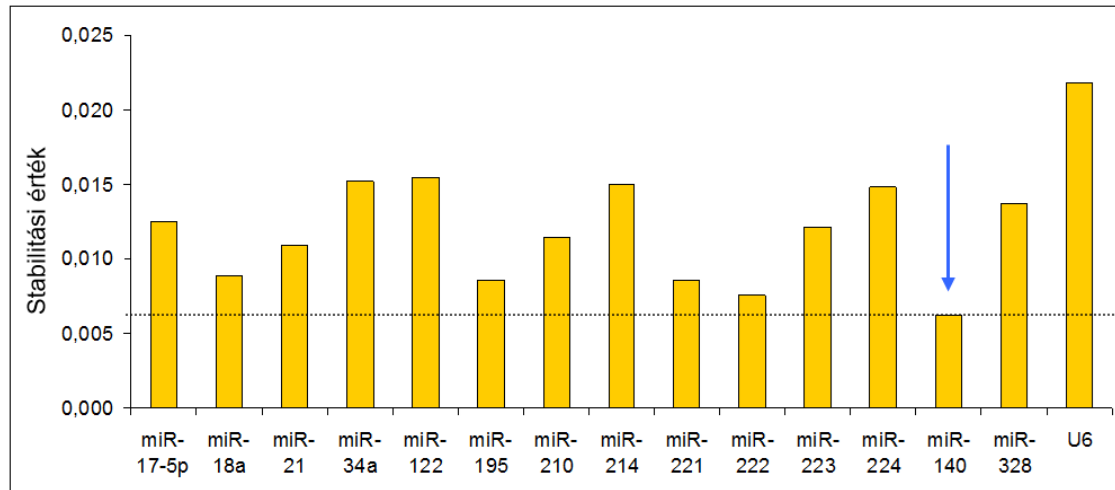
5.1 - Sorafenibbel kezelt HCC esetek mikro-RNS vizsgálata

5.1.1 - *miRNS izolálás lehetőségének vizsgálata HCC FNAB mintákból*

A citológiai mintákból nyert totál RNS mennyisége és minősége megfelelőnek bizonyult további vizsgálatok végzéséhez. A kenetektől nyert átlagos RNS hozam $10,8 \pm 9,3 \mu\text{g}$ (átlag $\pm$ szórás) ($0,2\text{--}32,2 \mu\text{g}$ min–max) volt. Az RNS tisztaságát a NanoDrop készülékkel 260/280 nm-en mért optikai denzitás arány $2,0 \pm 0,1$ (átlag $\pm$ szórás) jelezte.

5.1.1 - *A sorafenib kezelés előtti mikro-RNS expresszió és a klinikopatológiai jellemzők összefüggései*

A vizsgált miRNS-ek normalizált expresszióját az **5. táblázat** mutatja. Referenciaként a miR-140-et használtuk, mert a NormFinder algoritmus alapján ennek expressziója bizonyult legkevésbé változónak a minták között (NormFinder-ben ezt a legalacsonyabb „stabilitási érték” jelzi) (**8. ábra**). Alkalmazhatóságát megerősítette, hogy más HCC-s vizsgálatokban is ezt használták referenciaként [155]. Mivel egészséges májak nem kerülnek citológiai mintavételre, ezért a HCC-k mikro-RNS expresszióját jelen vizsgálatunkban nem tudtuk normál májmintákhoz viszonyítani. Vizsgálataink szempontjából azonban ez az összehasonlítás nélkülözhető volt, a normál májminták hiánya az analízist nem befolyásolta.



8. ábra – A NormFinder algoritmus alapján a miR-140 expressziója a legstabilabb a mintákban, szemben a gyakran használt U6 kis magi RNS-sel, mely nagy szórást mutatott

5. táblázat – miRNS expresszió HCC kezelés előtti, diagnosztikus citológiai mintáiban, miR-140-hez viszonyítva

	Normalizált miR expressziók (medián és tartomány)
miR-17-5p	1,91 [0,16 - 10,20]
miR-18a	1,25 [0,07 - 4,89]
miR-21	85,94 [5,13 - 352,95]
miR-34a	3,88 [0,62 - 11,25]
miR-122	173,46 [18,94 - 407,31]
miR-195	2,00 [0,43 - 10,15]
miR-210	1,16 [0,01 - 32,75]
miR-214	0,23 [0,07 - 165,61]
miR-221	0,92 [0,21 - 11,08]
miR-222	2,69 [0,21 - 17,96]
miR-223	4,34 [1,21 - 20,39]
miR-224	1,06 [0,06 - 23,67]
miR-328	0,12 [0,01 - 3,20]
U6	51,71 [0,01 - 1568,32]

A miRNS expresszió és a betegek klinikopatológiai jellemzőinek összevetésekor az esetleges korrelációt 2x2 kontingencia táblázatokkal vizsgáltuk. Ehhez a vizsgált paramétereket a következők szerint dichotomizáltuk: életkor (<68 év / ≥68 év), nem

(férfi / nő), etiológia (vírusos / egyéb), tumor szám (szoliter / >1), tumor méret (≤ 5 cm / >5 cm), Child-Pugh (A / B), ECOG teljesítőképességi státusz (0 / 1), AFP szint (<10 ng/ml / ≥ 10 ng/ml). A betegeket továbbá a miRNS expresszió alapján az adott miRNS-t „magasan expresszáló (high)” illetve „alacsonyan expresszáló (low)” csoportokba osztottuk, az adott miRNS relatív expressziós értékeinek mediánját véve viszonyítási pontnak.

Ezek alapján szignifikáns korrelációt két miRNS esetében találtunk. A magas miR-214 expresszió gyakrabban társult kisebb tumormérettel (≤ 5 cm) (80% vs 20%, $p=0,019$, Fisher egzakt teszt) (**6. táblázat**). A magas miR-17-5p expresszió pedig a jobb ECOG teljesítőképességi státusszal rendelkező betegek esetében volt gyakoribb (77% vs 0%, $p=0,003$, Fisher egzakt teszt) (**7. táblázat**). A többi vizsgált miRNS nem mutatott összefüggést a klinikopatológiai paraméterekkel. A részletes 2x2 kontingencia táblázatokat a **8. táblázat** mutatja.

6. táblázat – Sorafenib kezelés előtti miR-214 és tumorméret összefüggése

		miR-214	
		magas	alacsony
Tumor-méret	>5 cm	2	8
	≤ 5 cm	8	2

Fisher $p = 0,023$

7. táblázat – Sorafenib kezelés előtti miR-17-5p és ECOG teljesítőképesség státusz összefüggése

		miR-17-5p	
		magas	alacsony
ECOG	0	10	3
	1	0	7

Fisher $p = 0,003$

8. táblázat – A kezelés előtti miR expresszió és a klinikopatológiai paraméterek összefüggése sorafenibbel kezelt HCC betegek esetén.A Fisher-féle egzakt teszttel szignifikánsnak bizonyult összefüggések félkövér kijelöléssel jelölve ($p < 0,05$).

		miR-17-5p		miR-18a		miR-21		miR-34a		miR-122		miR-195		miR-210		miR-214		miR-221		miR-222		miR-223		miR-224		miR-328	
		high	low	high	low	high	low	high	low	high	low	high	low	high	low	high	low	high	low	high	low	high	low	high	low	high	low
Nem	Férfi	7	9	7	9	7	9	7	9	7	9	7	9	7	9	8	8	8	8	7	9	8	8	10	6	8	8
	Nő	3	1	3	1	3	1	1	3	3	1	1	3	3	1	2	2	2	2	3	1	2	2	0	4	2	2
Életkor	≥68	4	6	4	6	5	5	4	6	5	5	4	6	4	6	4	6	3	7	4	6	3	7	4	6	3	7
	<68	6	4	6	4	5	5	6	4	5	5	6	4	6	4	6	4	7	3	6	4	7	3	6	4	7	3
Etiológia	Vírusos	4	5	4	5	7	2	3	6	3	6	4	5	3	6	5	4	2	7	3	6	3	6	4	5	3	6
	Egyéb	6	5	6	5	3	8	7	4	7	4	6	5	7	4	5	6	8	3	7	4	7	4	6	5	7	4
Tumor szám	Szoliter	3	3	2	4	4	2	2	4	2	4	3	3	3	3	2	4	2	4	3	3	3	3	4	2	2	4
	>1	7	7	8	6	6	8	8	6	8	6	7	7	7	7	8	6	8	6	7	7	7	7	6	8	8	6
Méret	>5 cm	4	6	3	7	5	5	5	5	4	6	3	7	5	5	2	8	6	4	5	5	6	4	6	4	3	7
	≤5 cm	6	4	7	3	5	5	5	5	6	4	7	3	5	5	8	2	4	6	5	5	4	6	4	6	7	3
Child-Pugh	A	7	9	7	9	8	8	7	9	7	9	7	9	6	10	8	8	6	10	6	10	7	9	7	9	7	9
	B	3	1	3	1	2	2	3	1	3	1	3	1	4	0	2	2	4	0	4	0	3	1	3	1	3	1
ECOG	0	10	3	9	4	7	6	5	8	7	6	8	5	8	5	8	5	6	7	6	7	8	5	6	7	9	4
	1	0	7	1	6	3	4	5	2	3	4	2	5	2	5	2	5	4	3	4	3	2	5	4	3	1	6
AFP	≥10	6	7	7	6	7	6	7	6	6	7	7	6	6	7	7	6	8	5	8	5	6	7	6	7	7	6
	<10	4	3	3	4	3	4	3	4	4	3	3	4	4	3	4	3	2	5	2	5	4	3	4	3	3	4

5.1.2 - A sorafenibbel kezelt betegek utánkövetése

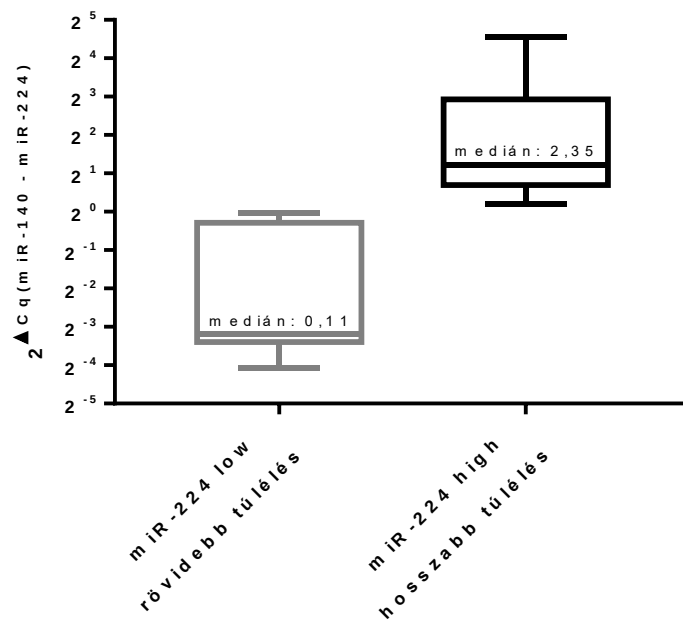
A húsz, sorafenibbel kezelt HCC-s betegből a vizsgálatunk lezárásának időpontjáig 15 halálozott el (75%) a betegség progressziójának köszönhetően. A teljes betegcsoportban a medián teljes túlélés (overall survival, OS) 6,2 hónap (95% konfidencia intervallum (CI): 2,7 – 9,3 hónap) volt, míg a progressziómentes túlélés (progression-free survival, PFS) 5 hónapnak (95% CI: 3,5 – 6,5 hónap) bizonyult.

A vizsgált miRNS-ek közül a miR-224 esetében találtunk szignifikáns összefüggést a túléléssel (**9. táblázat**). A kezelés előtt magas, illetve alacsony miR-224 szinteket mutató csoportok között a mediánok expressziós különbsége több mint 20-szorosnak mutatkozott (21,7x), jelezve a miR-224 jelentős felülregulálódását ezen tumorokban (**9. ábra**). Azon betegek, akik tumorában magas, azaz a medián fölötti kezelés előtti miR-224 expressziót találtunk, szignifikánsan hosszabb teljes túléléssel rendelkeztek a miR-224-et alacsonyan, azaz a medián alatt expresszáló esetekhez viszonyítva ($p=0,012$ log-rank teszt; **10.a ábra**). A medián OS a „magas miR-224” csoportban 39,7 hónapnak, míg az „alacsony miR-224” csoportban 5,7 hónapnak adódott. A kockázati arány (hazard ratio, HR) 0,24 [95% CI: 0,07 – 0,79] volt (8. táblázat). Progressziómentes túlélés szempontjából hasonló eredményt kaptunk: a miR-224-et magasan expresszáló csoportban szignifikánsan hosszabb volt a progresszióig eltelt idő ($p=0,029$ log-rank teszt, **10.b ábra**). A medián PFS „magas miR-224” csoportban 13 hónapnak, míg az „alacsony miR-224” csoportban 4,5 hónapnak adódott, a HR 0,28-nak bizonyult [95% CI: 0,09 – 0,92] (8. táblázat).

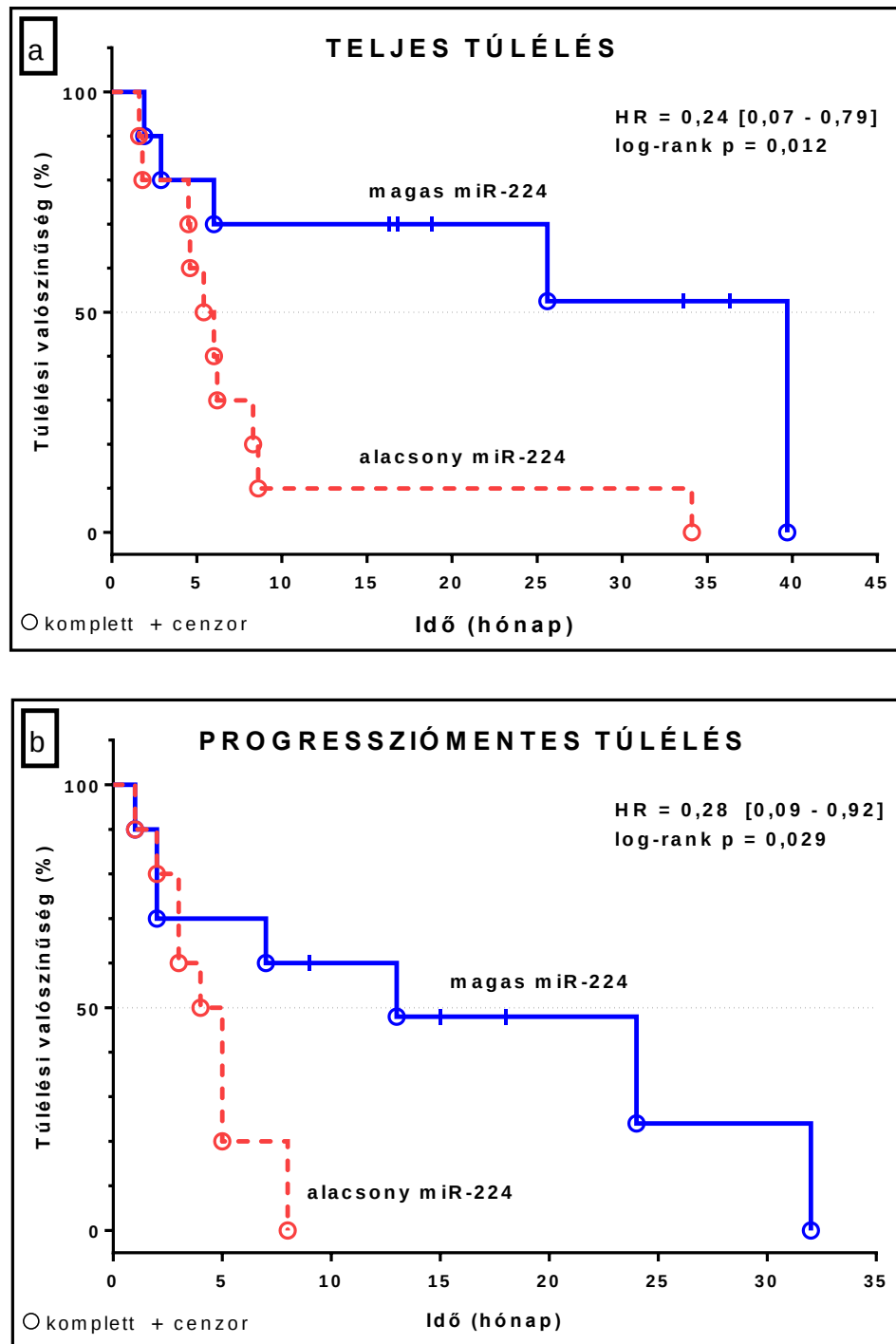
9. táblázat – Log-rank és univariáns Cox analízis kockázati arány (HR) eredményei

Paraméter	Kategória	Teljes túlélés			Progressziómentes túlélés		
		HR [95% CI]		log-rank p érték	HR [95% CI]		log-rank p érték
miR-17-5p	high	1,09	[0,37 - 3,26]	0,88	1,08	[0,40 - 2,91]	0,87
miR-18a	low	1,57	[0,52 - 4,69]	0,43	1,20	[0,45 - 3,22]	0,69
miR-21	low	1,03	[0,36 - 2,96]	0,95	0,88	[0,33 - 2,35]	0,78
miR-34a	low	1,84	[0,61 - 5,54]	0,26	1,31	[0,47 - 3,63]	0,59
miR-122	high	1,15	[0,40 - 3,33]	0,79	1,81	[0,63 - 5,17]	0,25
miR-195	low	1,42	[0,47 - 4,26]	0,54	1,03	[0,38 - 2,75]	0,96
miR-210	high	1,70	[0,58 - 4,98]	0,32	1,83	[0,65 - 5,16]	0,23
miR-214	high	0,62	[0,20 - 1,87]	0,40	0,52	[0,19 - 1,46]	0,21
miR-221	high	1,92	[0,61 - 6,10]	0,29	1,32	[0,47 - 3,66]	0,58
miR-222	high	2,04	[0,64 - 6,46]	0,25	1,43	[0,51 - 3,99]	0,47
miR-223	high	1,25	[0,43 - 3,62]	0,68	2,15	[0,71 - 6,45]	0,16
miR-224	high	0,24	[0,07 - 0,79]	0,01	0,28	[0,09 - 0,92]	0,03
miR-328	high	0,66	[0,22 - 2,00]	0,47	0,66	[0,24 - 1,86]	0,42

OS: teljes túlélés; PFS: progressziómentes túlélés; HR: kockázati arány; CI: konfidencia intervallum



9. ábra – A kezelés előtt magas miR-224 szinteket és hosszabb túlélést mutató betegek medián expressziója több mint 20-szorosa az miR-224-et alacsonyan expresszáló, rövidebb túlélést mutatókénak.



