

Daganatössejtek és claudinok szerepe a hepatocellularis carcinoma és áttéti májdaganatok kialakulásában

Doktori tézisek

Dr. Holczbauer Ágnes

Semmelweis Egyetem
Patológiai Tudományok Doktori Iskola



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

Hivatalos bírálók:

Dr. Papp Veronika, Ph.D., egyetemi adjunktus

Dr. Nacsa János, Ph.D., kutatási és fejlesztési igazgató

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Sági Zoltán, D.Sc., egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Hagymási Krisztina, Ph.D., egyetemi adjunktus

Dr. Simon Károly, Ph.D., patológus szakorvos

Budapest
2019

1. BEVEZETÉS

A primer májrák világviszonylatban a hatodik leggyakoribb daganatfélése, több mint 850.000 új megbetegedést regisztrálnak évente. Felnőttekben leggyakoribb primer májrák a hepatocellularis carcinoma (HCC). A HCC fenotípusos és genetikai szinten is rendkívül heterogén daganatfélése, kifejezetten rossz prognózis jellemzi. A HCC kialakulása lassú, többlépcsős folyamat, melynek során a celluláris proto-onkogénekben és tumor szupresszor génekben bekövetkező genetikai és epigenetikai változások a májsejtek fenotípusának megváltozását eredményezik. Bár a HCC heterogenitásának oka még nem tisztázott, számos daganat esetében kimutatták, hogy ugyanazok a genetikai elváltozások a kiinduló sejtek differenciáltsági fokától függően eltérő fenotípust eredményezhetnek. Áttéti daganatok sokkal gyakrabban fordulnak elő a májban, mint primer daganatok, a rosszindulatú májdaganatok mintegy 95%-át teszik ki. A májáttétek kialakulása rossz prognózist jelent, mivel az áttét növekedése során a máj működésének fokozatos gátlásával májelégtelenséget okoz. Noha a colorectalis és a pancreas carcinoma májba történő áttétképzése igen gyakori, a májáttétek kialakulásának összetett folyamata részleteiben még nem ismert. Különösen rosszul differenciált daganatok esetében a HCC elkülönítése a colorectalis és a pancreas carcinoma májáttétjeitől nehézkes. Rutin hisztopatológiai vizsgálatok elvégzésén kívül ilyen esetekben gyakran immunhisztokémiai vizsgálatok elvégzése is szükséges.

A tumor heterogenitás daganatössejt modellje szerint a daganatok hierarchikus szerveződésűek. A hierarchia csúcsán állnak az önmegújító és differenciálódási képességgel rendelkező daganatössejtek, alattuk pedig a belőlük származó, heterogén daganatsejt populáció található. Sejtfelszíni markerek és funkcionális esszék alapján elsőként akut myeloid leukémiában, majd számos szolid tumorban, például HCC-ben is igazolták daganatössejtek létezését. A daganatössejtek nemcsak a daganatképződésért és invazív növekedésért felelősek, de az áttétképződésben és a terápiarezisztencia kialakulásában is kulcsfontosságú szerepet játszanak.

A lezáró kapcsolat, más néven tight junction a legapikálisabban elhelyezkedő sejtkapcsoló struktúra, mely a sejt oldalán övszerűen körbefutva elválasztja a plazmamembrán apikális és bazolaterális doménjeit, és szemipermeábilis barriert képez a szomszédos epithel- és endothelsejtek között. A tight junction vázát az emberben jelenleg 26, egérben 27 ismert tagból álló claudin fehérjecsalád alkotja. A claudinok, főleg a claudin-1, -3, -4 és -7 megváltozott expresszióját számos daganatféleségben leírták, ennek ellenére a daganatok kialakulásában és progressziójában betöltött szerepükről viszonylag kevés ismeretünk van.

2. CÉLKITŰZÉS

- Daganatőssejtek kialakulásának vizsgálata a hepatocyta irányú differenciálódás különböző fokán álló normál sejtekből (bipotens hepatikus progenitor sejtekből, hepatocyta irányba elkötelezett hepatoblastokból és érett hepatocytákból) egerekben.
- A hepatocyta irányú sejtvonallal különböző sejtjeinek differenciáltsági foka és a sejtekből kiinduló májdaganatok fenotípusa közötti lehetséges kapcsolatok feltárása.
- Hasonló és a kiindulási sejtre specifikus génexpressziós mintázatok azonosítása a hepatocyta irányú sejtvonallal különböző sejtjeiből kiinduló májdaganatokban.
- A c-Myc proto-onkogén szerepének vizsgálata normál egér hepatocyták daganatőssejtté alakulásában.
- Claudin-1, -2, -3, -4 és -7 mRNS és fehérje expresszió vizsgálata humán HCC-ben, colorectalis adenocarcinoma májmetasztázisában (CRLM) és pancreas ductalis adenocarcinoma májmetasztázisában (PLM).

