

Tight junction proteinek és jelátviteli utak molekuláris patológiai vizsgálata fibrolamellaris carcinomában

Doktori tézisek

Dr. Patonai Attila

**Semmelweis Egyetem
Patológiai Doktori Iskola**



Témavezető: **Dr. Schaff Zsuzsa** egyetemi tanár, akadémikus

Hivatalos bírálók: **Dr. Tornai István** med.habil., egyetemi docens, Ph.D
Dr. Kovács Gábor med.habil., egyetemi docens, Ph.D

Szigorlati bizottság elnöke: **Dr. Keller Éva** egyetemi tanár.

Szigorlati bizottság tagjai: **Dr. Herszényi László** egyetemi docens, D.Sc.
Dr. Simon Károly osztályvezető főorvos, Ph.D

Budapest

2013

1.BEVEZETÉS

A májrák a daganatos halálozásban világviszonylatban a férfiak között a harmadik, nőknél az ötödik helyen szerepel. A hepatocellularis carcinoma (HCC) a primer malignus májtumorok leggyakoribb formája, mely szövettanilag jól elkülöníthető típusokra osztható. A HCC kialakulásában szerepet játszó tényezők között a krónikus hepatotrop vírusinfekciók (hepatitis B vírus - HBV; hepatitis C vírus - HCV), a krónikus alkoholfogyasztás, aflatoxin-B1, mycotoxintól szennyeződött élelmiszerek fogyasztása, NASH/NAFLD és zsírmáj, II. típusú diabetes mellitus, primer biliaris cirrhosis, autoimmun hepatitis, hemochromatosis, Wilson-kór valamint egyéb örökletes májbetegségek, foglalkozási ártalmak és több veleszületett anyagcserezavar szerepelnek. A HCC hátterében 70-90%-ban krónikus májbetegség - elsősorban krónikus hepatitis/májcirrhosis áll, 10-30%-ban a HCC nem társul cirrhosisal.

A fibrolamellaris carcinoma (fibrolamellaris hepatocellularis carcinoma, FLC) a HCC ritka variánsa, mely jellemzően a fiatal korosztályban, cirrhosis mentes májban alakul ki és etiopathogenese ismeretlen. A FLC-t, mint a konvencionális hepatocellularis carcinoma (cHCC) hisztológiailag jól elkülöníthető, jellegzetes szövettani struktúrát mutató variánsát először 1956-ban Edmondson és munkatársai írták le.

A FLC előfordulása a vizsgált földrajzi régiótól függően az összes HCC esetek 1% - 5% -nak felel meg, de hazai adat erre vonatkozólag nincs. Az Egyesült Államokban az irodalmi adatok szerint az FLC a HCC esetek 1-2%-át teszi ki, más országokban az előfordulási aránya ennél ismeretlen okból magasabb; így Lengyelországban a HCC esetek 5,1 %, Mexikóban 5,8 %-a FLC. A FLC jellegzetessége, hogy alfa-fetoprotein (AFP) és citokeratin (CK)19 negatív, azonban hepatocellularis markereket (hepatocyta specifikus antigén - HSA, CK8,-18) és epeúti markereket (CK7) is expresszál. A FLC-nak a HCC-nél nincs jelentősen jobb kimenetele, a prognózisra vonatkozó kedvezőbb megfigyelések abból adódnak, hogy a FLC általában fiatal betegekben észlelhető, egyéb betegségtől (cirrhosis, fibrosis) mentes májban alakul ki és magas a rezekabilitás aránya. A FLC kezelési lehetőségei között a tumor rezekciója, a májtranszplantáció, intervenciós kezelések és a kemoterápia szerepelnek.

A többsejtű élőlények kívüllég felé határoló hámszöveti (fedőhám, epithelium) és a belső szervekben található (endothelium, mesothel, mirigyhám) szöveti sejtek jellegzetes sejtkapcsoló struktúrákkal kötődnek egymáshoz. A sejtkapcsoló struktúrák közül a sejt apikális pólusa felé a tight junction (TJ) helyezkedik el. A TJ-k egymáshoz igen hasonló struktúrájú protein komplexekből, fő alkotóként és a szerkezetet jelentősen meghatározó occludinból és

claudinokból (CLDNs) épülnek fel. Ezeken kívül a TJ-k különböző arányban junkcionális adhéziós molekulákat (JAM) és egyéb proteinek (cingulin, symplekin, ZO-1, e-cadherin, actin) is tartalmaznak. A TJ-k funkciója rendkívül sokrétű, így a paracellularis réseken keresztül a barrierképzés, a folyadék és ionháztartás regulálása, valamint a sejtpolaritás kialakítása és fenntartása. Újabb vizsgálatok igazolták, hogy a TJ-k részt vesznek számos szignáltranszdukciós folyamat szabályozásában, a veleszületett immunitás kialakításában és fenntartásában is. A legfontosabb TJ-t alkotó integráns membránproteinek az occludin (OCLN) és a claudinok, melyek a paracellularis barrier funkció, a sejtpolaritás kialakítása mellett az intercellularis terek és az epithel/endothel sejtek közötti molekula áramlások és az iontranszport legfőbb szabályozói. A claudinokat feloszthatjuk phyloenetikai alapon, szekvenciájuk egyezésének mértéke szerint „klasszikus” és „nem klasszikus” típusokra, továbbá funkciójuk szerint tömítő és csatornaképző claudinokra. A CLDN-ok különböző eloszlásban és összetételben mutatkoznak meg a szövetekben, attól függően, hogy az adott szövetben lévő sejtek milyen funkciót látnak el a paracellularis iontranszportban és az elektromos rezisztenciában. A claudin expressziós mintázat jellegzetes szerv és szövetspecifitást mutat és a szövetekből kiinduló daganatok is jellegzetes mintázattal rendelkeznek.