10. ábra – A kezelés előtti magas miR-224 expresszió (medián fölött) szignifikánsabb hosszabb teljes (a) és progressziómentes (b) túléléssel társult az alacsony (medián alatti) miR-224 expresszióhoz viszonyítva sorafenibbel kezelt HCC betegeknél. Kompletต์ esemény = a beteg meghalt vagy a daganat progrediált; cenzorált esemény = véget ért az utánkövetési időszak; HR = hazard ratio / kockázati arány

5.2 - Reszekált HCC esetek claudin expressziós vizsgálata

5.2.1 - Immunhisztokémiai vizsgálatok eredménye

Az immunhisztokémiai reakciók kvantitatív, morfológiai elemzésének eredményeit a 9.a és 9.b táblázatok mutatják. Mivel cirrózisban az proliferáló epeutak erős claudin festődést mutatnak, ezért a morfológia eredményeit mind az epeúti pozitivitást beszámítva (**10.a táblázat**), mind epeúti pozitívítás nélkül (**10.b táblázat**) megadtuk, felfedve így külön a májsejt pozitívítás területszázalékos arányát. Vizsgálatainkban a *normál – cirrózis – HCC tengelyt* kívántuk vizsgálni a normál májat (normal liver, NL), a nem-cirrotikus tumor környéki májszövetet (non cirrhotic surrounding liver, ncSL), a cirrotikus környező májszövetet (cirrhotic surrounding liver, cSL), a nem cirrotikus talajon kifejlődő HCC-t (non cirrhotic HCC, ncHCC) és a cirrotikus talajon kifejlődő HCC-t (cirrhotic HCC) hasonlítva össze.

10.a táblázat – Morfológiai eredmények epeúti pozitívítással együtt

	Csoport	Átlag terület %	Standard hiba	K-W teszt p-érték	vs ncHCC p-érték	vs cSL p-érték	vs ncSL p-érték	vs NL p-érték
Claudin-1	cHCC	2,54	0,50	<0,001*	0,018*	1,000	<0,001*	0,017*
	ncHCC	0,77	0,20			0,088	1,000	1,000
	cSL	1,48	0,24				0,001*	0,060
	ncSL	0,37	0,08					1,000
	NL	0,40	0,15					
Claudin-2	cHCC	1,80	0,33	<0,001*	1,000	0,017*	0,038*	0,946
	ncHCC	1,41	0,29			<0,001*	<0,001*	0,115
	cSL	3,77	0,17				1,000	1,000
	ncSL	3,43	0,24					1,000
	NL	3,10	0,55					
Claudin-3	cHCC	0,41	0,09	0,238	0,981	1,000	1,000	1,000
	ncHCC	0,27	0,07			0,674	1,000	1,000
	cSL	0,39	0,07				1,000	1,000
	ncSL	0,27	0,04					1,000
	NL	0,25	0,07					
Claudin-4	cHCC	0,00	0,00	<0,001*	1,000	0,019*	<0,001*	0,001*
	ncHCC	0,00	0,00			0,005*	<0,001*	<0,001*
	cSL	0,03	0,004				1,000	1,000
	ncSL	0,02	0,003					1,000
	NL	0,01	0,003					
Claudin-7	cHCC	0,54	0,15	<0,001*	0,315	1,000	0,144	0,054
	ncHCC	0,24	0,06			0,002*	1,000	1,000
	cSL	1,00	0,18				0,001*	0,001*
	ncSL	0,23	0,05					1,000
	NL	0,11	0,05					

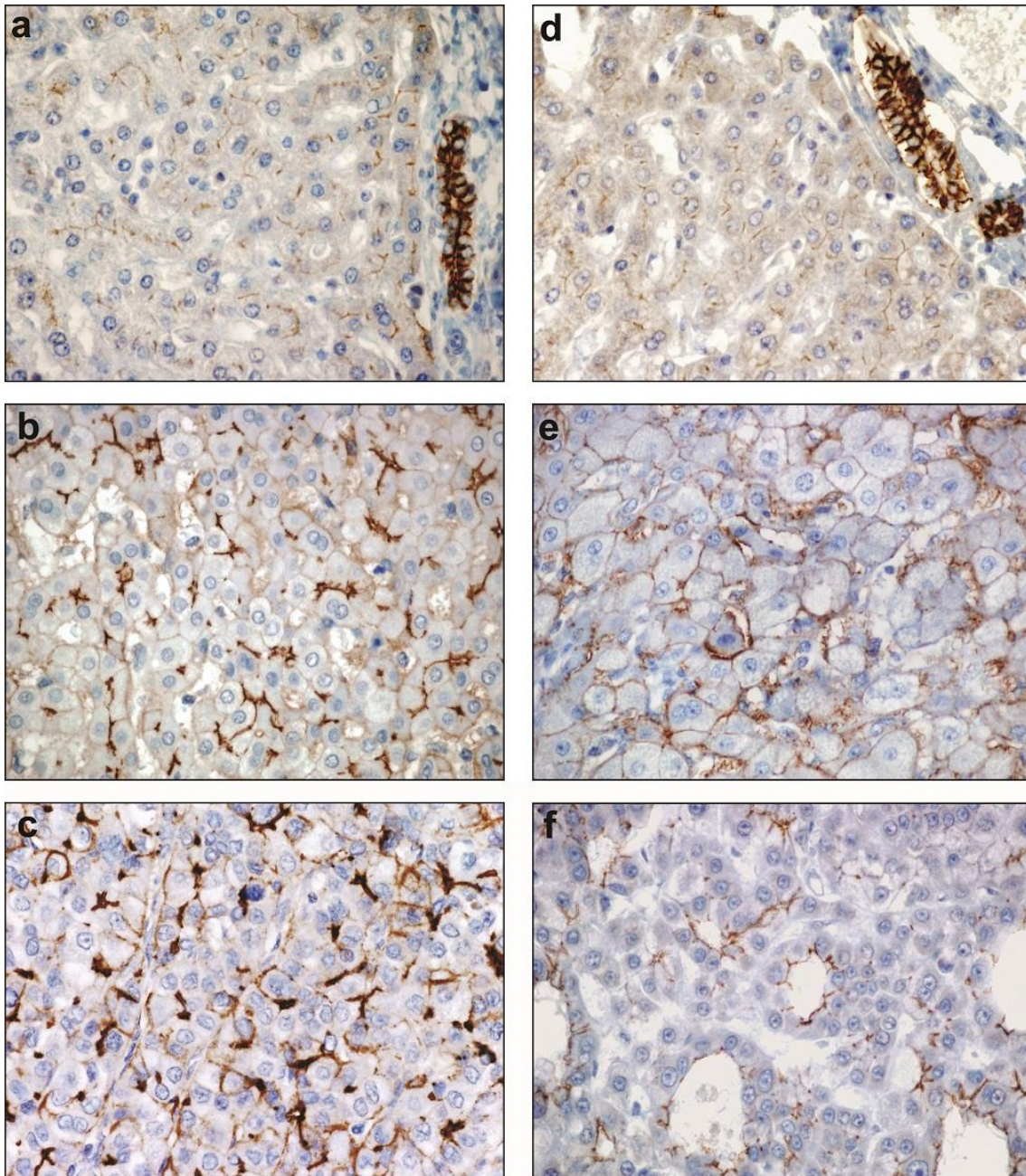
10.b táblázat – Morfometriai eredmények epeúti pozitivitás nélkül (ú.m. májsejt pozitivitás)

	Csoport	Átlag terület %	Standard hiba	K-W teszt p-érték	vs ncHCC p-érték	vs cSL p-érték	vs ncSL p-érték	vs NL p-érték
Claudin-1	cHCC	2,54	0,50	<0,001*	0,028*	1,000	<0,001*	0,028*
	ncHCC	0,77	0,20			1,000	0,631	1,000
	cSL	1,06	0,19				0,014*	0,584
	ncSL	0,27	0,06					1,000
	NL	0,38	0,14					
Claudin-2	cHCC	1,80	0,33	<0,001*	1,000	0,017*	0,037*	0,980
	ncHCC	1,41	0,29			<0,001*	<0,001*	0,121
	cSL	3,76	0,17				1,000	1,000
	ncSL	3,42	0,24					1,000
	NL	3,09	0,55					
Claudin-3	cHCC	0,41	0,09	0,280	0,902	1,000	1,000	1,000
	ncHCC	0,27	0,07			0,914	1,000	1,000
	cSL	0,36	0,06				1,000	1,000
	ncSL	0,25	0,04					1,000
	NL	0,24	0,07					
Claudin-4	cHCC	0,00	0,00	-				
	ncHCC	0,00	0,00					
	cSL	0,00	0,00					
	ncSL	0,00	0,00					
	NL	0,00	0,00					
Claudin-7	cHCC	0,54	0,15	<0,001*	0,252	1,000	0,036*	0,016*
	ncHCC	0,24	0,06			0,236	1,000	1,000
	cSL	0,73	0,19				0,033*	0,015*
	ncSL	0,16	0,03					1,000
	NL	0,09	0,04					

Lábjegyzet: A vízszintes versus függőleges csoportok statisztikai összehasonlítása Kruskal-Wallis teszttel (K-W teszt) és post hoc analízissel történt. A szignifikáns különbségeket ($p < 0,05$) csillagok jelölik.

5.2.1.1 - Claudin-1 – Emelkedett expresszió cirrózisban és HCC-ben

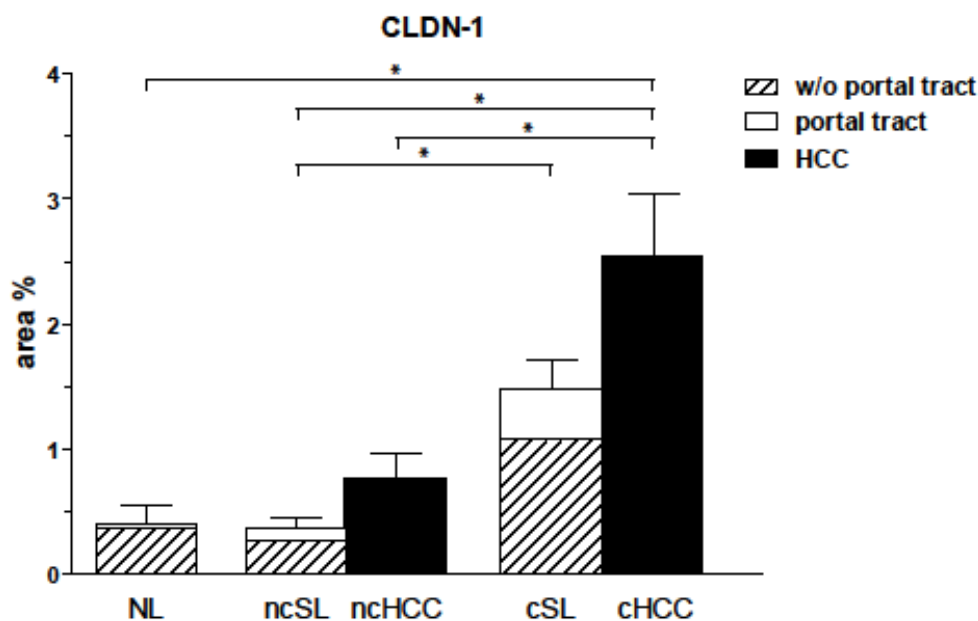
Immunhisztokémiával a claudin-1 pozitivitás minden esetben a sejtek membránjában jelent meg. A normál és tumor környéki nem cirrotikus májszövetben az epeutak erős, míg a májsejtek gyenge-közepes, apikális, lineáris pozitivitást mutattak. Ezzel szemben cirrózisban a festődés gyakran a májsejtek teljes területén, változó intenzitással jelentkezett. Ez a jelenség különösen a cirrotikus göbök széli részein volt kifejezett. Hét cirrotikus esetben továbbá intenzív membránfestődés volt megfigyelhető diszplasztikus fókuszokban is. A HCC-k a cirrózisban látottakhoz hasonló mintázatot mutattak, közepes-erős immunreakciót adva (**11.a,b,c ábra**).



11. ábra – Claudin-1 (a,b,c) és claudin-7 (d,e,f) immunhisztokémia. Claudin-1 a) normál májban, b) cirrózisban, c) HCC-ben. Claudin-7 d) normál májban, e) cirrózisban, f) cHCC-ben. Eredeti nagyítás: 600X.

Az immunreakciók kvantitatív, területszázalékos mérése alapján a claudin-1 szignifikánsan magasabb expressziót mutatott cSL-ben az ncSL-hez képest. A HCC-k összességében szintén magasabb kifejeződéssel bírtak normál és nem-cirrotikus májhoz képest, azonban ez csak a cirrotikus HCC-k esetében bizonyult szignifikánsnak. A cHCC ugyanis még a cSL-nél is magasabb claudin-1 expressziót mutatott, szignifikánsan

magasabbat, mint az ncHCC. Habár az epeút-proliferáció nagyban hozzájárult a cSL-ben mért magas claudin-1 területszázalékokhoz, a cirrózissal járó claudin-1 felülszabályozódás az epeúti pozitivitás nélkül is szignifikáns maradt, mutatva a májsejtek érintettségét (10.a és b táblázat). A különbségeket - oszlopdiagramon ábrázolva - a **12. ábra** mutatja.



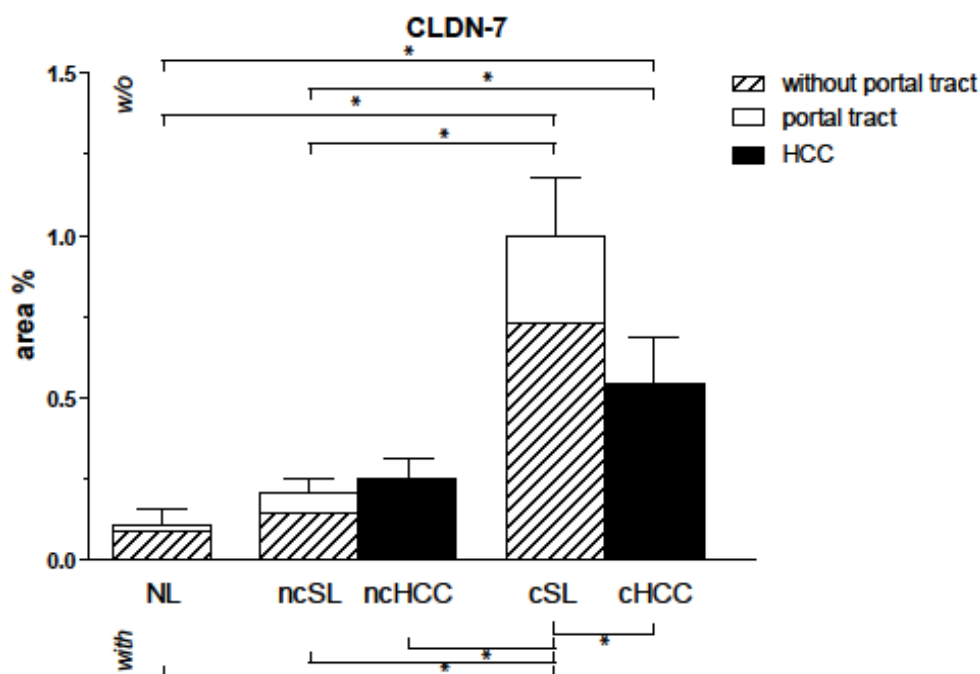
12. ábra – Claudin-1 morfometria eredményei. A csoportok statisztikai összehasonlítása Kruskal-Wallis teszttel történt: mind epeutakkal, mind epeutak nélkül ugyanazt az eredményt kaptuk. A szignifikáns különbségeket ($p < 0,05$) csillagok jelölik. (A rövidítések magyarázatát lásd a szövegben.)

5.2.1.2 - Claudin-7 – Emelkedett expresszió cirrózisban és HCC-ben

A claudin-7 erős, membranózus epeúti és gyenge májsejt immunreakciót adott nem cirrotikus májszövetben. Cirrotikus májparenchymában a májsejtek közepes-erős pozitivitást mutattak, a festődés kifejezettebb volt diszplastikus fókuszokban. HCC-ben a tumorsejtek szintén közepes intenzitású festődést mutattak, mely kifejezetten jelentkezett a pseudoacináris struktúrákban (**11.d,e,f ábra**).

Morfometriával a májsejtek claudin-7 expressziója szignifikánsan magasabbnak bizonyult cSL-ben, NL-hez és ncSL-hez viszonyítva. A cHCC szintén szignifikánsan emelkedett értékeket mutatott NL és ncSL májsejt-expressziójához képest (tehát epeúti

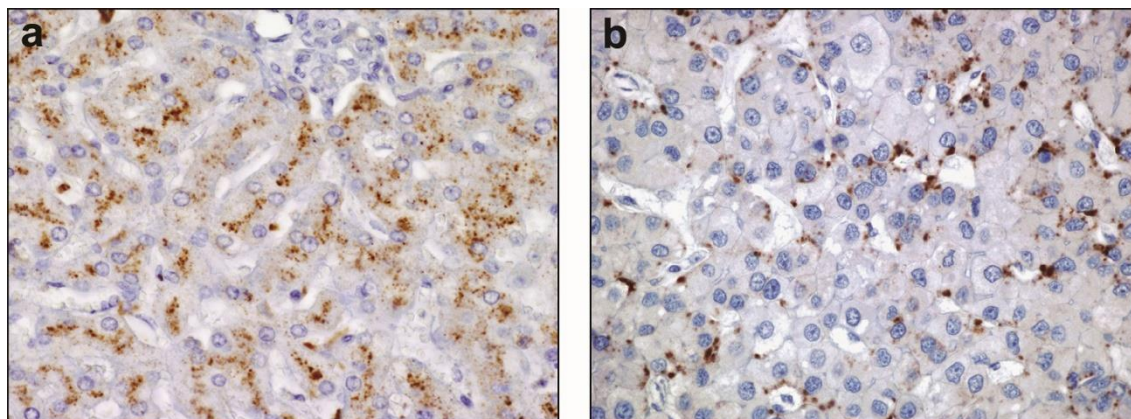
pozitivitás nélkül), viszont az expresszió nem érte el a cSL-ben látottakat. A morfológia eredményeit a 10.a és b táblázat, valamint a **13. ábra** mutatja.