3. MÓDSZEREK

3.1 Primer egérszövetek izolálása és virális transzdukciója

Hepatitisz progenitor sejteket (HPC), hepatoblastokat (HB) és érett hepatocytákat (AH) izoláltam C57BL/6NCr, fluoreszcensen jelzett AH-kat B6.Cg-Gt(ROSA)26Sortm14(CAG-tdTomato)Hze/J egerekből. A HPC-ket először 0,1%-os 3,5-dietoxikarbonil-1,4-dihidrokollidin diétával aktiváltam, majd a máj nem parenchymalis sejtjeit módosított kétlépes kollagenáz perfúzióval izoláltam. Az EpCAM⁺ HPC-k elkülönítése fluoreszcencia aktivált sejtválogatás és sejtanalízis (FACS) módszerrel történt. Az E-cadherin⁺ HB-ket mágneses sejt-szeparálással nyertem ki egérembriók májából az egyedfejlődés tizenhat és feledik napján. Az AH-kat 3 hónapos hím egerek májából izoláltam kétlépes kollagenáz perfúzió és Percoll grádiens alkalmazásával. A primer sejteket mutáns H-Ras-luciferáz/EGFP és SV40LT-mCherry lentivirális vektorokkal transzdukáltam, majd a transzdukált sejteket 3 hétig tenyésztettem. Az EGFP⁺/SV40LT⁺ HPC-ket, HB-ket és AH-kat FACS módszerrel szeparáltam azonos kapuzási beállítás mellett a hasonló lentivírus kópiaszám és transzgén expresszió biztosítása érdekében. A szeparált sejteken *in vitro* és *in vivo* módszerekkel vizsgáltam a daganatossejtekre jellemző tulajdonságokat. Vizsgálataimat a National Institutes of Health (USA) irányelveinek megfelelően végeztem.

3.2 Sejttranszplantációs állatkísérletek

Kísérleteimhez 6-9 hetes hím immunhiányos (NOD/SCID) egereket használtam fel. Az *in vivo* klonogén esszéhez 10^1 , 10^2 és 10^3 H-Ras-EGFP⁺/SV40LT-mCherry⁺ HPC-t, HB-t és AH-t injektáltam az állatok bőre alá (4 egér/sejttípus). A stabil c-Myc csendesítés tumornövekedésre gyakorolt hatásának vizsgálatához 10^2 EGFP⁺/mCherry⁺, c-Myc rövid hajtú RNS-t (shRNA) vagy kontroll shRNS-t expresszáló AH-t transzplantáltam szubkután (5 egér/sejttípus). Az orthotopikus növekedés vizsgálatához $1,5 \times 10^5$ H-Ras-EGFP⁺/SV40LT-mCherry⁺ HPC-t, HB-t és AH-t ültettem az egerek májának bal lebenyébe (5 egér/sejttípus). A primer tumorokat *in vivo*, a metasztázisokat *ex vivo* biolumineszcens képalkotással detektáltam. A kifejlődött májtumorból FACS módszerrel H-Ras-EGFP⁺/SV40LT-mCherry⁺ tumorsejteket izoláltam, melyekből sejttípusonként 4-4 sejtvonalat hoztam létre. A sejtvonalakon *in vitro* módszerekkel vizsgáltam a daganatössejtekre jellemző tulajdonságokat. Egyetlen sejtből származó májtumorokat immunhisztokémiai vizsgálatokhoz, western blothoz, microarray analízishez és kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakcióhoz (qRT-PCR) 10^5 EGFP⁺/mCherry⁺ HPC, HB és AH lépbe injektálása révén állítottam elő.

3.3 Áramlási citometria és szferoidképződés

A ploiditást, a szegély populáció sejtek gyakoriságát, valamint a daganatössejt, hepatocytá és progenitor sejt/epeúti markerek expresszióját áramlási citometriával vizsgáltam. A szferoidképződés vizsgálá-

latához 1% metil-cellulózt tartalmazó szérummentes táptalajban 96 lyukú szuszpenziós szövettenyésztő tálcákra oltottam le 500 sejtet lyukanként. A tumorszferoidok sejtjeit 6 héten át hetente egyszer diszpergáltam, és a sejteket a fentebb leírt módszer szerint átoltottam.