A tight junction asszociált Marvel proteineknek (TAMPs) a már említett OCLN-on kívül, további két tagja ismert; az újabban megismert tricellulin (TRIC) és a MarvelD3 protein. A TRIC fiziológias körülmények között elsősorban a háromsejt kapcsolatok (tricelluláris tight junction = tTJ) vagy kettős sejtkapcsolatok (bicelluláris tight junction = bTJ) centralis részének regulációjáért, ezen sejtkapcsolatokban megvalósuló tömítő funkciójáért, ionregulációjáért, transepithelialis rezisztencia kialakításáért felelős.

A tirozin kinázok (TK) olyan tirozin specifikus protein kináz enzimek, melyek csak a többsejtű élő szervezetekben található meg. Kiemelkedően fontos funkciójuk a többsejtű szervezetekben a sejtek közötti szignálok növekedésre, adhézióra, motilitásra, sejthalálra vonatkozó információinak továbbítása, közvetítése. A TK-ok egy része transzmembrán receptor TK (jelérzékkelő), másrésztük citoplazmán belül helyezkedik el. Szerepük rendkívül jelentős a növekedés, a differenciálódás, a sejtciklus regulációja, a sejtmigráció, proliferáció és az apoptózis szabályozásában. A TK receptorok egy jelentős része növekedési faktor receptor (pl. EGFR, PDGFR, IGF1R, SCF-ckit). A szignáltranszdukciós szabályozási folyamat a ligand kötődésekor a receptor aktiválódásával kezdődik, mely során a receptor-ligand kötődés után dimerizáció történik majd további kinázok (RAS-RAF, MEK-ERK, PI3K, AKT, STAT) kaszkádszerű, lefelé irányuló aktivációja („downstreaming signaling”) indul meg. Amennyiben amplifikáció vagy mutáció alakul ki a fenti génekben, akkor a sejtek nem kontrollálható

osztódásba, növekedésbe kezdhetnek, ennek következtében malignus daganat alakulhat ki. A célzott EGFR gátló kezelés célpontja az EGFR extracelluláris vagy intracelluláris domainje lehet. A kis molekula súlyú tirozináz gátlók (TKI) a mutáns fehérjéhez szelektíven kapcsolódva fejtenek ki tumorelles hatást. Amennyiben a KRAS gén mutáns típusú, a betegnél nem alkalmazható EGFR-ellenes célzott terápia, mivel a kóros KRAS protein jelenléte megghiúsítja a kezelés sikerét.

A β -catenin az adherens junction komponense, a cadherin protein komplex alegysége, mely az axin/conductin nevű fehérjékkel összekapcsolódva a Wnt/ β -catenin szignáltranszdukciós út központi fontosságú, intracelluláris jelátalakító résztvevője. Az aktív Wnt hiányában a β -catenin degradálódik és a leendő target gének inaktívált állapotban maradnak. Amennyiben a Wnt szignál aktív, akkor a β -catenin degradáció csökken és a felhalmozódott β -catenin aktiválni képes a transzkripciót, melyet fej-nyaki laphámrák, prostata, colorectalis carcinoma esetében, valamint a hepatocarcinogenesis során is kimutattak.

A syndecan-1 (CD138) a heparán szulfát proteoglycan család tagja, mely jelentős szerepet játszik a sejtek közötti és a sejt-kollagén kapcsolatban, továbbá felelős a sejt és extracelluláris környezete közötti interakció szabályozásáért, regulálja a sejtproliferációt, a sejt migrációt, valamint szabályozza a szignáltranszdukció egyes lépéseit és a citoskeleton szerkezeti változásait is. A syndecan-1-t számos daganat expresszálja, így a plasmocytoid tumorok, a diffúz nagy B sejt lymphoma, prostata-, emlő-, colorectalis-, cervixcarinoma, veserák és fej-nyaki laphám tumorok egyes típusai.

2.CÉLKITŰZÉSEK

A FLC a cHCC ritka, jellegzetes variánsa, igen sajátságos primer májdaganat, melynek etiopathogenesise tisztázatlan.

Célunk volt ezért olyan sejtbioológiai eltérések feltárása, melyek a FLC-t elkülönítik egyéb primer rosszindulatú májtumortól, elsősorban a cHCC-től és a cholangiocarcinomától (CCC) és jellemzik ezt a ritkán előforduló daganatot. Célunk volt továbbá olyan markerek felfedése, melyek a helyes diagnózis megállapításán túl a terápia esetleges célpontjával is szolgálhatnak.

Elsődlegesen a sejtkapcsoló struktúrák, kiemelten a TJ proteinek és egyes jelátviteli utak vizsgálatát tűztük ki, majd a terápia szempontjából lényeges mutációkat, így az EGFR és KRAS mutációt kívántuk vizsgálni.