13. ábra – Claudin-7 morfológia eredményei. A csoportok statisztikai összehasonlítása Kruskal-Wallis teszttel történt: az epeutakkal kapott eredmények alul („with”), az epeutak nélkül kapott eredmények felül láthatók („w/o”). A szignifikáns különbségeket ($p < 0,05$) csillagok jelölik. (A rövidítések magyarázatát lásd a szövegben.)

5.2.1.3 - Claudin-2 – Csökkent expresszió HCC-ben

A claudin-2 immunhisztokémiailag a szokásos lineáris claudinfestődéssel szemben, granuláris, perimembránózus megjelenést mutatott a sejtekben, mely ismert jelenség az irodalomban. (**14. ábra**) Szignifikáns eltérés nem volt kimutatható a nem tumoros szövetek között. Ezzel szemben a claudin-2 szórványos megjelenéssel, szignifikánsan alacsonyabb expressziót mutatott mind ncHCC-ben, mind cHCC-ben (10.a és b táblázat).



14. ábra – Claudin-2 immunhisztokémia. Claudin-2 a) normál májban, b) HCC-ben. Eredeti nagyítás: 600X.

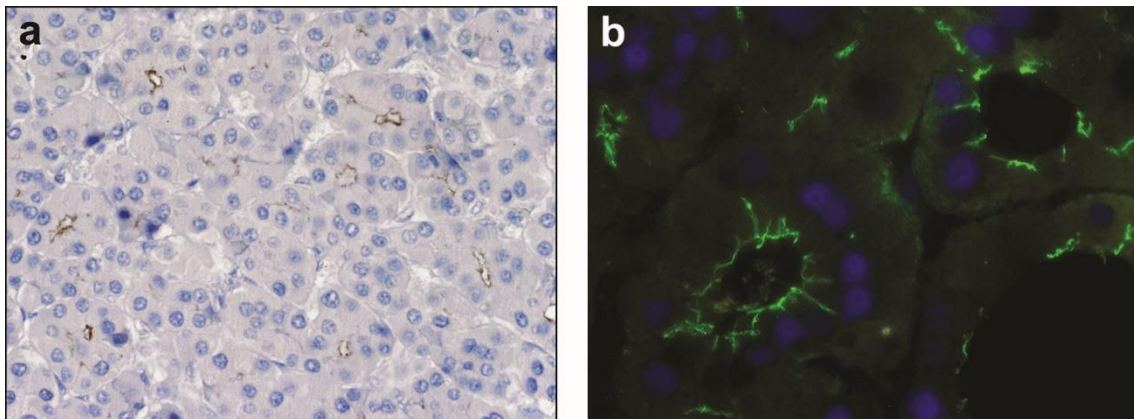
5.2.1.4 - Claudin-3 – Változatlan expresszió cirrózisban és HCC-ben

A claudin-3 nagyon gyenge membranózus immunreakciót adott mind cirrotikus, mind nem cirrotikus májsejteken, míg az epeúti hám erősebben festődött. A HCC sejteken is csak gyenge, lineáris membránpozitivitás mutatkozott.

Kvantitatív morfometriai vizsgálattal nem mutatkozott szignifikáns különbség a vizsgált csoportok között (10.a és b táblázat).

5.2.1.5 - Claudin-4 – Az epeutakra és egy HCC altípusra korlátozódik

Immunhisztokémiai festéssel claudin-4 pozitivitás nem jelentkezett normál vagy cirrotikus májsejteken, erős, membranózus reakció volt viszont megfigyelhető az epeúti hámsejtekben, erősebb festődéssel a lumenális pólusokon. A vizsgált tumoros minták nagy része egyáltalán nem adott pozitív immunreakciót, mindösszesen 4/30 esetben volt némi festődés látható a tumorsejtek alkotta pszeudoacinusok apikális pólusán (**15. ábra**), tehát a claudin-4 kifejeződés a HCC pszeudoglanduláris szövettani altípusára korlátozódott.



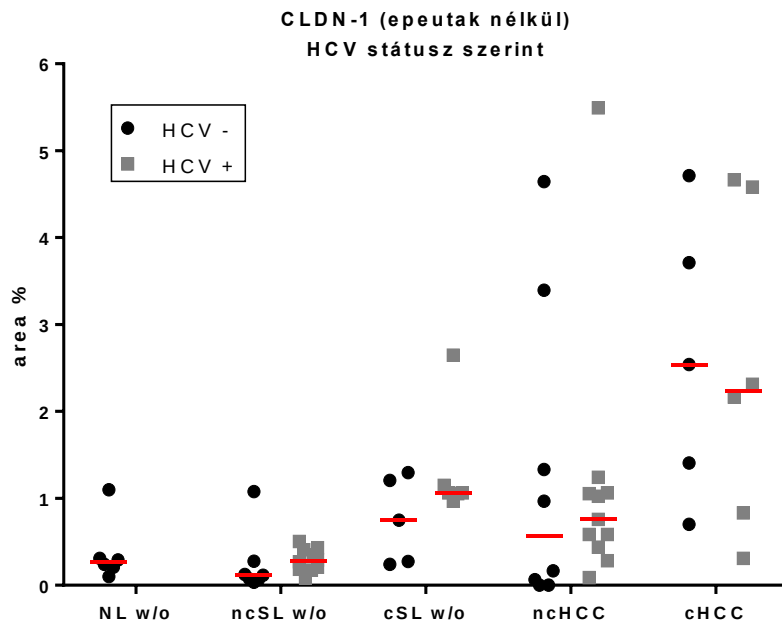
15. ábra – Claudin-4 immunhisztokémia (a) és immunfluoreszcencia (b). Claudin-2 pozitivitas HCC pseudoacinusok luminális pólusán. Eredeti nagyítás: a) 600X, b) 630X.

5.2.1.6 - A HCV hatása a vizsgált claudinok expressziójára

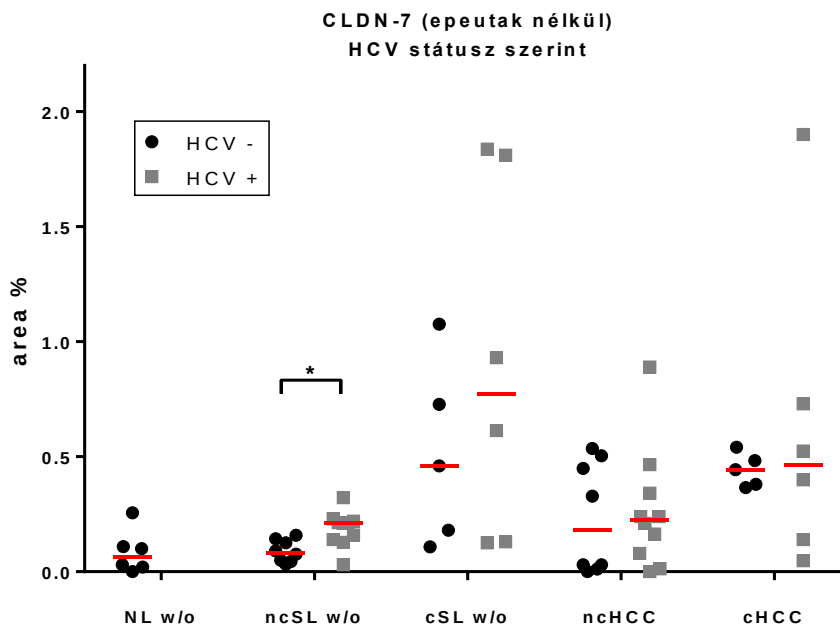
A kapott claudin-1 és claudin-7 morfometriai eredményeket HCV státusz szerint is vizsgáltuk mind a nem tumoros, mind a tumoros csoportokban. (**16. ábra** és **17. ábra**)

Érdekes módon a HCV pozitív nem tumoros minták némiképp emelkedett májsejt claudin-1 expressziót mutattak a HCV negatív mintákhoz képest, a különbségek azonban nem bizonyultak szignifikánsnak.

Egyedüli szignifikáns különbségként a HCV pozitív ncSL minták emelkedett claudin-7 expressziója mutatkozott a HCV negatív ncSL mintákhoz képest (**17. ábra**). Fontos azonban megjegyezni, hogy míg a HCV+ minták mind fibrózissal társultak, addig a HCV– mintákban nem volt jelen fibrózis, mely magyarázhatja az észlelt különbséget.



16. ábra – Claudin-1 morfológia eredményei HCV státusz szerinti bontásban. A csoportokon belül a HCV+ és HCV- esetek statisztikai összehasonlítása Mann-Whitney U teszttel történt. A szignifikáns különbségeket ($p < 0,05$) csillagok jelölik. (A rövidítések magyarázatát lásd a szövegben.)

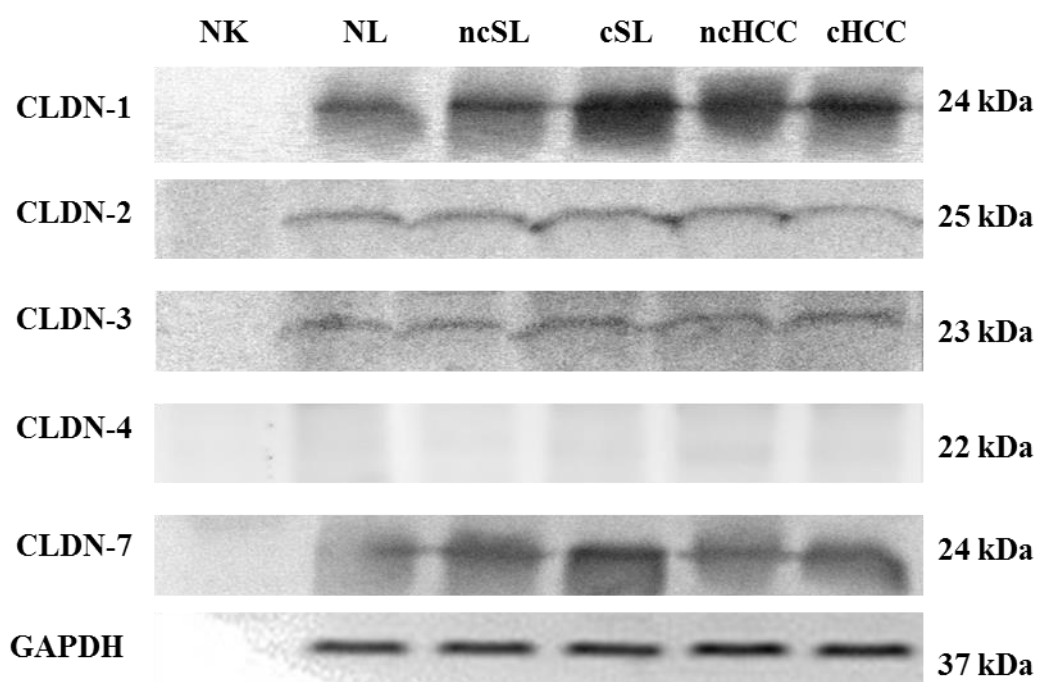


17. ábra – Claudin-7 morfológia eredményei HCV státusz szerinti bontásban. A csoportokon belül a HCV+ és HCV- esetek statisztikai összehasonlítása Mann-Whitney U teszttel történt. A szignifikáns különbségeket ($p < 0,05$) csillagok jelölik. (A rövidítések magyarázatát lásd a szövegben.)

5.2.2 - Az immunreakciók specificitásának ellenőrzése Western blottal

A Western blot technikát a cirrózisban és HCC-ben immunhisztokémiai vizsgálattal igazolt megváltozott claudin festődés specificitásának ellenőrzésére, az expressziós különbségek megerősítésére használtuk. A mintákban specifikus immunreaktív sávokat találtunk a claudinok mólsúlyának megfelelően, mely claudin-1, -2, -3, 4 és -7 esetében rendre 24, 25, 23, 22 és 24 kDa. (18. ábra)

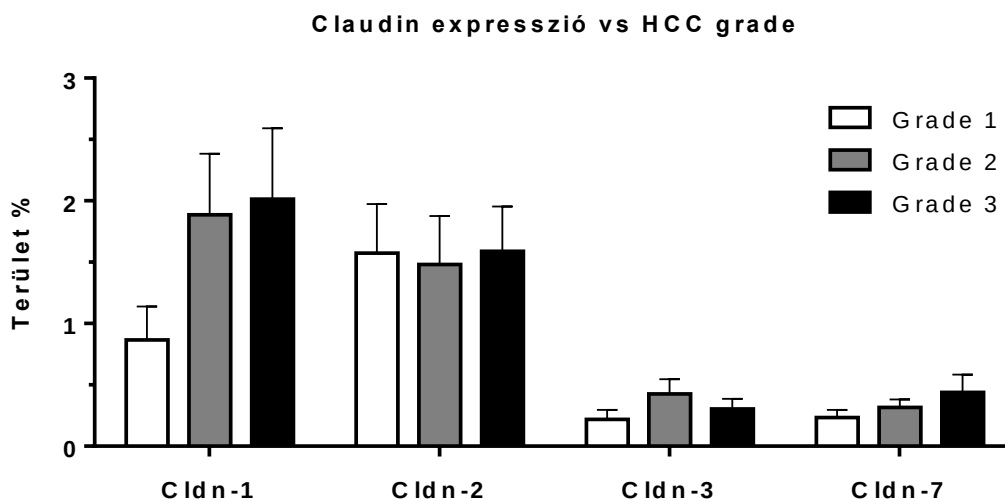
A reprezentatív mintákon végzett Western blot vizsgálatok megerősítették a morfometriával kapott eredményeket. A claudin-1 és -7 expresszió fokozottabbnak bizonyult cirrózisban normál májhoz viszonyítva és a claudin-1 HCC-ben szintén kifejezett expressziót mutatott. A claudin-2 expresszió a cHCC-ben volt a legalacsonyabb, a claudin-3 és claudin-4 pedig nem mutatott különbséget a vizsgált csoportok között.



18. ábra – Claudinok Western blot vizsgálata. NK negatív kontroll, NL normál máj, ncSL nem cirrotikus környező máj, cSL cirrotikus környező máj, ncHCC nem cirrotikus talajon kialakult HCC, cHCC cirrózis talaján kialakult HCC.

5.2.3 - Claudin expresszió összevetése HCC differenciáltsági fokkal és túlélési adatokkal

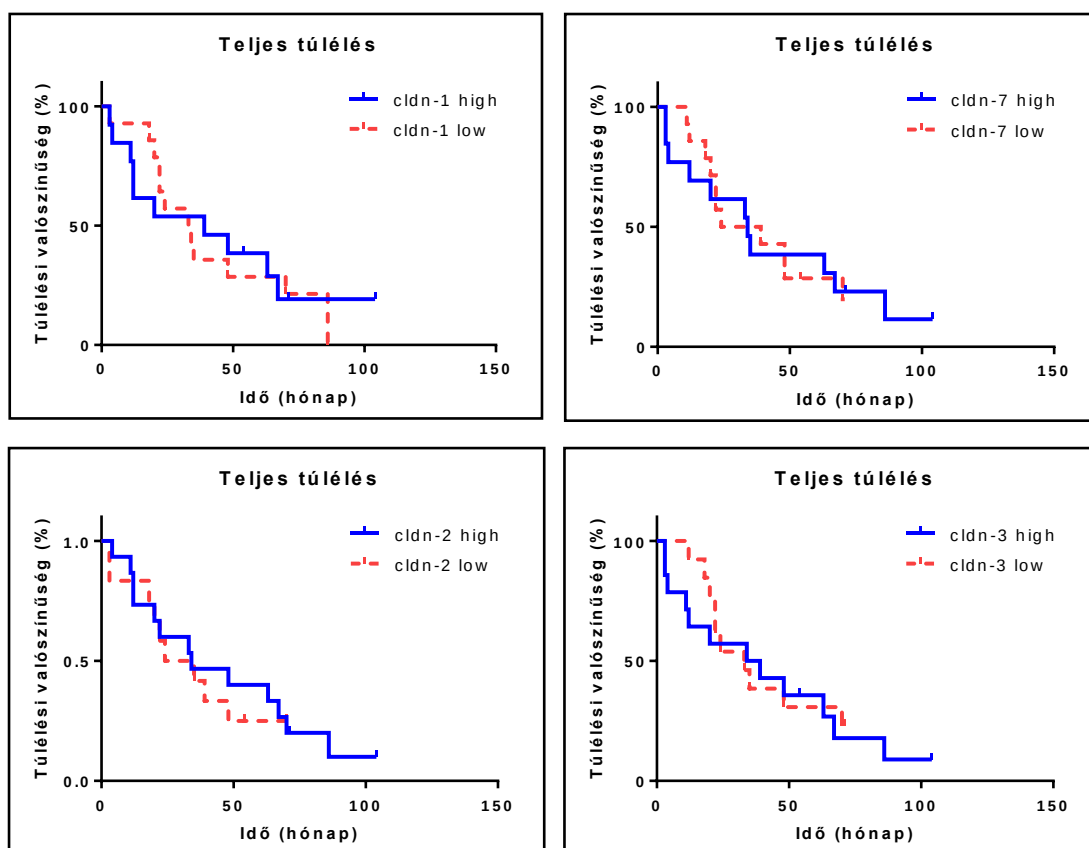
A HCC-k claudin kifejeződésének tumor differenciáltság szerinti vizsgálatakor nem volt szignifikáns összefüggés a HCC grádusával. Emellett azonban a claudin-1 expresszió szempontjából emelkedő tendencia mutatkozott a rosszabbul differenciált HCC-kben (**19. ábra**). A claudin-4 expresszió tumorokban nem volt mérhető mennyiségű, ezért nem ábrázoltuk.



19. ábra – Claudin expresszió összefüggése a tumor differenciáltsági fokkal. A HCC-k claudin expressziója nem mutatott szignifikáns összefüggést a tumor differenciáltsági fokkal, bár a claudin-1 kifejeződés emelkedő tendenciát mutatott rosszabbul differenciált HCC-kben.

A harminc, reszekált HCC-s betegből a vizsgálatunk lezárásának időpontjáig 25 halálozott el a betegség progressziójának következtében (83%). A teljes betegcsoportban a medián teljes túlélés 33 hónap (95% konfidencia intervallum (CI): 18 – 48 hónap) volt.