3.4 Szövetminták

A claudin expressziós vizsgálatokat a Semmelweis Egyetem II. számú Patológiai Intézetének archívumából származó, sebészileg rezezált, formalin-fixált, paraffinba ágyazott (FFPE) mintákon végeztem a Semmelweis Egyetem Regionális Etikai Bizottságának engedélyével (#137/2008). Összesen 20 HCC, 20 CRLM és 15 PLM mintát vizsgáltam a tumor környéki májszövettel együtt, kontrollként 5 normál májmintát használtam. A betegek medián életkora és a nő:férfi arány a következők szerint alakult: 65 év, 7:13 (HCC); 65 év, 7:13 (CRLM) és 58 év, 9:6 (PLM). Az egyes szövettani típusok arányának szemikvantitatív meghatározását és a hepatocytá, progenitor sejt/epetíti és mesenchymalis markerek immunhisztokémiai vizsgálatát FFPE egér májtumorokon (14 HPC-, 28 HB- és 28 AH-eredetű) végeztem. Western blothoz (2 AH-eredetű), microarray analízishez (10 HPC-, 20 HB- és 20 AH-eredetű) és qRT-PCR-hez (6 minta/tumorcsoport) gyorsfagyasztott tumormintákat használtam.

3.5 Immunfestések, morfometria és western blot

A primer HB tenyészet tisztaságát E-cadherin, albumin, alfa-fetoprotein (AFP) és cytokeratin 18 immunfluoreszcens vizsgálatával ellenőriztem. A H-Ras, SV40LT, hepatocytá nukleáris faktor 4 alfa

(HNF4A), cytokeratin 19, laminin, vimentin és A6 immunfestéssel történő kimutatását egér májtumor metszeteken manuális eljárással végeztem. A claudin-1, -2, -3, -4 és -7 immunhisztokémiai detektálása humán mintákon Ventana ES automata immunfestő készülék segítségével történt. A reakciók megjelenítéséhez 3,3'-diaminobenzidin kromogént használtam. A claudin immunreakciók kvantitatív értékelését Leica Qwin V3 morfometriai szoftverrel végeztem. Az egér májdaganatokban az egyes szövettani típusok (sarcomatoid, cholangiocarcinoma, HCC) által elfoglalt területek százalékos arányát szemikvantitatív módon értékeltük hematoxilín-eozinnal festett metszeteken. A H-Ras, SV40LT és c-Myc fehérje expresszióját western blot módszerrel vizsgáltam, az immunreakciók detektálást kemilumineszcens technikával végeztem.

3.6 Génexpressziós vizsgálatok

A humán FFPE mintákból High Pure RNA Paraffin Kit, az egér májtumorokból és frissen izolált egér HPC-kból, HB-kból és AH-kból (7 minta/sejttípus) TRIzol és RNeasy Mini Kit segítségével totál RNS-t izoláltam. A claudin-1, -2, -3, -4, -7 (humán minták), az AFP és az albumin (primer HPC-k, HB-k és AH-k) relatív mRNS expressziójának mérését és a microarray eredmények validását qRT-PCR módszerrel végeztem. A célgének mRNS expressziós szintjét β -aktin vagy gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz gén expressziójához normalizáltam. Az egér hepatocytá irányú sejtvonal sejtjeiből származó májdaganatok microarray alapú transzkripciós analíziséhez a daganatokból és normál kindulási sejtjeikből (4 minta/sejttípus) izolált totál RNS (400

ng/minta) lineáris amplifikációját Illumina TotalPrep RNA Amplification Kit segítségével végeztem. A biotinilált komplementer RNS-t (750 ng/minta) MouseRef-8 v2.0 Expression BeadChipekre hibridizáltam.

3.7 Statisztikai elemzés

Az adatok normalitását Lilliefors és Pearson teszt segítségével vizsgáltam. A transzformált és normál máj eredetű sejtek sferoidformáló képességet Poisson-regresszióval hasonlítottam össze. A tumoriniciáló sejtek gyakoriságát Poisson eloszlás, a hepatikus őssejtek (HSC) általi tumoriniciáció valószínűségét binomiális eloszlás alapján határoztam meg. Az egyes szövettani típusok százalékos arányát az egér májtumorokban varianciaanalízissel és Tukey post hoc teszttel hasonlítottam össze. A microarray adatok statisztikai elemzését bioekvivalencia teszttel, bootstrap t-teszttel, hierarchikus klaszterezéssel és géncsoport dúsulás vizsgálattal végeztem. A microarray eredmények qRT-PCR-rel történő validálása során Mann-Whitney U tesztet használtam. A c-Myc csendesítés hatását Student-féle t-próbával számítottam ki. A claudinok fehérje és mRNS expressziójának összevetéséhez Kruskal-Wallis tesztet és post hoc analízist használtam.