A fenti célok eléréséhez a következő célkitűzéseket fogalmaztuk meg ;

1. A sejtkapcsoló struktúrfehérjék (TJ proteinek) közül a claudinok (1,2,3,4,5,7) és az occludin expressziós profiljának a vizsgálata FLC-ben, a cHCC-val és CCC-val összehasonlítva fehérje és mRNS szinten.
2. A újonnan felismert TJ fehérje, a tricellulin (TRIC) expressziójának vizsgálata FLC, cHCC és CCC primer májdaganatokban.
3. A β -catenin és syndecan-1 fehérjék expressziójának vizsgálata FLC, cHCC és CCC esetében.
4. Az EGFR protein expressziójának vizsgálata FLC, cHCC és CCC daganatokban.
5. Az EGFR és KRAS gének vizsgálata, az esetleges mutációk kimutatása FLC-ben.

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. Betegek és szövettinták

Vizsgálatainkat a Semmelweis Egyetem Regionális Etikai Bizottságának engedélyével (TUKEB#192) fibrolamellaris carcinoma (FLC) diagnózissal lezárt esetekből végeztük. A 11 eset közül 6 a Semmelweis Egyetem I. sz. Patológiai és Kísérletes Rákkutató, valamint a II.sz. Patológiai Intézetének 1999 és 2009 között archivált anyagából, 3 eset Magyarország vidéki centrumaiból (Gyöngyös, Szeged, Debrecen) konziliumba érkezett minta volt, további 2 esetet a Ruprecht-Karls Egyetem (Heidelberg, Németország) Patológiai Intézetének anyagából vizsgáltunk. A 11 beteg anyagából 8 sebészeti rezekátumot és 3 vastagtű biopsziás szövettintát értékeltünk, az esetek egyikében sem volt a májban cirrhosis vagy vírusfertőzés kimutatható. A 11 FLC beteg közül 6 betegnél igazoltak a klinikai vizsgálatok áttétképződést (nyirokcsomó, tüdő, peritoneum). Az esetek mindegyikében a FLC diagnózisa klinikai tünetek, képalkotó eljárások (ultrahang, CT, MRI) és a szövettani vizsgálat alapján került felállításra.

A betegek életkora 11-66 év között (átlagosan 20,8 év), a férfi/nő arány 5/6 volt. A 11 betegből származó FLC mintákat 7 konvencionális hepatocellularis carcinomával (cHCC; trabecularis-acinaris típus, grade II-III.), 7 cholangiocellularis carcinomával (intrahepaticus CCC, grade II-III.) és 5 nem tumoros „kontroll” májmintával hasonlítottuk össze. A cHCC betegek közül 2 esetben vírusfertőzés volt kimutatható, 3 esetben alapelváltozásként májcirrhosist lehetett igazolni, egy betegnél multiplex tumoros elváltozást találtak. A minták kiválasztására azonos korú betegekből nem volt lehetőség, mivel az FLC csoport átlagéletkora (20,81 év) - az irodalmi adatoknak megfelelően - jelentősen alacsonyabb a cHCC (66 év) és CCC (60 év) betegcsoportok átlagéletkoránál.

3.2. Szövettani vizsgálatok

A szövettintákat beérkezést követően 10%-os, neutralis (pH 7,4) PBS-ben beállított formalinban fixáltuk 24 órán át szobahőmérsékleten, majd alkoholsorban és xylolban történő dehidrációt követően paraffinba ágyasztuk. A paraffin blokkba ágyazott (FFPE) mintákból 3-4 µm-es metszetek készültek, amelyeket haematoxylin-eosinnal és kötőszöveti festéssel (pikroszírinsz vörös) festettünk meg. A szövettani metszetek értékelését fénymikroszkóppal végeztük.

3.3. Immunhisztokémiai vizsgálatok

Az FFPE szövetblokkokból 3-5 µm vastagságú metszeteket készítettünk Silanall

vagy Poly-l-lysinnel bevont Superfrost UltraPlus® (Thermo Fisher Scientific) tárgylemezre. Az immunhisztokémia reakciók során a következő antigének elleni primer antitesteket használtunk: CK7, CK8, CK 18, CK19, AFP, HepPar1 (HSA), Glypican3/GPC3, CLDN1, CLDN2, CLDN3, CLDN4, CLDN5, CLDN7, Tricellulin-Cterm, OCLN, CD31/PECAM1, CD34, EGFR, β -catenin, Syndecan-1/CD138. Pozitív kontrollként a csoportunk által korábban meghatározott, illetve a cégek által ajánlott szöveteket használtuk. Negatív kontrollként a primer antitesttel történő inkubálást elhagytuk. A reakciókat HRP Multimer alapú biotin mentes detektálási technikával működő Ventana Benchmark XT (Ventana Medical Systems Inc., Tucson, AZ, USA) automatizált immunfestő automatára állítottuk be. A felhasznált reagensek, a másodlagos antitest és a reakciók előhívása Ventana Medical Systems cég ajánlása alapján chromogénként 0,2% DAB-ot (3,3'-diaminobenzidine), 3% H₂O₂ alapú DAB inhibitor, < 50 μ g/mL HRP Multimer, 0,04% DAB H₂O₂ – t és 5 g/L CuSO₄ –ot tartalmazó UltraView™ Universal DAB Detection Kit alkalmazásával történt. Az immunhisztokémiai reakciók mellett a metszeteken magfestésként hematoxylint használtunk.