A betegeket a HCC-k claudin expresszió mediánja szerint osztottuk „claudin high” illetve „claudin low” csoportokba. Vizsgálatunkban nem találtunk szignifikáns összefüggést a HCC-k claudin expressziója és a túlélés között (**20. ábra**).



20. ábra – Claudin expresszió összefüggése a teljes túléléssel. A HCC-kben talált magas (high), illetve alacsony (low) claudin expresszió nem mutatott szignifikáns összefüggést a vizsgált betegek túlélésével. A claudin-4 tumor expresszió praktikusán negatív volt, ezért nem ábrázoltuk.

6 - MEGBESZÉLÉS

A hepatocelluláris karcinóma (HCC) a máj primér, májsejt eredetű, malignus daganata, növekvő előfordulást és nagyon magas halálozást mutat a fejlett világban. A daganatról szerzett egyre több információ sajnos még mindig nem elégséges ahhoz, hogy átfogó képet kapjunk biológiai viselkedéséről. Nem pontosan tisztázott például a HCC kialakulásának patomechanizmusa, továbbá kevés megbízható markerrel rendelkezünk a már kialakult daganatok kórlefolyásának előrejelzésére. Mint minden más rosszindulatú daganat esetében, itt is a megelőzés, illetve a korai diagnosztika lenne döntő jelentőségű a kórjóslat szempontjából, azonban a tünetszegény kialakulás miatt a HCC-s betegek többsége csak későn, már előrehaladott stádiumban kerül diagnózisra.

Az előrehaladott stádiumú HCC-s betegek kezelésében az első, bizonyítottan hatékony target terápiát a sorafenib jelentette, mely szignifikáns túlélési előnyt nyújtott, célzott molekuláris hatásmechanizmussal [27, 28]. A sorafenib kis molekulású tirozin-kináz gátlóként a HCC-ben gyakran diszregulált jelátviteli útvonalakat befolyásolja, többek között a cRAF, VEGFR, PDGFR tirozin-kináz receptorok gátlásával. Sajnálatos módon a sorafenib terápia nagyon magas költségekkel és csak limitált klinikai hatékonysággal bír, átlagosan kb. 3 hónappal nyújtva meg a túlélést. Érdekes módon az Angol Egészségügyi és Klinikai Kiválóságok Nemzeti Intézete (NICE) a költséghatékonyságra hivatkozva 2010-ben nem is javasolta előrehaladott HCC-ben a sorafenib kezelést, mert irányelveik szerint a szerény túlélési előny nem elégséges, hogy igazolja a terápia magas költségét [156]. Magyarországon egy havi sorafenib (Nexavar - 4x28 tabletta) ára közel 1 millió forint [157]. Ezen túlmenően a kezelt betegek csak mintegy fele reagál a sorafenib terápiára, mely a daganatok heterogenitásának, illetve megfelelő prediktív biomarkerek hiányának tudható be. A betegek terápiás válaszkészségének előrejelzése tehát olyan igény a klinikum részéről, mely validált biomarkerek hiányában még nem került megoldásra.

Vizsgálatainkban ezért fordultunk a mikro-RNS-ek felé, melyek a sejtek génkifejeződésének szabályozásában játszanak fontos szerepet, így praktikusán szinte minden sejtfunkciót befolyásolni tudnak. Ezek alapján nem meglepő, hogy számos daganatban, így HCC-ben is megváltozott expresszióval bírnak, ami diagnosztikus,

terápiás és prognosztikus potenciált rejt magában. A miRNS-ek nagy előnye, hogy kis méretük miatt izolálásuk, kimutatásuk olyan mintákból is hatékonyan elvégezhető, amikben a nagyobb hírvivő mRNS-ek például már csak fragmentáltak jelen. Vékonytű aspirációs citológiai kenetek miRNS vizsgálatát először pajzsmirigyárból vett mintákon végezték el, és a miRNS-ek kiegészítő diagnosztikus felhasználási lehetőségét mutatták ki [158]. Ezt később a hasnyálmirigyárak FNAB mintái követték, szignifikáns összefüggést találva a miRNS expresszió és a betegek túlélése között [159].

Jelen vizsgálatban munkacsoportunk HCC-kből vett FNAB minták miRNS vizsgálatát végezte el a világon elsőként. Habár korábban több kutatócsoport is vizsgálta a miRNS-ek megváltozott expresszióját HCC-ben, ezek a vizsgálatok általában sebészileg reszekált mintákat használtak fel [116, 160-162]. Az aktuális terápiás irányelvek szerint sebészi kezelés azonban csak korai stádiumú HCC-k esetében jön szóba, tehát ezen kutatások elsősorban a korai HCC-kre szorítkoztak. Jelen vizsgálatunkba előrehaladott stádiumú, nem reszekálabilis HCC-kből vett diagnosztikus aspirációs citológiai mintákat vettünk be, azon céllal, hogy a kezelés előtti miRNS expresszió és a sorafenib terápia alatti túlélés összefüggéseit vizsgáljuk. A nemzetközi irodalomban elvárt, részletes klinikai adatok komplettálása során a kezdeti nagyszámú vizsgált beteg közül relatíve kis esetszámú csoportban vált lehetővé, hogy homogén, más terápiás modalitásokkal nem kezelt vizsgálati csoportot képezhessünk. Továbbá olyan betegeket kellett kiválasztani, akiknek az utánkövetési adatai megbízhatóan rendelkezésre álltak (ez utóbbi, a sokszor nem ideális beteg compliance miatt, nem mindig érvényesül). A szigorú szabályok szerint beválogatott húsz beteg a fentiek alapján sem sebészi, sem lokoregionális, sem szisztémás kezelésben nem részesült a sorafenib terápia megkezdése előtt, így a kapott miRNS kifejeződési eredmények várhatóan a tumorok eredeti, kezelés által nem befolyásolt molekuláris hátterét tükrözték. Továbbá így a túlélési mutatókat más terápiás beavatkozások nem befolyásolták. Érdekes módon a miénkhöz hasonlóan egy német kutatócsoport vizsgálatába is mindössze tizenkilenc sorafenibbel kezelt beteg került bevonásra [163]. Kutatásainkban a HCC-ben irodalmi adatok alapján jelentős és gyakori eltérést mutató, valamint munkacsoportunk által korábban számos alkalommal tanulmányozott miRNS-ek expresszióját vizsgáltuk [164, 165].

Eredményeink alapján összefüggést találtunk egyes miRNS-ek expressziója és a betegek klinikopatológiai jellemzői, valamint túlélése között.

A miR-214 expresszió magas szintje a kisebb méretű tumorokban volt gyakrabban megtalálható, míg a magas miR-17-5p expresszió a betegek jobb ECOG teljesítőképességi státuszával asszociálódott. A **miR-214** és tumorméret között talált összefüggés jól illeszkedik korábbi irodalmi adatokhoz, hiszen a miR-214 mint tumorszuppresszor miRNS ismert [166]. HCC sejtvonalon a miR-214 ektópiás expressziója ugyanis a HCC-kben gyakran érintett, onkogén β -catenin jelátviteli útvonalon a ciklin D1, c-Myc, és TCF-1 fehérjék kifejeződését gátolta [167]. Vizsgálatunk tehát alátámasztja a miR-214 tumorszuppresszor funkcióját HCC-ben. Ezzel szemben, habár korábbi irodalmi adatok szerint a **miR-17-5p** a HCC-ben onkomir-ként viselkedő miR-17-92 tagja és számos daganatban leírták felülszabályozódását, jelen vizsgálatunkban magas szintje a betegek jobb klinikai teljesítőképességével asszociálódott. Egy kutatás szerint továbbá a miR-17-5p magas szintje a HCC-s betegek rövidebb túlélésével korrelált [160], ám jelen vizsgálatunkban nem találtunk összefüggést a miR-17-5p szint és a betegség kimenete között. Érdekes módon szintén nem találtunk összefüggést a **miR-221** szintek és a tumorszám között, habár egy korábbi irodalmi adat szerint a magas miR-221 szint a HCC multifokális megjelenésével asszociálódott [119]. A különbségek oka lehet, hogy míg a fentebbi tanulmányok célcsoportjait korai stádiumú, még reszekábilis esetek adták, addig jelen kutatásunkban nem reszekábilis daganatokat vizsgáltunk. Ezen különbségek jelzik a miRNS profil lehetséges változását a daganatok stádiumától, progressziójától függően, továbbá kiemelik az általunk is vizsgált, előrehaladott stádiumú HCC-k tanulmányozásának jelentőségét.

A miRNS szintek és a betegek túlélése közötti esetleges kapcsolatok vizsgálatakor a miR-224 kivételével nem találtunk szignifikáns összefüggést. Ez különösen érdekes, hiszen a miRNS-ek között két olyat is vizsgáltunk, amelyek korábbi kutatások alapján érzékenyíthetnek sorafenib terápiára. A máj legnagyobb mennyiségben előforduló miRNS-e a **miR-122**, mely a máj összes miRNS-ének mintegy 70%-át adja. Több kutatásban is gyakori downregulációt mutatott a vizsgált HCC-kben, mely tumorszuppresszor funkcióját jelzi [115], azonban a daganatok kisebb hányadában ugyan, de felülszabályozását is leírták, mutatva, hogy heterogén módon alakul ki a tumorra jellemző miRNS-profil [116]. *In vitro* vizsgálatokban a miR-122 ektópiás bevitele a miR-

122-t nem expresszáló tumorsejtekbe szignifikáns mértékben növelte a sorafenib túlélést és növekedést gátló hatását [116]. Tehát a miR-122 jobb sorafenibre adott válaszkészséget jelentett *in vitro*. Továbbá egy másik miRNS, a **miR-34a** a Bcl-2 protein gátlásán keresztül a sorafenib toxicitását és apoptózist indukáló hatását erősítette *in vitro* kísérletekben [125]. A mi vizsgálati anyagunkban nem mutattuk ki a magasabb *in vivo* miR-122 vagy miR-34a szinttel kapcsolatban a betegek sorafenibre adott jobb válaszkészségét, a betegek hosszabb túlélését.

Ezzel szemben érdekes módon a kezelés előtti **miR-224** expresszió szignifikáns összefüggést mutatott a betegek teljes és progressziómentes túlélésével, mutatva ezen miRNS prediktív potenciálját. A miR-224 gyakori overexpresszióját már leírták HCC-ben, ahol onkomiR-ként a tumorsejtek migrációját, invázióját, proliferációját és apoptóziskészségét befolyásolja [168]. Ezen túlmenően emelkedett szintje méhnyakrákban [169] és gliómában [170] szenvedő betegekben is rosszabb prognózissal társult. HCC-s betegekben továbbá, habár a miR-224 expresszió önmagában nem korrelált a prognózissal, a miR-224 magas szintje és targetjének, a SMAD4-nek szimultán csökkent expressziója rövidebb túlélési idővel társult [171]. Ez jelenlegi eredményeinkkel első ránézésre talán ellentmondásban lévőnek tűnhet, hiszen vizsgálatunkban a magas miR-224 szint jobb túléléssel társult; továbbá a hosszabb túlélésű csoportban a miR-224 medián expressziója több mint 20-szorosa volt a miR-224-et alacsonyan expresszáló, rosszabb túlélésű csoporthoz képest, mely jelzi ezen miRNS jelentős felülregulálódását a jobb túlélési rátákat mutató csoportban. Ezen látszólagos ellentmondás azonban jelentheti azt is, hogy a magas miR-224 expressziójú daganatok jobban reagálnak a sorafenib terápiára, ezáltal a betegség kimenetele is jobb lesz, lassabb a progresszió és hosszabb a túlélés. Ezt alátámasztják azok a megfigyelések, miszerint a miR-224 érzékenyíti a vastagbél karcinóma sejteket metotrexát kezelésre [172], továbbá HCC sejtvonalakon a celastrol a sejtek metasztatizisképző hajlamának csökkentését a miR-224 szint represszálásával éri el [173]. Ezen túlmenően HCC sejtvonalakon a miR-224 sejtciklus szabályozásban betöltött kettős hatásmechanizmusát is megfigyelték, miszerint mind osztódást, mind sejthalált képes volt indukálni [168, 174]. Ezek alapján tehát a miR-224 az irodalmi adatok tanúsága szerint egyrészt elősegítheti a tumor progresszióját, másrészt viszont fogékonyá teheti a HCC sejteket a gyógyszer indukálta apoptózisra. (Ehhez hasonló mechanizmus jó példája a Her2 szerepe emlőrákban.)

A miR-224 számos lehetséges targetje közül a PDGFR- α -t és PDGFR- β -t érdemes kiemelni [175, 176], hiszen ezek szoros kapcsolatban állnak a sorafenib hatásmechanizmusával. Érdekes módon, mindkét fehérje kifejeződése rosszabb prognózissal [177] és rövidebb teljes túléléssel társult reszekált HCC-s betegcsoportban [178], továbbá ismert, hogy tirozin-kináz receptorként a PDGFR- β a sorafenib fontos támadáspontja HCC-ben [29]. Érdekes módon egy 2013-as tanulmány – mely a miénkhez hasonlóan szintén sorafenib-kezelt HCC-s betegekből nyert biopsziás mintákat vizsgált – arra a megállapításra jutott, miszerint az alacsony PDGFR- β expresszió hosszabb teljes túléléssel korrelált [33]. Ezen eredmény nagy összhangban van jelen kutatási eredményeinkkel, hiszen az általunk vizsgált, szintén sorafenib-kezelt betegcsoportban a magas kezelés előtti miR-224 expresszió – ami a PDGFR- β lehetséges negatív szabályozója – szignifikánsan hosszabb túléléssel társult. Ez felveti tehát, hogy a miR-224 expresszió változása a PDGFR- β kifejeződés modulálásán keresztül befolyásolja a tumorok biológiai viselkedését, valamint terápiás válaszkészségét. A két molekula közötti direkt kapcsolat feltárása HCC-ben azonban további vizsgálatokat tesz szükségessé. Egy 2015-ös tanulmány, mely tizenkilenc, szintén HCC-ből vett citológiai minta globális miRNS elemzését végezte, megváltozott miR-224 szintet talált a vizsgált tumorok egy részében, azonban nem találtak összefüggést a sorafenibbel kezelt betegek túlélésével. Ez a különбözőség adódhatott az eltérő vizsgálati módszerekből, továbbá abból, hogy vizsgálateinkben a betegek harmada nem csupán sorafenib kezelést kapott, illetve a beteganyaguk csak negyede rendelkezett virális etiológiával [163].

Kutatásunk tehát megerősíti a miRNS-ek azon felhasználási lehetőségét, miszerint képesek bizonyos terápiákra adott klinikai válaszkészséget predikciós biomarkerként megjósolni. Mivel jelen vizsgálatunk a szigorú szelekciós kritériumok miatt viszonylag kis esetszámú csoporton történt, a későbbiekben nagyobb esetszámú, prospektív vizsgálatok szükségesek jelen megállapításaink validálására.

A miRNS-ek és a már kialakult HCC terápiás válaszkészségének vizsgálata mellett kutatásaink másik iránya a claudin fehérjék változásainak feltérképezése volt a HCC patogenezise során. A claudinok a sejtek közötti szoros kapcsolatok (tight junction, TJ) kialakításában játszanak központi szerepet, nevükhöz híven („claudere” (latin) = zárni) többnyire a kapcsolatok zárva tartásában, a sejtek összefűzésében, a sejt polaritás

fenntartásában fontosak. A sejtek közötti kapcsolatok megváltozása, valamint a sejtpolaritás elvesztése mind kulcsfontosságú jellemzői a daganatos átalakulás folyamatának, így nem meglepő, hogy a claudinok expressziójának megváltozását számos malignus daganatban leírták. Érdekes módon ez nem csak a claudin kifejeződés csökkenést jelenti, hiszen sok esetben fokozott claudin expressziót figyeltek meg daganatokban. Habár ez első olvasásra nem tűnik logikusnak, fontos megjegyezni, hogy a claudinok expressziójának fokozódása nem szükségszerűen jelent szorosabb kapcsolatokat, „erősebb” TJ-öket. Mivel a TJ-ök multi-protein komplexként dinamikusan változó struktúrák, funkcióikat, áteresztőképességüket elsősorban inkább alkotóelemeik aránya, ill. fizikai szerkezetük határozza meg. A claudinok felszaporodása továbbá a TJ-reguláción kívül más faktorok, jelátviteli útvonalak szabályozása alatt is állhat, illetve a claudinok a TJ-ben betöltött szerepük mellett más fontos funkciókkal is bírhatnak. Ezt támasztja alá például egyes TJ fehérjék esetenkénti magi lokalizációja [179], illetve ismert, hogy a claudin-3 és -4 a *Clostridium perfringens* enterotoxinjának receptoraként is funkcionálnak [180]. A claudinok továbbá szerv- és szövetspecifikus kifejeződést mutatnak, és szerepük van a sejtproliferáció és sejt differenciáció szabályozásában is [181].

Mivel a krónikus hepatitisz alapvető szerepet játszik a máj göbös átalakulásában és a cirrózisban megváltozott jelátvitel és proliferáció végül malignus átalakuláshoz vezet, nem meglepő, hogy a fejlett világban a HCV infekció a leggyakoribb tényező, mely HCC kialakulásához vezet [3, 5]. Csak részben ismert azonban, hogy a cirrózis kialakulása miként vezet malignus transzformációhoz. A fentebb ismertettek alapján felmerül, hogy a cirrózisban megváltozott májszerkezet, valamint a sejtek közötti kommunikáció átalakulása a TJ-ök, ezen belül is a claudinok megváltozott expressziójához vezet. Habár a claudinok pontos szerepe a hepatokarcinogenezisben nem tisztázott, ismert, hogy májregeneráció során dinamikus változáson mennek keresztül [182], továbbá hepatotróp növekedési faktorok szabályozása alatt is állhatnak [183]. Ezen túlmenően a claudin-3-at és claudin-7-et a máj őssejtek lehetséges markereiként írták le, melyeknek fontos szerepe lehet mind májregenerációban, mind tumorok kialakulásában [184]. Mint ismert, a HCV májsejtekbe történő hatékony belépése egy többlépcsős folyamat, melyhez a májsejtek felszínén jelen lévő molekulakomplexet használ föl. Ezen komplex nemrég leírt tagja a claudin-1, mely szükséges feltétele az effektív HCV

fertőzésnek [185]. A HCV infekció krónikus volta továbbá feltételezi a vírus májsejtekbe történő folyamatos bejutását és a megújuló hepatocyták fertőződését. Jelen vizsgálatunkban emelkedett claudin-1 és claudin-7 expressziót találtunk cirrotikus tumor környéki májszövetben a nem cirrotikus környező májszövethez képest. Eredményeink összhangban vannak Reynolds és mtsai. vizsgálataival, akik szintén fokozott claudin-1 termelődést találtak cirrózisban [142]. Immunhisztokémiai vizsgálatunk alapján továbbá a claudin fehérjék nem kizárólag a sejtek apikális pólusára lokalizálódtak, hanem mind cirrotikus májsejtek, mind HCC daganatsejtek bazolaterális oldalán kimutathatóak voltak. Ennek ellentmondani látszanak Mensa és mtsai. eredményei, akik a claudin-1-et kizárólag a májsejtek apikális pólusán figyelték meg [186], azonban ezen megfigyelésüket azóta többen cáfolták, megerősítve saját vizsgálati eredményeinket [187, 188].

Érdekes módon továbbá Reynolds és mtsai. *in vitro* HCV-vel fertőzött májsejt vonalon, valamint Mensa és mtsai. *in vivo* donor májakon történt vizsgálatait felvetették, hogy a HCV direkt módon indukálni képes belépési kofaktorának, a claudin-1-nek termelődését [142, 186]. Ezzel kapcsolatban saját mintáinkban nem találtunk szignifikáns claudin-1 expressziós különbséget a HCV pozitív és HCV negatív csoportok között, sem cirrotikus, sem nem-cirrotikus májszövetben. Ugyanakkor morфомetriával látható volt a tendencia, miszerint a HCV fertőzött mintákban a claudin-1 termelődése fokozottabb volt. Vizsgálatunkban az irodalmi adatoktól való eltérés oka vagy legalábbis a szignifikancia hiánya a minták összetételéből, valamint az eltérő vizsgálati módszerekkel adódhat. Mensa és mtsai. ugyanis a májtranszplantációt követő graft reinfekciót tanulmányozták, ami egy sokkal gyorsabb és akutabb folyamat, mint az általunk vizsgált krónikus esetek [186], míg Reynolds és mtsai. megállapításai elsősorban *in vitro* eredményeken alapszanak [142]. Mindent összevetve azonban, ha a HCV infekció önmagában nem is elégséges a claudin-1 termelődés szignifikáns indukciójához, a cirrotikus átalakulás indirekt módon hozzájárulhat a HCV krónicitásának fenntartásához, a claudin-1-nek mint a HCV belépési kofaktorának cirrózisban észlelt szignifikáns emelkedésén keresztül.

Érdekes módon a claudin-7 a cirrózis nélküli tumor környéki májban szignifikánsan magasabb fehérje expressziót mutatott a HCV fertőzött esetekben. A claudin-7 és claudin-1 szoros rokonságot, szekvencia-homológiát mutat, azonban nem

ismert, hogy a claudin-7 a HCV fertőzésben szerepet játszana [189]. Az észlelt különbséget más faktorok jelenléte is magyarázhatja, hiszen míg a HCV negatív esetekben fibrózis sem volt jelen, addig a HCV pozitív nem cirrotikus esetekben enyhe fibrózis megfigyelhető volt. Érdekes továbbá, hogy a claudin-7 festődés cirrotikusan átalakult májban a sejtek teljes területén megfigyelhető volt. Ez felveti a claudin-7 szerepét a sejt – extracelluláris mátrix kapcsolatok kialakításában krónikus hepatitisz talaján kialakult cirrózisban. Érdekes módon egy kutatócsoport nem talált szignifikáns összefüggést a claudin-7 és a cirrózis jelenléte között, ám ez a csoport csupán mRNS szinten vizsgálta a claudin-7 expresszióját [190]. Az általunk cirrotikus májszövetben, fehérje szinten észlelt szignifikáns claudin-7 emelkedést azóta egy másik csoport megerősítette, akik a claudin-7 kifejeződés és fibrózis score közötti pozitív korrelációt, valamint szignifikáns claudin-7 emelkedést találtak cirrózisban [191].

A már kialakult HCC-ket vizsgálva szintén megfigyeltünk claudin expressziós változásokat. A cirrotikus alapon kialakult tumorok magasabb claudin-1 és claudin-7 kifejeződést mutattak nemcsak a normál májhoz, hanem a nem cirrózis talaján kifejlődött HCC-khez képest is. A HCC-k továbbá a környező májszövethez képest csökkent claudin-2 expresszióval rendelkeztek, a nem tumoros szövetek között azonban nem volt észlelhető különbség. Ezen megfigyelések arra utalnak, hogy egyes, a TJ összetételében látható változások már a tényleges malignus transzformációt megelőzően létrejöhetnek a májban (a cirrotikus HCC-kben is megmaradnak a cirrózisban látott magasabb claudin-1 és -7 szinteket), míg más változások a malignizálódás folyamányaként következhetnek be (lásd csökkent claudin-2 HCC-ben, mely csökkenés cirrózisban még nincs jelen).

Érdekes módon Higashi és mtsai. eredményei alapján a claudin-1 expresszió elvesztése a HCC-k rosszabb differenciáltságával, valamint érbetörésével állt összefüggésben, míg a fokozott claudin-1 kifejeződés a jól differenciált HCC-kre volt jellemző [192]. Ezzel szemben HCC sejtvonalakon a claudin-1 fokozott inváziós készségben betöltött direkt szerepét mutatták ki, tehát a fokozott claudin-1 expresszió járt malignusabb fenotípussal [193]. Hasonlóan ellentmondásos eredmények ismertek kolorektális karcinómában, ahol a claudin-1 szintén gyakori emelkedett expressziót mutat, és direkt szerepét mutatták ki az tumor invázió és áttétképzés folyamatában, továbbá pozitív korrelációt találtak a claudin-1 expresszió és a vastagbélrák progressziója, valamint metasztázisképzése között [194]. Más kutatócsoportok viszont a

kolorektális karcinóma rossz differenciációjával és rossz prognózisával az alacsonyabb claudin-1 szinteket találták összefüggésben [195]. Suh és mtsai. azonban megerősítették a claudin-1 direkt szerepét a HCC malignus transzformációban: *in vitro* vizsgálataikban mind normál, mind tumoros májsejt vonalakban a claudin-1 túltermeltetése képes volt epitheliális-mezenchimális átalakulást indukálni a c-Abl-ERK1/2 jelátviteli útvonalon keresztül [139]. Amennyiben ezt az eredményt összevetjük az általunk észlelt változásokkal, a cirrózisban látott claudin-1 expresszió fokozódás a cirrózis-indukálta malignizálódás egy új potenciális mechanizmusa lehet.

Az általunk HCC-ben észlelt claudin-2 expresszió csökkenés nem példa nélküli az irodalomban. Kimutatták, hogy a claudin-2 szint az emlőrák progressziója során lecsökken a primer daganatban [145], míg az emlőrák májmetasztázisaiban újra megjelenik [196]. Ezen túlmenően a claudin-2 expresszióját kimutatták vastagbélrákban és hasnyálmirigyrákban is. Érdekes módon májban a claudin-2 expressziójának egyik meghatározó pozitív szabályozója a hepatocita nukleáris faktor-1 α (HNF-1 α) [197]. A HNF-1 α csökkent kifejeződést mutat HCC-ben [198], mely jól egybevághat az általunk is észlelt csökkent claudin-2 expresszióval. A HNF-1 α szerepét továbbá kimutatták a májsejtek megfelelő polarizációjának kialakításában, mely gyakran elveszik tumorokban [199].

A claudin-3 és claudin-4 vizsgálata májsejteken nem mutatott szignifikáns különbséget az egyes csoportok között, az epeúti hámban viszont erős, apikális pozitivitást találtunk. Ezen fehérjék akkor kerültek az érdeklődés középpontjába, amikor kiderült, hogy a *C. perfringens* enterotoxinjának receptorai, és így target terápiák célpontjaiként segíthetnek a claudin-3, -4-et magasan expresszáló daganatok szelektív elpusztításában [146]. A claudin-4 expresszióját továbbá az adenokarcinómák jellegzetes tulajdonságaként írták le, így vastagbélrákban, petefészekrákban, prosztatákban kifejezett a jelenléte [134]. Munkacsoportunk korábban szintén számos daganat esetében leírta kifejeződését, például hasnyálmirigy és biliáris eredetű tumorokban, azonban Lódi és mtsai. normál májszövet és HCC esetében nem találtak claudin-4 pozitivitást [200]. Jelen vizsgálatunkban azonban, nagyobb esetszámú betegcsoportot elemezve, néhány esetben elszórtan észleltünk claudin-4 pozitivitást HCC-ben. Ez a pozitivitas azonban csak a tumorsejtek által formált, pszeudoglanduláris struktúrák apikális pólusára

korlátozódott, ami egybevághat a korábban ismertetett megfigyeléssel, miszerint a mirigyszerű struktúrákat képző daganatokra jellemző kifejeződése.

A claudin-7 szintén megváltozott expresszióját írták le számos hámeredetű daganatban. Emlőtumorokban, fej-nyaki tumorokban és méhnyakrákban csökkent expressziót mutat [150, 201], illetve nyelöcső laphámrákjában csökkenése az invázióval és metasztázisképzéssel korrelált [202]. Kolorektális sejtvonalakon azonban daganatkialakulást elősegítő hatása is ismert [149]. Kutatásainkban emelkedett claudin-7 kifejeződést észleltünk cirrózisban és cirrotikus talajon kialakult HCC-ben, míg nem cirrotikus HCC-ben a claudin-7 nem mutatott fokozott expressziót. Ez alátámaszthatja a HCC karcinogenezisének ismert különbözőségét attól függően, hogy a daganat cirrotikus vagy nem cirrotikus májban alakul ki, a különbségek pontos eredetének feltárásához azonban további vizsgálatokra van szükség. Eredményeinkkel összhangban más csoportok is emelkedett claudin-7 expressziót detektáltak HCC-ben, mind mRNS [190], mind fehérje szinten, továbbá a magasabb claudin-7 kifejeződés rosszabb prognózissal társult [203].

Érdekes módon jelen vizsgálatunkban nem találtunk szignifikáns összefüggést a HCC-k claudin expressziója, valamint a tumorok differenciáltsága és a betegek túlélése között, habár más tumorok esetében ismert, hogy a claudin kifejeződés prognosztikus potenciált hordoz. Emlőrák esetében például a claudin-3 és -4 magasabb kifejeződése az invázióval korrelált, míg a claudin-1 és -7 csökkent kifejeződést mutatott [204] és a claudin expresszió mint prognosztikus index is felmerült [205]. A claudin-4 expresszió csökkenése továbbá a hasnyálmirigyrák inváziójával és metasztázis-képzésével, valamint rosszabb túléléssel társult [148]. Biológiaiilag azonban nem megjósolható, hogy a claudinok milyen irányban változnak a tumorprogresszió során. Egy csoport például a claudin-1 kifejeződés elvesztését írta le dedifferenciált HCC-ben, mely rosszabb prognózissal járt [192], míg egy másik csoport a claudin-1-nek épp ellenkezőleg proinvazív, malignizáló tulajdonságát találta. Ez utóbbit támasztja alá inkább az általunk látott tendencia, miszerint a claudin-1 kifejezettebb expressziót mutatott rosszabbul differenciált HCC-kben. Ezzel egyetértésben a claudin-1 rosszabb differenciáltsági fokkal való összefüggését észlelték egy másik kutatásban is [139].

Habár a claudinok HCC-ben betöltött prognosztikai szerepének pontosabb feltérképezése még várat magára, a fentebb ismertetett claudin expressziós mintázatok a daganatok differenciál diagnosztikájában is szerepet játszhatnak. Munkacsoportunk egy másik vizsgálatban elvégezte a HCC, valamint a hasnyálmirigy- és vastagbélrák májmetasztázisainak claudin kifejeződési összehasonlítását [206]. Mind a kolorektális, mind a pankreász duktális karcinóma májáttétei szignifikánsan magasabb claudin-4 kifejeződést mutattak HCC-vel összehasonlítva, a kolorektális metasztázisok továbbá erősebb claudin-1, -3 és -7 festődéssel is rendelkeztek, míg a claudin-2 nem mutatott különbséget a vizsgált daganatok között. Az intrahepatikus kolangiokarcinóma pedig emelkedett claudin-4 és csökkent claudin-7 festődés alapján lehet elkülöníthető a HCC-től [200, 207]. Ezek alapján a claudinok megváltozott expressziója nem csak a HCC patomechanizmusának jobb megértésében, hanem a primér és metasztatikus májdaganatok elkülönítésében is segítséget nyújthat.

Vizsgálataink alátámasztják azt a feltételezést, miszerint a cirrotikus átalakulás, valamint a HCC kialakulása során a sejtkapcsoló-struktúrák átalakulása és alkotóelemeik megváltozása következik be. A claudin expresszió változásából arra következtetünk, hogy szerepük lehet a HCC karcinogenezisében. A claudin-1-gyel kapcsolatos megfigyeléseink továbbá még érdekesebbek lehetnek annak fényében, hogy claudin-1 ellenes antitestekkel megelőzhetőnek, sőt gyógyíthatónak bizonyult a HCV fertőzés egérkísérletekben, mindemellett az anti-claudin-1 terápia tumorelles hatását is észlelték egerek claudin-1-et expresszáló daganataiban [208]. Eredményeink alapján tehát a claudin-1 értékes, kettős támadáspontot jelenthetne krónikus hepatitisz C talaján kifejlődött HCC-s esetekben, mind az okot, mind a következményt kezelve.

7 - KÖVETKEZTETÉSEK

1. Elsőként igazoltuk hepatocelluláris karcinómából vett, sorafenib kezelés előtti, diagnosztikus vékonytű aspirációs minták alkalmazhatóságát mikro-RNS expresszió vizsgálatában.
2. A sorafenib kezelés előtti magas miR-214 expresszió kisebb tumormérettel, míg a kezelés előtti magas miR-17-5p expresszió jobb ECOG klinikai teljesítőképességi státusszal társult.
3. Elsőként azonosítottuk a miR-224-et mint lehetséges prediktív faktort az előrehaladott hepatocelluláris karcinómában szenvedő betegek sorafenibre adott terápiás válaszkészségében: a sorafenib kezelés előtti magas miR-224 szint hosszabb teljes és progressziómentes túléléssel társult.
4. Kimutattuk, hogy a máj cirrotikus átalakulása emelkedett claudin-1 és claudin-7 kifejeződéssel társul a nem cirrotikus májszövettel összehasonlítva, mely fokozott expresszió a cirrotikus talajon kifejlődött hepatocelluláris karcinómákban is megmarad.
5. Hepatocelluláris karcinómában csökkent claudin-2 kifejeződést észleltünk, míg a claudin-4 expresszió az epeúti hámsejtekre, valamint a hepatocelluláris karcinómák pszeudoglanduláris altípusára korlátozódik.
6. Nem találtunk szignifikáns összefüggést a hepatitisz C vírus (HCV) belépési kofaktora, a claudin-1 és a minták HCV fertőzöttségi státusza között, ugyanakkor a cirrózisban észlelt fokozott claudin-1 expresszió elősegítheti a vírus eredményesebb behatolását a májsejtekbe, fokozhatja a reinfekciót és egyben hozzájárulhat a malignus transzformációhoz.
7. Nem észleltünk szignifikáns összefüggést a HCC-k claudin expressziója és a tumor differenciáltsági fok, valamint a betegek túlélése között, azonban a claudin-1 kifejeződés emelkedő tendenciát mutatott rosszabbul differenciált HCC-kben.

8 - ÖSSZEFOGLALÁS

A hepatocelluláris karcinóma az egyik leggyakoribb primer malignus daganat, melynek incidenciája továbbra is növekvő tendenciát mutat a fejlett világban. A daganatok túlnyomó többsége cirrózis talaján fejlődik ki, a hepatokarcinogenezis pontos mechanizmusa azonban még nem teljesen tisztázott. Sajnálatos módon az esetek nagy többsége továbbra is csak előrehaladott stádiumban kerül diagnózisra, amikor a kuratív terápiát jelentő sebészi kezelés már nem elérhető. Ilyen esetekben az egyetlen validált, szignifikáns túlélési előnyt nyújtó, célzott terápiát a sorafenib jelenti. A tight junction-ök gerincét alkotó claudin fehérjék elengedhetetlen szerepet játszanak a normál szöveti struktúra és funkció fenntartásában, így nem meglepő, hogy termelődésük számos betegség patogenezisében megváltozik. A mikro-RNS-ek kis, nem kódoló, egyszálú RNS molekulák, melyek a génexpresszió poszttranszkripciós szintű szabályozóiként szintén gyakran mutatnak kóros kifejeződést, így felmerült biomarkerként történő alkalmazhatóságuk is. Kutatásaink során a claudinok kifejeződését vizsgáltuk a normál máj – cirrózis – HCC tengelyen a hepatitisz C vírus fertőzés függvényében, valamint a HCC-ben deregulált miRNS-ek között olyan prediktív markert kerestünk, mely előre tudná jelezni a betegek sorafenibre adott válaszkészségét. Elsőként írtuk le sorafenib kezelés előtti vékonytű aspirációs minták alkalmazhatóságát miRNS expressziós vizsgálatokra, melyek kapcsán a magas miR-214 szint és a kisebb tumorméret, valamint a magas miR-17-5p és a jobb klinikai teljesítőképességi státusz asszociációját találtuk. Ezen túlmenően a magas kezelés előtti miR-224 szint a sorafenibbel kezelt betegek szignifikánsan hosszabb teljes és progressziómentes túlélésével társult, ami felveti ezen miRNS predikciós markerként való alkalmazhatóságának lehetőségét. Kimutattuk, hogy a máj cirrotikus átalakulása emelkedett claudin-1 és claudin-7 kifejeződéssel társul, mely fokozott expresszió a cirrotikus talajon kifejlődött hepatocelluláris karcinómákban is megmarad, amelyek továbbá csökkent claudin-2 expressziót mutatnak. Nem találtunk viszont szignifikáns összefüggést a HCV fertőzöttségi státusz, a HCC differenciáltsági foka és a betegek túlélése, valamint a claudinok termelődése között. Összefoglalva elmondhatjuk, hogy a citológiai mintákban is jól vizsgálható miRNS expresszió a jövőben segítséget nyújthat a sorafenibre adott válaszkészség jobb megítéléséhez, míg az általunk leírt cirrózisban és HCC-ben megváltozott claudin expresszió hozzájárulhat a hepatokarcinogenezis jobb megértéséhez.