3.4 Immunfluorescens vizsgálatok

A fehérje lokalizáció további megjelenítéséhez TRIC, OCLN, CD31 primer antitestekkel immunfluorescens vizsgálatokat végeztünk. A minták rögzítése folyékony nitrogénben és izopentánban történt. A fagyasztásos technika segítségével a frissen fagyasztott tumorszövetből -80 °C-on tárolást követően 4-5 μ m vékony szeleteket metszettünk le -23 °C-ra hűtött mikrotomkés használatával, fagyasztókamrás microtome készülék (Shandon Cryotome® Cryostat) segítségével. A metszeteket Superfrost UltraPlus® (Thermo Fisher Scientific) tárgylemezre vittük fel, majd ezeket metanol és aceton 1:1 arányú keverékével fixáltuk. A nem specifikus protein kötő helyek blokkolása céljából speciális protein blokkoló oldatot (Protein Block-Serum Free) alkalmaztunk. A mintákat tricellulin (TRIC), occludin (OCLN) és CD31 primer antitesttel és Fluorescence Alexa Fluor 488 (FITC) és/vagy Alexa 568 jelölt antitestekkel inkubáltuk. A fagyasztott, jelölt metszeteket Pieper FK-7512-IQ CCD Kamerával felszerelt Leica DMRXA széleslátóterű fluorescens mikroszkóppal, adott hullámhosszú gerjesztési maximumot adó fluorescens fény segítségével vizsgáltuk és fotóztuk, majd a képet Leica CW4000 FISH Visualisation and Documentation Software segítségével rögzítettük. A fagyasztott metszeteket BioRad Radiance 2100 laser confocalis scanning mikroszkóp és LaserSharp 2000 Software használatával vizsgáltuk.

3.4 Morfometriai vizsgálatok

A CLDN1,2,3,4,5,7, TRIC, EGFR, syndecan-1 és β -catenin immunreakciókat

szemikvantitatívan és digitális morfometriai vizsgálattal értékeltük. A metszeteket, melyen immunreakció történt Mirax Panoramic MIDI és Mirax Panoramic SCAN digital slide scanner készülékekkel digitalizáltuk. A különböző immunreakciók erősségét és kiterjedését a digitális felvételekről Leica QWin Software segítségével mértük és értékeltük.

3.5 Statisztikai analízis

A statisztikai analízist nem paraméteres Kruskal-Wallis tesztet alkalmazva a STATISTICA Software 8.0 verzió (Tulsa, OK, USA) felhasználásával végeztük el. Az eredmények értékelésekor $P < 0,05$ változást tekintettünk statisztikailag szignifikáns különbségnek.

3.6 PCR vizsgálatok

3.6.1 RNS kinyerése szövetmintákból, cDNS készítés, primer tervezés

A vizsgált fehérjére vonatkozóan, a szabályozási szint megállapítása végett mRNS expresszió vizsgálatokat végeztünk. A teljes RNS izolálását FFPE anyagból végeztük. Ennek során az FLC mintákból származó paraffinblokkokból 8-10 darab, 3-5 μm vastag paraffinos metszetet 1,5 ml-es steril műanyagcsőbe helyeztünk, majd ebből izoláltunk RNS-t, a gyártó által erre a célra ajánlott QIAGEN RNeasy FFPE Kit (Cat.No.: 73504, QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) segítségével, a gyártó által megadott instrukciók szerint. NanoDrop 1000 Spectrophotometer (ThermoFisher Scientific Inc., Wilmington, DE, USA) készülékkel OD mérés alapján ellenőriztük a kapott nukleinsav tisztaságát és koncentrációját. A mRNS átírása reverz transzkripcióval cDNS-re mintánként 1 μg total RNS felhasználásával (template) High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) alkalmazásával történt. Adott génekre specifikus primereket terveztünk AlleleID 6.01 (Premier Biosoft International, Palo Alto, CA, USA) primer design software segítségével. Az izoform specificitást és a primerek méretét a BioEdit („biological sequence alignment”) szerkesztő software 7.01 (Tom Hall Ibis Therapeutics, Carlsbad, CA, USA) felhasználásával határoztuk meg. Az adott primerek specificitását a BiSearch software (Institute of Enzymology, Budapest, Hungary) alkalmazásával ellenőriztük.

3.7.4 qPCR

A minta/termék referencia (housekeeping) génhez viszonyított mRNS mennyiségét szintetizált cDNS felhasználásával valósídjú PCR vizsgálattal állapítottuk meg. A célfehérjét meghatározó mRNS mennyiségének vizsgálatára SYBR Green technológiával működő valós idejű polymerase láncreakciót (Real-time-PCR, qPCR) végeztünk ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) rendszeren. Referencia (housekeeping) génként az ABL (BCR-ABL oncogen) és a 36b4 (ARP, human acidic ribosomal phosphoprotein-PO)

géneket használtuk fel. A primer specifikus amplifikációt olvadáspont (melting) analysis és 2%-os agarose-gel electrophoresis használatával értékeltük. A qPCR vizsgálatok során az adatok statisztikai értékeléséhez a REST software-t (Relative Expression Software Tool; www.wzw.tum.de/gene-quantification) használtuk.