9 - SUMMARY

The incidence of hepatocellular carcinoma (HCC) – one of the most common primary malignancies worldwide – is increasing in the developed world. Most HCC cases develop on a cirrhotic background, but the exact molecular mechanisms of hepatocarcinogenesis are still not fully characterized. Unfortunately, patients with HCC predominantly present at an advanced stage, when potentially curative surgical treatments are not an option anymore. In advanced disease stage, sorafenib, a newly discovered multi-kinase inhibitor represents the only targeted therapy that bears a significant survival advantage. Claudin proteins constitute the backbone of tight junctions, that play essential role in maintaining proper tissue architecture and function – their aberrant expressions have been described in several disease states, including cancers. MicroRNAs are small, noncoding, posttranscriptional regulators of gene expression, commonly dysregulated in tumors, hence their potential use as biomarkers is under intense investigation. In the present study we studied the altered claudin expression of the normal – cirrhotic liver – HCC axis with regard to hepatitis C virus (HCV) infection. Further, we investigated the pretreatment miRNA expression of sorafenib-treated, advanced stage HCC to identify a possible biomarker that could predict patient sensitivity to sorafenib. To the best of our knowledge, we are the first to study miRNA expression from fine needle aspiration samples of HCC, which showed that high miR-214 levels associated with smaller tumor size, while high miR-17-5p levels correlated with better clinical performance. Further, survival analysis revealed that high miR-224 expression was associated with increased survival rates. On examination of claudin expressions in the course of HCC development, increased claudin-1 and -7 protein expressions were found in cirrhosis when compared with non-cirrhotic liver. HCCs developed in cirrhotic livers showed even higher expression of claudin-1 contrary to decreased claudin-7 expression when compared with cirrhosis, further, claudin-2 showed downregulation in HCC. With respect to HCV status, no significant difference was found in the HCV entry cofactor, claudin-1 expression levels between HCV-infected and HCV-negative cases, and there was no correlation between claudin expression and HCC grade or survival. In summary, pretreatment microRNA profiling might serve as an ancillary tool for the better survival assessment and stratification of sorafenib-treated patients, while changes in claudin expression might advance the better understanding of the course of hepatocarcinogenesis.

10 - IRODALOMJEGYZÉK

1. Lafaro KJ, Demirjian AN, Pawlik TM. (2015) Epidemiology of hepatocellular carcinoma. *Surg Oncol Clin N Am*, 24(1): 1-17.
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(5): E359-386.
3. Bruix J, Reig M, Sherman M. (2016) Evidence-Based Diagnosis, Staging, and Treatment of Patients With Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*, 150(4): 835-853.
4. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. (2011) Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 61(2): 69-90.
5. Grandhi MS, Kim AK, Ronnekleiv-Kelly SM, Kamel IR, Ghasebeh MA, Pawlik TM. (2016) Hepatocellular carcinoma: From diagnosis to treatment. *Surg Oncol*, 25(2): 74-85.
6. El-Serag HB. (2011) Hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med*, 365(12): 1118-1127.
7. El-Serag HB, Rudolph KL. (2007) Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology*, 132(7): 2557-2576.
8. Choo SP, Tan WL, Goh BK, Tai WM, Zhu AX. (2016) Comparison of hepatocellular carcinoma in Eastern versus Western populations. *Cancer*. [Epub]
9. Schaff Z, Kovalszky I, Lotz G, Kiss A. (2010) [Hepatocellular carcinoma--from macroscopy to molecular pathology]. *Orv Hetil*, 151(24): 982-989.
10. Mazzanti R, Arena U, Tassi R. (2016) Hepatocellular carcinoma: Where are we? *World J Exp Med*, 6(1): 21-36.

11. Schulze K, Imbeaud S, Letouze E, Alexandrov LB, Calderaro J, Rebouissou S, Couchy G, Meiller C, Shinde J, Soysouvanh F, Calatayud AL, Pinyol R, Pelletier L, Balabaud C, Laurent A, Blanc JF, Mazzaferro V, Calvo F, Villanueva A, Nault JC, Bioulac-Sage P, Stratton MR, Llovet JM, Zucman-Rossi J. (2015) Exome sequencing of hepatocellular carcinomas identifies new mutational signatures and potential therapeutic targets. *Nat Genet*, 47(5): 505-511.
12. Levrero M, Zucman-Rossi J. (2016) Mechanisms of HBV-induced hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*, 64(1 Suppl): S84-101.
13. Barba G, Harper F, Harada T, Kohara M, Goulinet S, Matsuura Y, Eder G, Schaff Z, Chapman MJ, Miyamura T, Brechot C. (1997) Hepatitis C virus core protein shows a cytoplasmic localization and associates to cellular lipid storage droplets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(4): 1200-1205.
14. Anfusio B, El-Khobar KE, Sukowati CH, Tiribelli C. (2015) The multiple origin of cancer stem cells in hepatocellular carcinoma. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 39 Suppl 1: S92-97.
15. Satyanarayana A, Manns MP, Rudolph KL. (2004) Telomeres and telomerase: a dual role in hepatocarcinogenesis. *Hepatology*, 40(2): 276-283.
16. Schulze K, Nault JC, Villanueva A. (2016) Genetic profiling of hepatocellular carcinoma using next-generation sequencing. *J Hepatol*, 65(5): 1031-1042.
17. Whittaker S, Marais R, Zhu AX. (2010) The role of signaling pathways in the development and treatment of hepatocellular carcinoma. *Oncogene*, 29(36): 4989-5005.
18. Santoro A, Rimassa L, Borbath I, Daniele B, Salvagni S, Van Laethem JL, Van Vlierberghe H, Trojan J, Kolligs FT, Weiss A, Miles S, Gasbarrini A, Lencioni M, Cicalese L, Sherman M, Gridelli C, Buggisch P, Gerken G, Schmid RM, Boni C, Personeni N, Hassoun Z, Abbadessa G, Schwartz B, Von Roemeling R, Lamar ME,

- Chen Y, Porta C. (2013) Tivantinib for second-line treatment of advanced hepatocellular carcinoma: a randomised, placebo-controlled phase 2 study. *Lancet Oncol*, 14(1): 55-63.
19. Mittal S, Kanwal F, Ying J, Chung R, Sada YH, Temple S, Davila JA, El-Serag HB. (2016) Effectiveness of surveillance for hepatocellular carcinoma in clinical practice: A United States cohort. *J Hepatol*, 65(6): 1148-1154.
 20. Bruix J, Sherman M, American Association for the Study of Liver D. (2011) Management of hepatocellular carcinoma: an update. *Hepatology*, 53(3): 1020-1022.
 21. Dank M. (2010) [Treatment of primary hepatocellular carcinoma]. *Orv Hetil*, 151(36): 1445-1449.
 22. Stefaniuk P, Cianciara J, Wiercinska-Drapalo A. (2010) Present and future possibilities for early diagnosis of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*, 16(4): 418-424.
 23. International Working P. (1995) Terminology of nodular hepatocellular lesions. *Hepatology*, 22(3): 983-993.
 24. Wee A. (2005) Fine needle aspiration biopsy of the liver: Algorithmic approach and current issues in the diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Cytojournal*, 2: 7.
 25. Di Tommaso L, Franchi G, Park YN, Fiamengo B, Destro A, Morengi E, Montorsi M, Torzilli G, Tommasini M, Terracciano L, Tornillo L, Vecchione R, Roncalli M. (2007) Diagnostic value of HSP70, glypican 3, and glutamine synthetase in hepatocellular nodules in cirrhosis. *Hepatology*, 45(3): 725-734.
 26. Nowak AK, Chow PK, Findlay M. (2004) Systemic therapy for advanced hepatocellular carcinoma: a review. *Eur J Cancer*, 40(10): 1474-1484.

27. Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF, de Oliveira AC, Santoro A, Raoul JL, Forner A, Schwartz M, Porta C, Zeuzem S, Bolondi L, Greten TF, Galle PR, Seitz JF, Borbath I, Haussinger D, Giannaris T, Shan M, Moscovici M, Voliotis D, Bruix J. (2008) Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med*, 359(4): 378-390.
28. Cheng AL, Kang YK, Chen Z, Tsao CJ, Qin S, Kim JS, Luo R, Feng J, Ye S, Yang TS, Xu J, Sun Y, Liang H, Liu J, Wang J, Tak WY, Pan H, Burock K, Zou J, Voliotis D, Guan Z. (2009) Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: a phase III randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Oncol*, 10(1): 25-34.
29. Wilhelm SM, Carter C, Tang L, Wilkie D, McNabola A, Rong H, Chen C, Zhang X, Vincent P, McHugh M, Cao Y, Shujath J, Gawlak S, Eveleigh D, Rowley B, Liu L, Adnane L, Lynch M, Auclair D, Taylor I, Gedrich R, Voznesensky A, Riedl B, Post LE, Bollag G, Trail PA. (2004) BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Res*, 64(19): 7099-7109.
30. Wilhelm S, Carter C, Lynch M, Lowinger T, Dumas J, Smith RA, Schwartz B, Simantov R, Kelley S. (2006) Discovery and development of sorafenib: a multikinase inhibitor for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov*, 5(10): 835-844.
31. Chiou JF, Tai CJ, Wang YH, Liu TZ, Jen YM, Shiau CY. (2009) Sorafenib induces preferential apoptotic killing of a drug- and radio-resistant Hep G2 cells through a mitochondria-dependent oxidative stress mechanism. *Cancer Biol Ther*, 8(20): 1904-1913.
32. Colagrande S, Inghilesi AL, Aburas S, Taliani GG, Nardi C, Marra F. (2016) Challenges of advanced hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*, 22(34): 7645-7659.

33. Chu JS, Ge FJ, Zhang B, Wang Y, Silvestris N, Liu LJ, Zhao CH, Lin L, Brunetti AE, Fu YL, Wang J, Paradiso A, Xu JM. (2013) Expression and prognostic value of VEGFR-2, PDGFR-beta, and c-Met in advanced hepatocellular carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res*, 32: 16.
34. Personeni N, Rimassa L, Pressiani T, Destro A, Ligorio C, Tronconi MC, Bozzarelli S, Carnaghi C, Di Tommaso L, Giordano L, Roncalli M, Santoro A. (2013) Molecular determinants of outcome in sorafenib-treated patients with hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*, 139(7): 1179-1187.
35. Hagiwara S, Kudo M, Nagai T, Inoue T, Ueshima K, Nishida N, Watanabe T, Sakurai T. (2012) Activation of JNK and high expression level of CD133 predict a poor response to sorafenib in hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer*, 106(12): 1997-2003.
36. Takeda H, Nishikawa H, Iguchi E, Ohara Y, Sakamoto A, Hatamaru K, Henmi S, Saito S, Nasu A, Komekado H, Kita R, Kimura T, Osaki Y. (2013) Impact of pretreatment serum cholinesterase level in unresectable advanced hepatocellular carcinoma patients treated with sorafenib. *Mol Clin Oncol*, 1(2): 241-248.
37. Scartozzi M, Faloppi L, Svegliati Baroni G, Loretelli C, Piscaglia F, Iavarone M, Toniutto P, Fava G, De Minicis S, Mandolesi A, Bianconi M, Giampieri R, Granito A, Facchetti F, Bitetto D, Marinelli S, Venerandi L, Vavassori S, Gemini S, D'Errico A, Colombo M, Bolondi L, Bearzi I, Benedetti A, Cascinu S. (2014) VEGF and VEGFR genotyping in the prediction of clinical outcome for HCC patients receiving sorafenib: The ALICE-1 study. *Int J Cancer*, 135(5): 1247-1256.
38. Koeberle D, Dufour JF, Demeter G, Li Q, Ribi K, Samaras P, Saletti P, Roth AD, Horber D, Buehlmann M, Wagner AD, Montemurro M, Lakatos G, Feilchenfeldt J, Peck-Radosavljevic M, Rauch D, Tschanz B, Bodoky G, Swiss Group for Clinical Cancer R. (2016) Sorafenib with or without everolimus in patients with advanced hepatocellular carcinoma (HCC): a randomized multicenter, multinational phase II trial (SAKK 77/08 and SASL 29). *Ann Oncol*, 27(5): 856-861.

39. Bruix J, Han KH, Gores G, Llovet JM, Mazzaferro V. (2015) Liver cancer: Approaching a personalized care. *J Hepatol*, 62(1 Suppl): S144-156.
40. Bartel DP. (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116(2): 281-297.
41. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. (2005) Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, 120(1): 15-20.
42. Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. (2009) Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res*, 19(1): 92-105.
43. Chaudhuri K, Chatterjee R. (2007) MicroRNA detection and target prediction: integration of computational and experimental approaches. *DNA Cell Biol*, 26(5): 321-337.
44. Kim VN, Han J, Siomi MC. (2009) Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10(2): 126-139.
45. Kim YK, Kim VN. (2007) Processing of intronic microRNAs. *EMBO J*, 26(3): 775-783.
46. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. (2001) Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*, 294(5543): 853-858.
47. Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR. (2004) Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA*, 10(12): 1957-1966.
48. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN. (2004) MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J*, 23(20): 4051-4060.

49. Borchert GM, Lanier W, Davidson BL. (2006) RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol*, 13(12): 1097-1101.
50. Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S, Kim VN. (2002) MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J*, 21(17): 4663-4670.
51. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Radmark O, Kim S, Kim VN. (2003) The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, 425(6956): 415-419.
52. Morlando M, Ballarino M, Gromak N, Pagano F, Bozzoni I, Proudfoot NJ. (2008) Primary microRNA transcripts are processed co-transcriptionally. *Nat Struct Mol Biol*, 15(9): 902-909.
53. Landthaler M, Yalcin A, Tuschl T. (2004) The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and Its D. melanogaster homolog are required for miRNA biogenesis. *Curr Biol*, 14(23): 2162-2167.
54. Gregory RI, Yan KP, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, Cooch N, Shiekhattar R. (2004) The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature*, 432(7014): 235-240.
55. Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. (2003) Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev*, 17(24): 3011-3016.
56. Bohnsack MT, Czaplinski K, Gorlich D. (2004) Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA*, 10(2): 185-191.
57. Lund E, Guttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. (2004) Nuclear export of microRNA precursors. *Science*, 303(5654): 95-98.

58. Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Balint E, Tuschl T, Zamore PD. (2001) A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science*, 293(5531): 834-838.
59. Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 409(6818): 363-366.
60. Wahid F, Shehzad A, Khan T, Kim YY. (2010) MicroRNAs: synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. *Biochim Biophys Acta*, 1803(11): 1231-1243.
61. Yan KS, Yan S, Farooq A, Han A, Zeng L, Zhou MM. (2003) Structure and conserved RNA binding of the PAZ domain. *Nature*, 426(6965): 468-474.
62. Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD. (2003) Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*, 115(2): 209-216.
63. Ghildiyal M, Xu J, Seitz H, Weng Z, Zamore PD. (2010) Sorting of *Drosophila* small silencing RNAs partitions microRNA* strands into the RNA interference pathway. *RNA*, 16(1): 43-56.
64. Carmell MA, Xuan Z, Zhang MQ, Hannon GJ. (2002) The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. *Genes Dev*, 16(21): 2733-2742.
65. Meister G, Landthaler M, Patkaniowska A, Dorsett Y, Teng G, Tuschl T. (2004) Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell*, 15(2): 185-197.
66. Liu J, Carmell MA, Rivas FV, Marsden CG, Thomson JM, Song JJ, Hammond SM, Joshua-Tor L, Hannon GJ. (2004) Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science*, 305(5689): 1437-1441.

67. Diederichs S, Haber DA. (2007) Dual role for argonautes in microRNA processing and posttranscriptional regulation of microRNA expression. *Cell*, 131(6): 1097-1108.
68. Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM. (2005) Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol*, 3(3): e85.
69. Okamura K, Hagen JW, Duan H, Tyler DM, Lai EC. (2007) The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila*. *Cell*, 130(1): 89-100.
70. Ruby JG, Jan CH, Bartel DP. (2007) Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature*, 448(7149): 83-86.
71. Kramer A. (1996) The structure and function of proteins involved in mammalian pre-mRNA splicing. *Annu Rev Biochem*, 65: 367-409.
72. Gesteland RF, Cech T, Atkins JF. *The RNA world : the nature of modern RNA suggests a prebiotic RNA world*. 1999, Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
73. Ooi SL, Samarsky DA, Fournier MJ, Boeke JD. (1998) Intronic snoRNA biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* depends on the lariat-debranching enzyme: intron length effects and activity of a precursor snoRNA. *RNA*, 4(9): 1096-1110.
74. Naqvi AR, Islam MN, Choudhury NR, Haq QM. (2009) The fascinating world of RNA interference. *Int J Biol Sci*, 5(2): 97-117.
75. van Rooij E, Sutherland LB, Qi X, Richardson JA, Hill J, Olson EN. (2007) Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. *Science*, 316(5824): 575-579.

76. Gatfield D, Le Martelot G, Vejnar CE, Gerlach D, Schaad O, Fleury-Olela F, Ruskeepaa AL, Oresic M, Esau CC, Zdobnov EM, Schibler U. (2009) Integration of microRNA miR-122 in hepatic circadian gene expression. *Genes Dev*, 23(11): 1313-1326.
77. Krol J, Busskamp V, Markiewicz I, Stadler MB, Ribi S, Richter J, Duebel J, Bicker S, Fehling HJ, Schubeler D, Oertner TG, Schratt G, Bibel M, Roska B, Filipowicz W. (2010) Characterizing light-regulated retinal microRNAs reveals rapid turnover as a common property of neuronal microRNAs. *Cell*, 141(4): 618-631.
78. Krol J, Loedige I, Filipowicz W. (2010) The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet*, 11(9): 597-610.
79. Chatterjee S, Grosshans H. (2009) Active turnover modulates mature microRNA activity in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 461(7263): 546-549.
80. Pillai RS, Artus CG, Filipowicz W. (2004) Tethering of human Ago proteins to mRNA mimics the miRNA-mediated repression of protein synthesis. *RNA*, 10(10): 1518-1525.
81. Grimson A, Farh KK, Johnston WK, Garrett-Engele P, Lim LP, Bartel DP. (2007) MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol Cell*, 27(1): 91-105.
82. Filipowicz W, Jaskiewicz L, Kolb FA, Pillai RS. (2005) Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs. *Curr Opin Struct Biol*, 15(3): 331-341.
83. Saetrom P, Heale BS, Snove O, Jr., Aagaard L, Alluin J, Rossi JJ. (2007) Distance constraints between microRNA target sites dictate efficacy and cooperativity. *Nucleic Acids Res*, 35(7): 2333-2342.

84. Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. (2008) Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet*, 9(2): 102-114.
85. Tang G, Tang X, Mendu V, Jia X, Chen QJ, He L. (2008) The art of microRNA: various strategies leading to gene silencing via an ancient pathway. *Biochim Biophys Acta*, 1779(11): 655-662.
86. Carthew RW, Sontheimer EJ. (2009) Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, 136(4): 642-655.
87. Mathonnet G, Fabian MR, Svitkin YV, Parsyan A, Huck L, Murata T, Biffo S, Merrick WC, Darzynkiewicz E, Pillai RS, Filipowicz W, Duchaine TF, Sonenberg N. (2007) MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F. *Science*, 317(5845): 1764-1767.
88. Thermann R, Hentze MW. (2007) Drosophila miR2 induces pseudo-polysomes and inhibits translation initiation. *Nature*, 447(7146): 875-878.
89. Kiriakidou M, Tan GS, Lamprinakı S, De Planell-Saguer M, Nelson PT, Mourelatos Z. (2007) An mRNA m7G cap binding-like motif within human Ago2 represses translation. *Cell*, 129(6): 1141-1151.
90. Wakiyama M, Takimoto K, Ohara O, Yokoyama S. (2007) Let-7 microRNA-mediated mRNA deadenylation and translational repression in a mammalian cell-free system. *Genes Dev*, 21(15): 1857-1862.
91. Chendrimada TP, Finn KJ, Ji X, Baillat D, Gregory RI, Liebhaber SA, Pasquinelli AE, Shiekhattar R. (2007) MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6. *Nature*, 447(7146): 823-828.

92. Maroney PA, Yu Y, Fisher J, Nilsen TW. (2006) Evidence that microRNAs are associated with translating messenger RNAs in human cells. *Nat Struct Mol Biol*, 13(12): 1102-1107.
93. Nottrott S, Simard MJ, Richter JD. (2006) Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes. *Nat Struct Mol Biol*, 13(12): 1108-1114.
94. Petersen CP, Bordeleau ME, Pelletier J, Sharp PA. (2006) Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Mol Cell*, 21(4): 533-542.
95. Behm-Ansmant I, Rehwinkel J, Doerks T, Stark A, Bork P, Izaurralde E. (2006) mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes Dev*, 20(14): 1885-1898.
96. Wu L, Fan J, Belasco JG. (2006) MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(11): 4034-4039.
97. Giraldez AJ, Mishima Y, Rihel J, Grocock RJ, Van Dongen S, Inoue K, Enright AJ, Schier AF. (2006) Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs. *Science*, 312(5770): 75-79.
98. Eulalio A, Behm-Ansmant I, Izaurralde E. (2007) P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(1): 9-22.
99. Parker R, Sheth U. (2007) P bodies and the control of mRNA translation and degradation. *Mol Cell*, 25(5): 635-646.
100. Liu J, Valencia-Sanchez MA, Hannon GJ, Parker R. (2005) MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat Cell Biol*, 7(7): 719-723.

101. Eulalio A, Behm-Ansmant I, Schweizer D, Izaurralde E. (2007) P-body formation is a consequence, not the cause, of RNA-mediated gene silencing. *Mol Cell Biol*, 27(11): 3970-3981.
102. Place RF, Li LC, Pookot D, Noonan EJ, Dahiya R. (2008) MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(5): 1608-1613.
103. Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA. (2007) Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science*, 318(5858): 1931-1934.
104. Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA. (2008) Cell-cycle control of microRNA-mediated translation regulation. *Cell Cycle*, 7(11): 1545-1549.
105. Orom UA, Nielsen FC, Lund AH. (2008) MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. *Mol Cell*, 30(4): 460-471.
106. Hwang HW, Wentzel EA, Mendell JT. (2007) A hexanucleotide element directs microRNA nuclear import. *Science*, 315(5808): 97-100.
107. Sinkkonen L, Hugenschmidt T, Berninger P, Gaidatzis D, Mohn F, Artus-Revel CG, Zavolan M, Svoboda P, Filipowicz W. (2008) MicroRNAs control de novo DNA methylation through regulation of transcriptional repressors in mouse embryonic stem cells. *Nat Struct Mol Biol*, 15(3): 259-267.
108. Eulalio A, Huntzinger E, Izaurralde E. (2008) Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing. *Cell*, 132(1): 9-14.
109. Srinivasan M, Sedmak D, Jewell S. (2002) Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. *Am J Pathol*, 161(6): 1961-1971.
110. Cronin M, Pho M, Dutta D, Stephans JC, Shak S, Kiefer MC, Esteban JM, Baker JB. (2004) Measurement of gene expression in archival paraffin-embedded tissues:

development and performance of a 92-gene reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay. *Am J Pathol*, 164(1): 35-42.

111. Masuda N, Ohnishi T, Kawamoto S, Monden M, Okubo K. (1999) Analysis of chemical modification of RNA from formalin-fixed samples and optimization of molecular biology applications for such samples. *Nucleic Acids Res*, 27(22): 4436-4443.
112. Li J, Smyth P, Flavin R, Cahill S, Denning K, Aherne S, Guenther SM, O'Leary JJ, Sheils O. (2007) Comparison of miRNA expression patterns using total RNA extracted from matched samples of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) cells and snap frozen cells. *BMC Biotechnol*, 7: 36.
113. Xi Y, Nakajima G, Gavin E, Morris CG, Kudo K, Hayashi K, Ju J. (2007) Systematic analysis of microRNA expression of RNA extracted from fresh frozen and formalin-fixed paraffin-embedded samples. *RNA*, 13(10): 1668-1674.
114. Siebolts U, Varnholt H, Drebber U, Dienes HP, Wickenhauser C, Odenthal M. (2009) Tissues from routine pathology archives are suitable for microRNA analyses by quantitative PCR. *J Clin Pathol*, 62(1): 84-88.
115. Gramantieri L, Ferracin M, Fornari F, Veronese A, Sabbioni S, Liu CG, Calin GA, Giovannini C, Ferrazzi E, Grazi GL, Croce CM, Bolondi L, Negrini M. (2007) Cyclin G1 is a target of miR-122a, a microRNA frequently down-regulated in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*, 67(13): 6092-6099.
116. Bai S, Nasser MW, Wang B, Hsu SH, Datta J, Kutay H, Yadav A, Nuovo G, Kumar P, Ghoshal K. (2009) MicroRNA-122 inhibits tumorigenic properties of hepatocellular carcinoma cells and sensitizes these cells to sorafenib. *J Biol Chem*, 284(46): 32015-32027.
117. Wang R, Zhao N, Li S, Fang JH, Chen MX, Yang J, Jia WH, Yuan Y, Zhuang SM. (2013) MicroRNA-195 suppresses angiogenesis and metastasis of hepatocellular

carcinoma by inhibiting the expression of VEGF, VAV2, and CDC42. *Hepatology*, 58(2): 642-653.

118. Fornari F, Gramantieri L, Ferracin M, Veronese A, Sabbioni S, Calin GA, Grazi GL, Giovannini C, Croce CM, Bolondi L, Negrini M. (2008) MiR-221 controls CDKN1C/p57 and CDKN1B/p27 expression in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene*, 27(43): 5651-5661.
119. Gramantieri L, Fornari F, Ferracin M, Veronese A, Sabbioni S, Calin GA, Grazi GL, Croce CM, Bolondi L, Negrini M. (2009) MicroRNA-221 targets Bmf in hepatocellular carcinoma and correlates with tumor multifocality. *Clin Cancer Res*, 15(16): 5073-5081.
120. Garofalo M, Di Leva G, Romano G, Nuovo G, Suh SS, Ngankea A, Taccioli C, Pichiorri F, Alder H, Secchiero P, Gasparini P, Gonelli A, Costinean S, Acunzo M, Condorelli G, Croce CM. (2009) miR-221&222 regulate TRAIL resistance and enhance tumorigenicity through PTEN and TIMP3 downregulation. *Cancer Cell*, 16(6): 498-509.
121. Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, Ghoshal K, Jacob ST, Patel T. (2007) MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology*, 133(2): 647-658.
122. Wong QW, Lung RW, Law PT, Lai PB, Chan KY, To KF, Wong N. (2008) MicroRNA-223 is commonly repressed in hepatocellular carcinoma and potentiates expression of Stathmin1. *Gastroenterology*, 135(1): 257-269.
123. Connolly E, Melegari M, Landgraf P, Tchaikovskaya T, Tennant BC, Slagle BL, Rogler LE, Zavolan M, Tuschl T, Rogler CE. (2008) Elevated expression of the miR-17-92 polycistron and miR-21 in hepadnavirus-associated hepatocellular carcinoma contributes to the malignant phenotype. *Am J Pathol*, 173(3): 856-864.

124. Li N, Fu H, Tie Y, Hu Z, Kong W, Wu Y, Zheng X. (2009) miR-34a inhibits migration and invasion by down-regulation of c-Met expression in human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Lett*, 275(1): 44-53.
125. Yang F, Li QJ, Gong ZB, Zhou L, You N, Wang S, Li XL, Li JJ, An JZ, Wang DS, He Y, Dou KF. (2013) MicroRNA-34a Targets Bcl-2 and Sensitizes Human Hepatocellular Carcinoma Cells to Sorafenib Treatment. *Technol Cancer Res Treat*.
126. Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, Tsukita S. (1993) Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol*, 123(6 Pt 2): 1777-1788.
127. Furuse M, Sasaki H, Fujimoto K, Tsukita S. (1998) A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts. *J Cell Biol*, 143(2): 391-401.
128. Kojima T, Murata M, Yamamoto T, Lan M, Imamura M, Son S, Takano K, Yamaguchi H, Ito T, Tanaka S, Chiba H, Hirata K, Sawada N. (2009) Tight junction proteins and signal transduction pathways in hepatocytes. *Histol Histopathol*, 24(11): 1463-1472.
129. Osanai M, Takasawa A, Murata M, Sawada N. (2016) Claudins in cancer: bench to bedside. *Pflugers Arch*.
130. Lal-Nag M, Morin PJ. (2009) The claudins. *Genome Biol*, 10(8): 235.
131. 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(15): 2979-2991.
132. Kawai Y, Hamazaki Y, Fujita H, Fujita A, Sato T, Furuse M, Fujimoto T, Jetten AM, Agata Y, Minato N. (2011) Claudin-4 induction by E-protein activity in later

stages of CD4/8 double-positive thymocytes to increase positive selection efficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(10): 4075-4080.

133. Linares GR, Brommage R, Powell DR, Xing W, Chen ST, Alshbool FZ, Lau KH, Wergedal JE, Mohan S. (2012) Claudin 18 is a novel negative regulator of bone resorption and osteoclast differentiation. *J Bone Miner Res*, 27(7): 1553-1565.
134. Hewitt KJ, Agarwal R, Morin PJ. (2006) The claudin gene family: expression in normal and neoplastic tissues. *BMC Cancer*, 6: 186.
135. Nemeth J, Nemeth Z, Tatrai P, Peter I, Somoracz A, Szasz AM, Kiss A, Schaff Z. (2010) High expression of claudin-1 protein in papillary thyroid tumor and its regional lymph node metastasis. *Pathol Oncol Res*, 16(1): 19-27.
136. 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(6): 961-968.
137. Zinner B, Gyongyosi B, Babarczy E, Kiss A, Sobel G. (2013) Claudin 1 expression characterizes human uterine cervical reserve cells. *J Histochem Cytochem*, 61(12): 880-888.
138. Chao YC, Pan SH, Yang SC, Yu SL, Che TF, Lin CW, Tsai MS, Chang GC, Wu CH, Wu YY, Lee YC, Hong TM, Yang PC. (2009) Claudin-1 is a metastasis suppressor and correlates with clinical outcome in lung adenocarcinoma. *Am J Respir Crit Care Med*, 179(2): 123-133.
139. Suh Y, Yoon CH, Kim RK, Lim EJ, Oh YS, Hwang SG, An S, Yoon G, Gye MC, Yi JM, Kim MJ, Lee SJ. (2012) Claudin-1 induces epithelial-mesenchymal transition through activation of the c-Abl-ERK signaling pathway in human liver cells. *Oncogene*. [Epub]

140. Evans MJ, von Hahn T, Tscherne DM, Syder AJ, Panis M, Wolk B, Hatzioannou T, McKeating JA, Bieniasz PD, Rice CM. (2007) Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature*, 446(7137): 801-805.
141. 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(7): 3555-3560.
142. Reynolds GM, Harris HJ, Jennings A, Hu K, Grove J, Lalor PF, Adams DH, Balfe P, Hubscher SG, McKeating JA. (2008) Hepatitis C virus receptor expression in normal and diseased liver tissue. *Hepatology*, 47(2): 418-427.
143. Mailly L, Xiao F, Lupberger J, Wilson GK, Aubert P, Duong FH, Calabrese D, Leboeuf C, Fofana I, Thumann C, Bandiera S, Lutgehetmann M, Volz T, Davis C, Harris HJ, Mee CJ, Girardi E, Chane-Woon-Ming B, Ericsson M, Fletcher N, Bartenschlager R, Pessaux P, Vercauteren K, Meuleman P, Villa P, Kaderali L, Pfeffer S, Heim MH, Neunlist M, Zeisel MB, Dandri M, McKeating JA, Robinet E, Baumert TF. (2015) Clearance of persistent hepatitis C virus infection in humanized mice using a claudin-1-targeting monoclonal antibody. *Nat Biotechnol*, 33(5): 549-554.
144. 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(2): 411-422.
145. Kim TH, Huh JH, Lee S, Kang H, Kim GI, An HJ. (2008) Down-regulation of claudin-2 in breast carcinomas is associated with advanced disease. *Histopathology*, 53(1): 48-55.
146. Gao Z, McClane BA. (2012) Use of *Clostridium perfringens* Enterotoxin and the Enterotoxin Receptor-Binding Domain (C-CPE) for Cancer Treatment: Opportunities and Challenges. *J Toxicol*, 2012: 981626.

147. Long H, Crean CD, Lee WH, Cummings OW, Gabig TG. (2001) Expression of *Clostridium perfringens* enterotoxin receptors claudin-3 and claudin-4 in prostate cancer epithelium. *Cancer Res*, 61(21): 7878-7881.
148. Michl P, Barth C, Buchholz M, Lerch MM, Rolke M, Holzmann KH, Menke A, Fensterer H, Giehl K, Lohr M, Leder G, Iwamura T, Adler G, Gress TM. (2003) Claudin-4 expression decreases invasiveness and metastatic potential of pancreatic cancer. *Cancer Res*, 63(19): 6265-6271.
149. Darido C, Buchert M, Pannequin J, Bastide P, Zalzal H, Mantamadiotis T, Bourgaux JF, Garambois V, Jay P, Blache P, Joubert D, Hollande F. (2008) Defective claudin-7 regulation by Tcf-4 and Sox-9 disrupts the polarity and increases the tumorigenicity of colorectal cancer cells. *Cancer Res*, 68(11): 4258-4268.
150. Kominsky SL, Argani P, Korz D, Evron E, Raman V, Garrett E, Rein A, Sauter G, Kallioniemi OP, Sukumar S. (2003) Loss of the tight junction protein claudin-7 correlates with histological grade in both ductal carcinoma in situ and invasive ductal carcinoma of the breast. *Oncogene*, 22(13): 2021-2033.
151. Sheehan GM, Kallakury BV, Sheehan CE, Fisher HA, Kaufman RP, Jr., Ross JS. (2007) Loss of claudins-1 and -7 and expression of claudins-3 and -4 correlate with prognostic variables in prostatic adenocarcinomas. *Hum Pathol*, 38(4): 564-569.
152. Kuhn S, Koch M, Nubel T, Ladwein M, Antolovic D, Klingbeil P, Hildebrand D, Moldenhauer G, Langbein L, Franke WW, Weitz J, Zoller M. (2007) A complex of EpCAM, claudin-7, CD44 variant isoforms, and tetraspanins promotes colorectal cancer progression. *Mol Cancer Res*, 5(6): 553-567.
153. Ishak K, Baptista A, Bianchi L, Callea F, De Groote J, Gudat F, Denk H, Desmet V, Korb G, MacSween RN, et al. (1995) Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol*, 22(6): 696-699.

154. Doleshal M, Magotra AA, Choudhury B, Cannon BD, Labourier E, Szafranska AE. (2008) Evaluation and validation of total RNA extraction methods for microRNA expression analyses in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *J Mol Diagn*, 10(3): 203-211.
155. Varnholt H, Drebber U, Schulze F, Wedemeyer I, Schirmacher P, Dienes HP, Odenthal M. (2008) MicroRNA gene expression profile of hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 47(4): 1223-1232.
156. Ma YT, Palmer DH. (2012) Impact of restricting access to high-cost medications for hepatocellular carcinoma. *Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res*, 12(4): 465-473.
157. Országos Egészségbiztosítási Pénztár - Gyógyszerkereső. Keresés időpontja: 2016.10.19. 09:30; URL: <http://www.oep.hu/iframes/gyogyszerkereso>.
158. Nikiforova MN, Tseng GC, Steward D, Diorio D, Nikiforov YE. (2008) MicroRNA expression profiling of thyroid tumors: biological significance and diagnostic utility. *J Clin Endocrinol Metab*, 93(5): 1600-1608.
159. Preis M, Gardner TB, Gordon SR, Pipas JM, Mackenzie TA, Klein EE, Longnecker DS, Gutmann EJ, Sempere LF, Korc M. (2011) MicroRNA-10b expression correlates with response to neoadjuvant therapy and survival in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*, 17(17): 5812-5821.
160. Chen L, Jiang M, Yuan W, Tang H. (2012) miR-17-5p as a novel prognostic marker for hepatocellular carcinoma. *J Invest Surg*, 25(3): 156-161.
161. Karakatsanis A, Papaconstantinou I, Gazouli M, Lyberopoulou A, Polymeneas G, Voros D. (2013) Expression of microRNAs, miR-21, miR-31, miR-122, miR-145, miR-146a, miR-200c, miR-221, miR-222, and miR-223 in patients with hepatocellular carcinoma or intrahepatic cholangiocarcinoma and its prognostic significance. *Mol Carcinog*, 52(4): 297-303.