3.8 KRAS mutáció vizsgálata Mikrofluid Alapú Restrikciós Fragment Hossz Polymorphismus elemzéssel (RFMD)

A DNS izoláláshoz FPPE szövetmintákból steril körülmények között 1,7 ml-es műanyag csőbe (Eppendorf AG) 4 db 3-5 μm vastagságú mintákat metszettünk. A gyártó útmutatásait követve QIAmp[®] DNA FPPE Tissue Kit (QIAGEN) segítségével DNS-t izoláltunk. A kinyert DNS mennyiségét (abszorpciós vizsgálat, OD ellenőrzés) 260 nm hullámhosszon mérve spectrophotometerrel (ND-1000, Thermo Fisher Scientific) határoztuk meg. A DNS-t AmpliTaq Gold (Applied Biosystems) DNS polymerase enzimmel Mastercycler[®] thermal cycler készülék, (Eppendorf AG) segítségével szaporítottuk fel. A reakciókeverék összetétele reakciónként és mintánként a következő volt: 2.5 μl 10x PCR puffer+ Mg^{2+} , 200 μM / dNTP, 1pM/reakció minden egyes primerre, 0.8 U AmpliTaq Gold DNS polymerase sense mismatch primert használva a PCR termék tartalmazta a vad típusú (wt) KRAS gen BstNI vagy BgII restrictios endonuclease felismerő részét. Mindegyik reakciót 38 ciklussal vittük végig, ciklusonként a következő feltételekkel: Denaturáció: 95°C -on 1 percig, Primer annealing: 55°C -on 1 percig, Lánc elongáció: 72°C -on 2 percig.

A felsokszorozott termékeket KRAS 12 codon mutációra 80U BstNI-vel, KRAS 13 codon mutációra 80U BgII-vel emésztettük (New England BioLabs). Az enzimátikus emésztést 30 μl teljes térfogatra, a KRAS 12 codon esetében 60° C, a KRAS 13 codon esetében pedig 37°C-ra állítottuk be. A megemésztett PCR terméket agaróz gélen ethidium bromidos festést követően mikrofluid alapú Experion (BioRad Laboratories Inc.) gélelektroforézis rendszerrel BioRad Experion[™] DNA 1K Analysis Kit segítségével vizsgáltuk.

3.9 EGFR mutáció vizsgálata

Az EGFR 18, 19, 20, 21 exonok amplikonjait High Resolution Melting (olvadáspont analysis) eljárással Roche Light Cycler 480 Real Time PCR készülékkel (Roche Diagnostics) High Resolution Melting Mix (Roche Diagnostics) használatával elemeztük. A kiértékelést a gyártó által a gépbe épített Gene scanning programmal végeztük.

3.10 Direkt Szekvenálás

Az olvadáspont analysis eredményét direkt szekvenálással validáltuk. A direkt szekvenálást a

18 és 21 exon vizsgálatát követően az eredmények egyértelmű vad típusú volta miatt a futási kontrollokon végeztük el, valamint a 19 és 20 exonokat validáltuk ezzel a független módszerrel. A reakciót BigDye® Terminator v1.1 cycle Sequencing Kit (Applied Biosystem) felhasználásával végeztük a gyártó által mellékelt protokoll szerint. A szekvenáló reakciót BigDye X terminator purification kit (Applied Biosystems) segítségével történő tisztítás és sequenáló PCR után ABI 3130 Genetic Analyser System (Applied Biosystems) készülékkel analizáltuk.

4.EREDMÉNYEK

4.1. Az FLC makroszkópos képe

A vizsgált 11 FLC eseteink között 8 sebészeti resecátum mindegyikében az FLC jellegzetes makroszkópos megjelenése volt megfigyelhető. Az eltávolított specimeneinkben a tumor metszészlapja lágy tapintatú, sárgás-fehér színű volt, kis centralis vagy excentrikus, különböző vastagságú, elágazódó, septalis struktúrájú kötőszövetes heggel. A tumorok átlagos átmérőjét 86x73x76 mm-nek találtuk, a tumor körüli májszövet architektúráját minden esetben normálisnak láttuk, fibrosist vagy cirrhotist nem lehetett kimutatni.

4.2 A FLC szövettani jellegzetességei

A tanulmányban vizsgált 11 FLC eset mindegyike jellegzetes hisztopatológiai képet mutatott. A tumor nagy, polygonalis, granuláris szerkezetű, eosinophil cytoplazmával rendelkező daganatsejtekből állt, melyek oszlopokba vagy hálózatokba rendeződtek, helyenként glanduláris struktúrákat alkottak. A tumorsejtek csoportjai jellegzetes lamellaris-lemezes szerkezetű, fibrotikus sövényekkel, septumokkal voltak tagolva. A tumor környéki májszövet 5 esetben teljesen normál szöveti szerkezetű volt, míg egy mintában észleltünk enyhe, nem specifikus portális gyulladást.

4.3 Immunhisztokémiai, immunfluoreszcenciás és morфомetriás vizsgálatok

Az immunhisztokémiai vizsgálatok az FLC-re jellegzetes eredményt adták. A CK7, CK8 és CK18, valamint a HSA(HepPar1) pozitív volt, az AFP és a CK19 azonban negatív volt az összes vizsgált FLC mintában.

A CLDN1 és CLDN2 hasonló festődési mintázatot mutatott mind a három vizsgált tumorcsoportban, azonban a morфомetriai vizsgálatok alapján szignifikánsan magasabb

CLDN1 expressziót figyeltünk meg a CCC esetében a többi csoporthoz képest. A FLC CLDN2 expressziója kifejezetten erős, de ez a különbség a normál májhoz viszonyítva nem volt szignifikáns.

A CLDN4 és CLDN7 esetében az immunhisztokémiai reakciók cHCC és FLC tumorcsoportokban negatívnak mutatkoztak, ellentétben a CCC-vel, ahol erős, intenzív, , statisztikailag szignifikánsan magasabb membranózus pozitív festődést lehetett észlelni.

A CLDN5 a vizsgált 11 FLC közül 9 esetében különböző intenzitással mutatkozott pozitívnak, ellentétben a cHCC-vel, CCC-vel és a normál kontroll májjal, melyekben a parenchyma sejtekben negatív volt.

A normál májban a TRIC és OCLN pontszerű immunreakciókat mutatott, az FLC-ben néhol lineáris máshol pontszerű membranózus pozitívítás formájában mutatkozott a reakció. A TRIC fehérje expressziója magasabb volt a tumorok jól differenciált trabecularis vagy pseudoglandularis részeiben, míg a a solid és anaplasticus jellegű részekben jóval alacsonyabb volt, vagy hiányzott.

Az EGFR immunhisztokémiai vizsgálat igen intenzív, plazmamembránhoz asszociált pozitívítást adott az összes vizsgált tumorban, mely magasabb volt a normál májhoz viszonyítva. A β -catenin immunreakció membranózus pozitívítást jelzett a vizsgált tumorokban, nuclearis transzlokáció nem volt kimutatható.

A syndecan-1(CD138) immunhisztokémiai vizsgálat mindegyik vizsgált tumorcsoport esetében pozitív membranózus-szubmembranózus pozitívítás mutatott, a legkiterjedtebb pozitívítást cHCC esetében észleltük.

4.4 mRNS expressziós analízis

A mRNS expressziós vizsgálatok során a referencia génekhez viszonyított relatív expresszióját értékeltük. A cHCC csoport magasabb CLDN-1 és TRIC mRNS expresszióját találtuk FLC és a normál máj csoporthoz viszonyítva. Ehhez viszonyítva a normál máj CLDN1 és TRIC mRNS expressziója alacsonyabb volt. Az FLC esetében találtuk a legalacsonyabbnak a CLDN-1 és TRIC mRNS expresszióját. A CLDN2 esetében a normál máj mRNS expressziója volt a legmagasabb, ezt követte a cHCC majd az FLC csoport. A CLDN4 és CLDN5 esetében megegyezően a legmagasabb mRNS expressziót a normál máj adta, ezt követte az FLC, majd a cHCC csoport mRNS expressziója. A fentebb leírt mRNS expresszióban mutatkozó különbségek egyike sem bizonyult statisztikailag szignifikánsnak.

4.5 KRAS és EGFR mutáció vizsgálatok

A vizsgált FLC mintákban a K-RAS gén 2. exonon lévő 12 és 13. codonjának területén mutációt nem találtunk.

Az olvadáspont elemzéssel (HRM) és direkt szekvenálással mutációt az EGFR gén 18. 19. 20. és 21. exonjaiban nem tudtunk kimutatni.

5. KÖVETKEZTETÉSEK

1. Munkánk alapján elsőként mutattuk ki, hogy a FLC sejtkapcsoló struktúráinak fehérjei (TJ proteinek) sajátos változást, jellegzetes mintázatot mutatnak. A FLC-ben észlelt claudin mintázat a cHCC-hez mutat hasonlóságot és különbözik a CCC-re jellemző rajzolatától.
2. Elsőként mutattuk ki, hogy a FLC - az elsősorban endotel sejtekre jellemző - CLDN5-t jelentős mértékben expresszálja, mely egyéb primer májcarcinomában nem észlelhető.
3. A tricellulin, mint a közelmúltban leírt TJ fehérje expresszióját elsőként igazoltuk FLC-ben.
4. Az EGFR fokozott expresszióját mutattuk ki FLC-ben, ami azonban nem jár a gén mutációjával és a KRAS gén mutációja sem igazolódott.
5. Összefoglalva eredményeinket a FLC a HCC-k olyan speciális altípusának bizonyult, mely a TJ protein mintázat alapján egyéb primer májráktól jól elkülöníthető.
6. Munkánk igazolta az FLC-re speciálisan jellemző CLDN5, valamint az EGFR fokozott expresszióját FLC-ben, mely a jövőben terápiás célpontként szolgálhat.

6. AZ ÉRTEKEZÉS ÚJ EREMÉNYEI

1. Elsőként mutattuk ki a TJ proteinek mintázatának jellegzetes változását FLC-ban.
2. Kimutattuk a CLDN5 magas expresszióját FLC-ban, egyéb primer májtumorokkal szemben.
3. A CLDN4 negativitása FLC-ban a tumor chCC-hez való hasonlóságát igazolja és elkülöníti a CCC-től.
4. Elsőként mutattuk ki a TRIC expressziót FLC-ban és annak magi pozitívását.
5. Igazoltuk a FLC fokozott EGFR expresszióját, valamint az EGFR és KRAS gének aktiváló mutációjának hiányát.
6. A fentiek alapján a FLC a HCC olyan speciális altípusa, mely a TJ protein mintázat alapján egyéb primer májraktól jól elkülöníthető. Az igazolt fokozott CLDN5 és EGFR expresszió jövőbeli terápiás célpont alapjául szolgálhatnak FLC-ban.