162. Toffanin S, Hoshida Y, Lachenmayer A, Villanueva A, Cabellos L, Minguez B, Savic R, Ward SC, Thung S, Chiang DY, Alsinet C, Tovar V, Roayaie S, Schwartz M, Bruix J, Waxman S, Friedman SL, Golub T, Mazzaferro V, Llovet JM. (2011) MicroRNA-based classification of hepatocellular carcinoma and oncogenic role of miR-517a. *Gastroenterology*, 140(5): 1618-1628.
163. Peveling-Oberhag J, Doring C, Hartmann S, Filmann N, Mertens A, Piiper A, Herrmann E, Hansmann ML, Zeuzem S, Trojan J, Welker MW. (2015) Feasibility of global miRNA analysis from fine-needle biopsy FFPE material in patients with hepatocellular carcinoma treated with sorafenib. *Clin Sci (Lond)*, 128(1): 29-37.
164. Gyugos M, Lendvai G, Kenessey I, Schlachter K, Halasz J, Nagy P, Garami M, Jakab Z, Schaff Z, Kiss A. (2014) MicroRNA expression might predict prognosis of epithelial hepatoblastoma. *Virchows Arch*, 464(4): 419-427.
165. Lendvai G, Jarmay K, Karacsony G, Halasz T, Kovalszky I, Baghy K, Wittmann T, Schaff Z, Kiss A. (2014) Elevated miR-33a and miR-224 in steatotic chronic hepatitis C liver biopsies. *World J Gastroenterol*, 20(41): 15343-15350.
166. Yang Y, Chang S, Zhao Z, Hou NI, He K, Wang X, Gao L, Wang L, Cai D, Guo BO, Tong D, Song T, Huang C. (2015) MicroRNA-214 suppresses the proliferation of human hepatocellular carcinoma cells by targeting E2F3. *Oncol Lett*, 10(6): 3779-3784.
167. Wang X, Chen J, Li F, Lin Y, Zhang X, Lv Z, Jiang J. (2012) MiR-214 inhibits cell growth in hepatocellular carcinoma through suppression of beta-catenin. *Biochem Biophys Res Commun*, 428(4): 525-531.
168. Zhang Y, Takahashi S, Tasaka A, Yoshima T, Ochi H, Chayama K. (2013) Involvement of microRNA-224 in cell proliferation, migration, invasion, and anti-apoptosis in hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol*, 28(3): 565-575.

169. Shen SN, Wang LF, Jia YF, Hao YQ, Zhang L, Wang H. (2013) Upregulation of microRNA-224 is associated with aggressive progression and poor prognosis in human cervical cancer. *Diagn Pathol*, 8: 69.
170. Lu S, Wang S, Geng S, Ma S, Liang Z, Jiao B. (2013) Upregulation of microRNA-224 confers a poor prognosis in glioma patients. *Clin Transl Oncol*, 15(7): 569-574.
171. Wang Y, Ren J, Gao Y, Ma JZ, Toh HC, Chow P, Chung AY, Ooi LL, Lee CG. (2013) MicroRNA-224 targets SMAD family member 4 to promote cell proliferation and negatively influence patient survival. *PLoS One*, 8(7): e68744.
172. Mencia N, Selga E, Noe V, Ciudad CJ. (2011) Underexpression of miR-224 in methotrexate resistant human colon cancer cells. *Biochem Pharmacol*, 82(11): 1572-1582.
173. Li H, Li Y, Liu D, Sun H, Liu J. (2013) miR-224 is Critical for Celastrol-Induced Inhibition of Migration and Invasion of Hepatocellular Carcinoma Cells. *Cell Physiol Biochem*, 32(2): 448-458.
174. Wang Y, Lee AT, Ma JZ, Wang J, Ren J, Yang Y, Tantoso E, Li KB, Ooi LL, Tan P, Lee CG. (2008) Profiling microRNA expression in hepatocellular carcinoma reveals microRNA-224 up-regulation and apoptosis inhibitor-5 as a microRNA-224-specific target. *J Biol Chem*, 283(19): 13205-13215.
175. Dweep H, Sticht C, Pandey P, Gretz N. (2011) miRWalk--database: prediction of possible miRNA binding sites by "walking" the genes of three genomes. *J Biomed Inform*, 44(5): 839-847.
176. Murakami Y, Yasuda T, Saigo K, Urashima T, Toyoda H, Okanoue T, Shimotohno K. (2006) Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues. *Oncogene*, 25(17): 2537-2545.

177. Chen L, Shi Y, Jiang CY, Wei LX, Lv YL, Wang YL, Dai GH. (2011) Coexpression of PDGFR-alpha, PDGFR-beta and VEGF as a prognostic factor in patients with hepatocellular carcinoma. *Int J Biol Markers*, 26(2): 108-116.
178. Patel SH, Kneuert PJ, Delgado M, Kooby DA, Staley CA, 3rd, El-Rayes BF, Kauh JS, Sarmiento JM, Hanish S, Cohen C, Farris AB, 3rd, Maithel SK. (2011) Clinically relevant biomarkers to select patients for targeted inhibitor therapy after resection of hepatocellular carcinoma. *Ann Surg Oncol*, 18(12): 3384-3390.
179. Schlachter K, Gyugos M, Halasz J, Lendvai G, Baghy K, Garami M, Gyongyosi B, Schaff Z, Kiss A. (2014) High Tricellulin Expression Is Associated With Better Survival In Human Hepatoblastoma. *Histopathology*.
180. Sonoda N, Furuse M, Sasaki H, Yonemura S, Katahira J, Horiguchi Y, Tsukita S. (1999) Clostridium perfringens enterotoxin fragment removes specific claudins from tight junction strands: Evidence for direct involvement of claudins in tight junction barrier. *J Cell Biol*, 147(1): 195-204.
181. Escudero-Esparza A, Jiang WG, Martin TA. (2011) The Claudin family and its role in cancer and metastasis. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 16: 1069-1083.
182. Takaki Y, Hirai S, Manabe N, Izumi Y, Hirose T, Nakaya M, Suzuki A, Mizuno K, Akimoto K, Tsukita S, Shuin T, Ohno S. (2001) Dynamic changes in protein components of the tight junction during liver regeneration. *Cell Tissue Res*, 305(3): 399-409.
183. Grotegut S, von Schweinitz D, Christofori G, Lehembre F. (2006) Hepatocyte growth factor induces cell scattering through MAPK/Egr-1-mediated upregulation of Snail. *EMBO J*, 25(15): 3534-3545.
184. Yovchev MI, Grozdanov PN, Joseph B, Gupta S, Dabeva MD. (2007) Novel hepatic progenitor cell surface markers in the adult rat liver. *Hepatology*, 45(1): 139-149.

185. Harris HJ, Farquhar MJ, Mee CJ, Davis C, Reynolds GM, Jennings A, Hu K, Yuan F, Deng H, Hubscher SG, Han JH, Balfe P, McKeating JA. (2008) CD81 and claudin 1 coreceptor association: role in hepatitis C virus entry. *J Virol*, 82(10): 5007-5020.
186. Mensa L, Crespo G, Gastinger MJ, Kabat J, Perez-del-Pulgar S, Miquel R, Emerson SU, Purcell RH, Forns X. (2011) Hepatitis C virus receptors claudin-1 and occludin after liver transplantation and influence on early viral kinetics. *Hepatology*, 53(5): 1436-1445.
187. Harris HJ, Wilson GK, Hubscher SG, McKeating JA. (2013) Heterogeneous claudin-1 expression in human liver. *Hepatology*, 57(2): 854-855.
188. Zadori G, Gelley F, Torzsok P, Sarvary E, Doros A, Deak AP, Nagy P, Schaff Z, Kiss A, Nemes B. (2011) Examination of claudin-1 expression in patients undergoing liver transplantation owing to hepatitis C virus cirrhosis. *Transplant Proc*, 43(4): 1267-1271.
189. Harris HJ, Davis C, Mullins JG, Hu K, Goodall M, Farquhar MJ, Mee CJ, McCaffrey K, Young S, Drummer H, Balfe P, McKeating JA. (2010) Claudin association with CD81 defines hepatitis C virus entry. *J Biol Chem*, 285(27): 21092-21102.
190. Brokalaki EI, Weber F, Sotiropoulos GC, Daoudaki M, Cicinnati VR, Beckebaum S. (2012) Claudin-7 expression in hepatocellular carcinoma. *Transplant Proc*, 44(9): 2737-2740.
191. Tsujiwaki M, Murata M, Takasawa A, Hiratsuka Y, Fukuda R, Sugimoto K, Ono Y, Nojima M, Tanaka S, Hirata K, Kojima T, Sawada N. (2015) Aberrant expression of claudin-4 and -7 in hepatocytes in the cirrhotic human liver. *Med Mol Morphol*, 48(1): 33-43.

192. 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(1): 68-76.
193. Yoon CH, Kim MJ, Park MJ, Park IC, Hwang SG, An S, Choi YH, Yoon G, Lee SJ. (2010) Claudin-1 acts through c-Abl-protein kinase Cdelta (PKCdelta) signaling and has a causal role in the acquisition of invasive capacity in human liver cells. *J Biol Chem*, 285(1): 226-233.
194. Dhawan P, Singh AB, Deane NG, No Y, Shiou SR, Schmidt C, Neff J, Washington MK, Beauchamp RD. (2005) Claudin-1 regulates cellular transformation and metastatic behavior in colon cancer. *J Clin Invest*, 115(7): 1765-1776.
195. Resnick MB, Konkin T, Routhier J, Sabo E, Pricolo VE. (2005) Claudin-1 is a strong prognostic indicator in stage II colonic cancer: a tissue microarray study. *Mod Pathol*, 18(4): 511-518.
196. Tabaries S, Dong Z, Annis MG, Omeroglu A, Pepin F, Ouellet V, Russo C, Hassanain M, Metrakos P, Diaz Z, Basik M, Bertos N, Park M, Guettier C, Adam R, Hallett M, Siegel PM. (2011) Claudin-2 is selectively enriched in and promotes the formation of breast cancer liver metastases through engagement of integrin complexes. *Oncogene*, 30(11): 1318-1328.
197. Sakaguchi T, Gu X, Golden HM, Suh E, Rhoads DB, Reinecker HC. (2002) Cloning of the human claudin-2 5'-flanking region revealed a TATA-less promoter with conserved binding sites in mouse and human for caudal-related homeodomain proteins and hepatocyte nuclear factor-1alpha. *J Biol Chem*, 277(24): 21361-21370.
198. Zeng X, Lin Y, Yin C, Zhang X, Ning BF, Zhang Q, Zhang JP, Qiu L, Qin XR, Chen YX, Xie WF. (2011) Recombinant adenovirus carrying the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene inhibits hepatocellular carcinoma xenograft growth in mice. *Hepatology*, 54(6): 2036-2047.

199. Son S, Kojima T, Decaens C, Yamaguchi H, Ito T, Imamura M, Murata M, Tanaka S, Chiba H, Hirata K, Sawada N. (2009) Knockdown of tight junction protein claudin-2 prevents bile canalicular formation in WIF-B9 cells. *Histochem Cell Biol*, 131(3): 411-424.
200. Lodi C, Szabo E, Holczbauer A, Batmunkh E, Szijarto A, Kupcsulik P, Kovalszky I, Paku S, Illyes G, Kiss A, Schaff Z. (2006) Claudin-4 differentiates biliary tract cancers from hepatocellular carcinomas. *Mod Pathol*, 19(3): 460-469.
201. Lourenco SV, Coutinho-Camillo CM, Buim ME, de Carvalho AC, Lessa RC, Pereira CM, Vettore AL, Carvalho AL, Fregnani JH, Kowalski LP, Soares FA. (2010) Claudin-7 down-regulation is an important feature in oral squamous cell carcinoma. *Histopathology*, 57(5): 689-698.
202. Lioni M, Brafford P, Andl C, Rustgi A, El-Deiry W, Herlyn M, Smalley KS. (2007) Dysregulation of claudin-7 leads to loss of E-cadherin expression and the increased invasion of esophageal squamous cell carcinoma cells. *Am J Pathol*, 170(2): 709-721.
203. Bouchagier KA, Assimakopoulos SF, Karavias DD, Maroulis I, Tzelepi V, Kalofonos H, Karavias DD, 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(3): 315-326.
204. Tokes AM, Kulka J, Paku S, Szik A, Paska C, Novak PK, Szilak L, Kiss A, Bogi K, Schaff Z. (2005) Claudin-1, -3 and -4 proteins and mRNA expression in benign and malignant breast lesions: a research study. *Breast Cancer Res*, 7(2): R296-305.
205. Szasz AM, Nemeth Z, Gyorffy B, Micsinai M, Krenacs T, Baranyai Z, Harsanyi L, Kiss A, Schaff Z, Tokes AM, Kulka J. (2011) Identification of a claudin-4 and E-cadherin score to predict prognosis in breast cancer. *Cancer Sci*, 102(12): 2248-2254.

206. Holczbauer A, Gyongyosi B, Lotz G, Szijarto A, Kupcsulik P, Schaff Z, Kiss A. (2013) Distinct claudin expression profiles of hepatocellular carcinoma and metastatic colorectal and pancreatic carcinomas. *J Histochem Cytochem*, 61(4): 294-305.
207. 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(2): 113-121.
208. Hashimoto Y, Tada M, Iida M, Nagase S, Hata T, Watari A, Okada Y, Doi T, Fukasawa M, Yagi K, Kondoh M. (2016) Generation and characterization of a human-mouse chimeric antibody against the extracellular domain of claudin-1 for cancer therapy using a mouse model. *Biochem Biophys Res Commun*, 477(1): 91-95.

11 - SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

Gyöngyösi B, Végh É, Járay B, Székely E, Fassan M, Bodoky G, Schaff Z, Kiss A. (2014) Pretreatment microRNA level and outcome of sorafenib-treated hepatocellular carcinoma. J Histochem Cytochem, 62:(8) 547-555.

Holczbauer Á*, **Gyöngyösi B***, Lotz G, Törzsök P, Kaposi-Novák P, Szijártó A, Tátrai 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:(3) 493-502.

*megosztott első szerzők

Az értekezés témájától független közlemények:

Bukong TN, Iracheta-Vellve A, Saha B, Ambade A, Satishchandran A, **Gyongyosi B**, Lowe P, Catalano D, Kodys K, Szabo G. (2016) Inhibition of spleen tyrosine kinase activation ameliorates inflammation, cell death, and steatosis in alcoholic liver disease. Hepatology, 64:(4) 1057-1071.

Bukong TN, Iracheta-Vellve A, **Gyongyosi B**, Ambade A, Catalano D, Kodys K, Szabo G. (2016) Therapeutic benefits of Spleen Tyrosine Kinase inhibitor administration on binge drinking-induced alcoholic liver injury, steatosis, and inflammation in mice. Alcohol Clin Exp Res, 40:(7) 1524-1530.

Ambade A, Satishchandran A, **Gyongyosi B**, Lowe P, Szabo G. (2016) Adult mouse model of early hepatocellular carcinoma promoted by alcoholic liver disease. *World J Gastroenterol*, 22:(16) 4091-4108.

Iracheta-Vellve A, Petrasek J, Satishchandran A, **Gyongyosi B**, Saha B, Kodys K, Fitzgerald KA, Kurt-Jones EA, Szabo G. (2015) Inhibition of sterile danger signals, uric acid and ATP, prevents inflammasome activation and protects from alcoholic steatohepatitis in mice. *J Hepatol*, 63:(5) 1147-1155.

Schlachter K, Gyugos M, Halász J, Lendvai G, Baghy K, Garami M, **Gyöngyösi B**, Schaff Z, Kiss A. (2014) High tricellulin expression is associated with better survival in human hepatoblastoma. *Histopathology*, 65:(5) 631-641.

Zinner B, **Gyöngyösi B**, Babarczy E, Kiss A, Sobel G. (2013) Claudin 1 expression characterizes human uterine cervical reserve cells. *J Histochem Cytochem*, 61:(12) 880-888.

Holczbauer Á*, **Gyöngyösi B***, Lotz G, Szijártó A, Kupcsulik P, Schaff Z, Kiss A. (2013) Distinct claudin expression profiles of hepatocellular carcinoma and metastatic colorectal and pancreatic carcinomas. *J Histochem Cytochem*, 61:(4) 294-305.
*megosztott első szerzők

Straub BK, **Gyoengyoesi B**, Koenig M, Hashani M, Pawella LM, Herpel E, Mueller W, Macher-Goeppinger S, Heid H, Schirmacher P. (2013) Adipophilin/perilipin-2 as a lipid droplet-specific marker for metabolically active cells and diseases associated with metabolic dysregulation. *Histopathology*, 62:(4) 617-631.

12 - KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném kifejezni köszönetemet mindazoknak, akik az értekezés elkészítésében segítségemre voltak!

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Schaff Zsuzsának és Prof. Dr. Tímár Józsefnek, hogy volt és jelenlegi igazgatókként a II. Számú Patológiai Intézetben lehetőséget és keretet adtak kutatómunkám elvégzéséhez.

Kifejezett hálával tartozom témavezetőmnek, Dr. Kiss Andrásnak, hogy egyetemista éveim óta folyamatosan segítette magyarországi és külföldi tudományos munkámat, mind szakmailag, mind emberileg maximálisan támogatott, valamint mindvégig biztosította a háttérrel munkámhoz.

Nagy köszönettel tartozom Lendvai Gábornak a molekuláris biológiai technikák elsajátításáért és a laboratóriumi munkák során nyújtott segítségéért.

Köszönöm Dr. Lotz Gábornak, hogy tudományos diákkörös hallgatóként nála kezdhettem el tudományos pályafutásomat és azóta is folyamatosan fordulhatok hozzá kérdéseimmel.

Hálás vagyok Horváth Csillának és Azumah Erzsébetnek a molekuláris biológiai vizsgálatok elvégzésében nyújtott segítségéért.

Köszönettel tartozom Tökés Anna-Máriának a disszertációm nagy alapossággal elkészített házi bírálatáért.

Köszönet illeti szerzőtársaimat – különösképpen Dr. Végh Évát –, valamint PhD-hallgató társaimat – Dr. Holczbauer Ágnes, Dr. Törzsök Pétert, Dr. Schlachter Krisztinát, Barbai Tamást, Dr. Imrédi Eleonórá, Dr. Kiss Orsolyát, Gyugos Mónikát – akikre mindvégig támaszkodhattam kutatásaink során.

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

Végül pedig köszönöm feleségemnek, családomnak és barátaimnak!