7.SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

Patonai A, Erdélyi-Belle B, Korompay A, Somorác Á, Straub BK, Schirmacher P, Kovalszky I, Lotz G, Kiss A, Schaff Zs.

Claudins and tricellulin in fibrolamellar hepatocellular carcinoma

Virchows Archiv - An International Journal of Pathology 458:(6) pp. 679-688. (2011)

IF: 2.491

Patonai A, Erdélyi-Belle B, Korompay A, Somoracz A, Torzsok P, Kovalszky I, Barbai T, Raso E, Lotz G, Schaff Zs, Kiss A

Molecular Characteristics of Fibrolamellar Hepatocellular Carcinoma.

Pathology & Oncology Research 19:(1) pp. 63-70. (2013)

IF: 1.366

Nem az értekezés alapjául szolgáló közlemények :

Csébi Péter, Németh Tibor, Jakab Csaba, Patonai Attila, Garamvölgyi Rita, Manczur Ferenc, Spitzner A, Arany Tóth Attila, Kóbori László

Experimental results of using autologous rectus fascia sheath for venous patch grafts in dogs

Acta Veterinaria Hungarica 59:(3) pp. 373-384. (2011)

IF: 0.673

Jakab Cs, Csébi P, Szász AM, Szabó Z, Patonai A

Krónikus, óriásredős gyomorgyulladás kutyában: Chronic hypertrophic gastritis in a dog. Case report

Magyar Állatorvosok Lapja 131: pp. 601-609. (2009)

IF: 0.200

Kobori L, Nemeth T, Nagy P, Dallos G, Sotonyi P, Fehervari I, Nemes B, Gorog D, Patonai A, Monostory K, Doros A, Sarvary E, Fazakas J, Gerlei Z, Benko T, Piros L, Jaray J, De Jong KP
Experimental results and clinical impact of using autologous rectus fascia sheath for vascular replacement

Acta Veterinaria Hungarica 56:(3) pp. 411-420. (2008)

IF: 0.624

- Horvath A, Patonai A, Banhegyi D, Szlavik J, Balazs G, Gorog D, Werling K
[The first case of human alveolar Echinococcosis in Hungary]; A human Echinococcus multilocularis infectio első hazai esete.
Orvosi Hetilap 149:(17) pp. 795-799. (2008)
- Nemes B, Sárváry E, Kóbori L, Gerlei Zs, Patonai A, Perner F, Weszelits V, Járay J, Schaff Zs
Serum hepatitis C virus-ribonucleotide acid monitoring after liver transplantation
Digestive and Liver Disease 37:(1) pp. 68-69. (2005)
- Lengyel G, Kóbori L, Fehérvári I, Nemes B, Görög D, Patonai A, Sárváry E, Varga M, Hagymási K, Perner F, Fehér J, Tulassay Zs
Combined interferon-alpha-2b and ribavirin therapy in patients with recurring chronic hepatitis C (genotype 1) following liver transplantation in Hungary
Archives of Medical Science 1:(1) pp. 8-12. (2005)
- Lotz G, Simon S, Patonai A, Sótonyi P, Nemes B, Sergi C, Glasz T, Füle T, Nashan B, Schaff Zs
Detection of Chlamydia pneumoniae in liver transplant patients with chronic allograft rejection
Transplantation 77:(10) pp. 1522-1528. (2004)
IF: 3.568
- Lengyel G, Kóbori L, Fehérvári I, Nemes B, Görög D, Patonai A, Sárváry E, Varga M, Perner F, Fehér J
Kombinált interferon-alfa-2b és ribavirin terápia májtranszplantációt követő krónikus C-hepatitisben
Orvosi Hetilap 144:(48) pp. 2367-2370. (2003)
- Patonai A, Nemes B, Görög D, Kóbori L, Sótonyi P Jr, Fehérvári I, Weszelits V, Doros A, Dallos G, Schaff Z, Perner F
A hazai májtranszplantációk értékelése patológiai szempontból [Pathologic evaluation of orthotopic liver transplantation in Hungary]
Orvosi Hetilap 142:(9) pp. 435-441. (2001)

Patonai A., Csikós A, Deák G

Visceral aluminum deposition in chronic renal insufficiency - Light microscopy and X-ray microanalysis

Pathology & Oncology Research 2:(1-2) pp. 94-97. (1996)

Az értekezéssel összefüggő, lektorált folyóiratban megjelent, idézhető absztraktok:

Somoracz, A., Korompay, A., Patonai, A., Erdelyi-Belle, B., Toerzsoek, P., Lotz, G., Schaff, Z., Kiss, A.

Expression of tricellulin, a recently identified tight junction protein in normal liver and in primary liver cancers

Journal of Hepatology, Volume: 54, Mar, 2011, ISSN: 0168-8278

46th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL)

2011, Berlin, Germany

Somoracz A., Korompay A., Toerzsoek P., Patonai A. Erdelyi-Belle B., Lotz, G., Schaff, Z., Kiss, A.

Tricellulin expression correlates with overall survival in hepatocellular and cholangiocellular carcinomas

Journal of Hepatology Volume: 56 Apr.,2012. ISSN: 0168-8278 Accession Number:

47th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL)

Apr. 18-22, 2012, Barcelona, Spain

Az értekezéssel nem összefüggő, egyéb témában lektorált folyóiratban megjelent, idézhető absztraktok:

Z. Schaff, G.Lotz, A.Patonai, Á. Szepesi

Cyclin A and PCNA expression in chronic hepatitis C; J Hepatol, 26, 1997, p.144

Á. Gohér, K.Bach, L.Szalay, A.Patonai, Zs.Schaff, F.Perner, Zs.Tulassay

Liver transplantation in the therapy of metastases of an undifferentiated mesenchymal tumour

Z Gastroenterol,1996, Suppl.1, 5.

Schaff Zs, Jármay K, Szepesi Á, Szalay F, Patonai A., Nemes B, Lotz G, Lonovics J

Correlation of transforming growth factor beta-1, apoptosis and proliferation in chronic hepatitis; J Hepatol., 28 1998, Suppl. 1: 101

G.Lotz, P.Nagy, A.Patonai, A.Kiss, B.Nemes, F.Szalay, Zs.Schaff
TGFβ-1 and apoptosis in human hepatocellular carcinoma and focal nodular hyperplasia
J Hepatol, 28, 1998, Suppl.1 :175

G.Lotz, P.Nagy, A.Patonai, A.Kiss, B.Nemes, F.Szalay and Zs.Schaff
Hepatocyte proliferative index correlates with the risk of developing HCC in cirrhosis
J Hepatol, 28, 1998, Suppl. 1 co4/003

A.Patonai, B.Járay, J.Pápay, E.Székely, T.Winternitz, B.Nemes, A. Doros,
L.Berczi, Zs.Schaff
US controlled fine needle aspiration biopsy (FNAB) in diagnosis of cystic hepatic
echinococcosis; Acta Cytol. 1999 July-Aug. No.4.,vol.43, p.740

Zs.Schaff, Á.Szepesi, A.Patonai, K.Jármay
Detection of apoptosis and proliferation in chronic hepatitis c before and after interferon
treatment; J Hepatol. 30 1999, Suppl. 1:124

A.Patonai, G.Kovács, B.Eröss, B.Nemes, G.Lotz, Zs.Schaff, F.Perner
Acute rejection in liver transplantation; correlation of laboratory parameters with
histopathological findings; Z Gastroenterol, 1998, 5., 36, p: 440

G.Lotz, B.Nemes, A.Patonai, Zs.Simon, A.Mohos, Z.Schaff
Detection of HCV-RNA by RT-in situ PCR after liver transplantation
J Hepatol.30 1999, Suppl. 1:173

A.Patonai, B.Nemes, D.Görög, F.Perner, Zs.Schaff
Liver transplantation for benign and malignant tumours
J Hepatol. 30 1999, Supplement 1:182

Bögi K, Patonai A, Kiss A, Eröss B, Kovács G, Nemes B, Schaff Zs, Perner F
Acute rejection in liver transplantation, correlation of laboratory parameters with
histopathological findings; J. Hepatol. 30, 1999, Suppl. 1: 181

Schaff Z., Lotz G., Simon S., Patonai A., Sótonyi P., Nemes B., Georgopoulos A., Graninger W. Detection of chlamydia pneumoniae in liver transplant patients with chronic allograft rejection; J Hepatol, 34, Suppl. 1, April 2001, pp. 43 (1)

Schaff Zs, Lotz G, Simon S, Patonai A. Sótonyi P, Nemes B, Georgopoulos A, Graninger W Detection of Chlamydia pneumoniae in liver transplant patients with chronic allograft rejection Z. Gastroenterol. 2001 39: 5 May

Patonai A., Nemes B, Görög D, Kóbori L, Sótonyi P, Fehérvári I, Weszelits V, Doros A, Dallos G, Schaff Zs, Perner F.

Pathological evaluation of different complications of liver transplantation in Hungary - 5 years experience; Z. Gastroenterol. 2001 39: 5 May

Patonai A., Nemes B, Sárváry E, Kóbori L, Lengyel G, Weszelits V, Fehérvári I, Perner F, Schaff Zs.

Liver transplantation due to HCV - The problem of recurrence; J Hepatol 34 Suppl. 1, April 2001 pp.35

Gonda P, Patonai A., Szönyi L, Schaff Zs., Gyermekkori májbetegségek a biopsziás vizsgálatok tükrében, Z. Gastroenterol. 2001. 39: 5 Mai

Patonai A., Kóbori L, Tóth Á, Nagy K, Kiss A, Schaff Zs.; Fulminant visceral Kaposi's sarcoma after orthotopic liver transplantation, Pathologica 94: 82, 2002

Gonda P, Patonai A., Szönyi L, Kiss A, Schaff Zs.; Childhood liver biopsy; Pathologica 94: 80, 2002

G.Lotz G, Patonai A., Simon S, Sergi C, Nashan B, Schaff Zs. ; Localization of Chlamydia pneumoniae by immuno-histochemistry and in situ PCR in chronic liver allograft rejection with obliterative arteriopathy; J Hepatol , 36 Supplement 1, 2002, pp. 40

Könyvfejezet:

Perner F., Petrányi Gy.; Szervátültetés. Schaff Zs., Patonai A., Nagy P.; A májtranszplantáció patológiája. Medicina Könyvkiadó Zrt., 2013