4. EREDMÉNYEK

4.1 Az egér hepatocyta irányú sejtvonallal különböző sejtjeinek szerepe a daganatossejtek és a HCC-re jellemző heterogenitás kialakulásában

4.1.1 A H-Ras/SV40LT átprogramozza az egér hepatocyta irányú sejtvonallal sejtjeit daganatossejttekké

A frissen izolált primer sejt kultúrák nagy tisztaságot mutattak. A HB-k több mint 99%-a mutatott E-cadherin, AFP, albumin és cytoke-ratin 18 immunpozitivitást. AFP mRNS expressziót csak a HB-kben tudtunk detektálni, míg az AH-kban mértük a legmagasabb albumin mRNS szintet. A lentivirális transzdukció után tíz nappal a HPC-k és a HB-k 89%-ában, valamint az AH-k 96%-ában mértem kettős H-Ras-EGFP és SV40LT-mCherry pozitivitást áramlási citometria módszerrel. Western blottal igazoltam, hogy az izolált kettős pozitív HPC-k, HB-k és AH-k a H-Ras és SV40LT fehérjét hasonló szinten expre-szálják. *In vitro* daganatossejt esszé eredményei alapján H-Ras és SV40LT hatására az egér hepatocyta irányú sejtvonallal mindhárom vizsgált sejtalakjában malignus transzformáció ment végbe, és a sejtek daganatossejtre jellemző tulajdonságokat vettek fel: megjelent vagy nőtt a szegély populáció, CD133 expresszió és a szferoidformáló ké-pesség. *In vivo* klonogén esszével kimutattam, hogy a tumoriniciáló sejtek aránya szignifikánsan magasabb a H-Ras⁺/SV40LT⁺ HPC-k (1/7 sejt, 95% konfidencia intervallum [CI]: 1/3 – 1/17), mint a HB-k (1/26, 95% CI: 1/11 – 1/62, p = 0,04) és AH-k (1/42, 95% CI: 1/19 –

1/91, $p = 0,003$) között. A H-Ras⁺/SV40LT⁺ HPC-kból, HB-kból és AH-kból gyors növekedésű daganatok indultak ki, melyek áttéteket adtak a májba, tüdőbe és agyba mind szubkután, mind orthotopikus transzplantációs kísérletekben. A kiindulási sejtípustól függetlenül a májtumor eredetű sejtvonalak hepatikus progenitor/epeúti sejtekre (cytokeratin 19, EpCAM, A6) és daganatőssejtekre (CD133, CD44, CD29, CD49f, CD90, Sca-1) jellemző markereket expresszáltak, szégyel populáció sejteket tartalmaztak, és 6 passzázs után is nagy százalékban mutattak önmegújító képességet.

Többféle módon igazoltam, hogy a H-Ras és SV40LT valóban a primer AH-kat, és nem a rendkívül kis számban előforduló HSC-ket transzformálta. Először kisszámú (10^3), H-Ras/SV40LT-vel transzdukált primer AH-t injektáltam egerek lépébe a transzdukciónak után 1 nappal. A kialakult májtumorok száma (2-3/egér) és a primer AH tenyésztésben előforduló HSC-k becsült frekvenciája (≤ 2 HSC/ 10^6 érett hepatocytá) alapján a transzdukált HSC-k általi tumoriniciáció valószínűsége elhanyagolható ($\leq 2,1 \times 10^{-6}$). Ezt követően fluoreszcensen jelzett (tdTomato), H-Ras/SV40LT-vel transzdukált AH-kat injektáltam egerek lépébe. *Ex vivo* biolumineszcenciás és fluoreszcenciás vizsgálattal a kialakult májtumorokban a luciferáz által katalizált biolumineszcencia és a tdTomato által kibocsátott fluoreszcencia teljes átfedést mutatott, igazolva, hogy a tumorok AH-kból indultak ki. Végezetül megvizsgáltam a H-Ras⁺/SV40LT⁺ AH-kból és HPC-kból kiinduló májtumorok sejtjeinek ploeditását és azt tapasztaltam, hogy az AH-kból származó tumorsejtek normál AH-kra jellemző polyplo-

iditást mutatnak. Ezzel szemben a HPC-kből származó tumorsejtek túlnyomórészt diploidok voltak, hasonlóan a normál HPC-khez.

4.1.2 A H-Ras/SV40LT különböző szövettani típusú májdaganatokat indukál

A H-Ras⁺/SV40LT⁺ HPC-kből, HB-kből és AH-kből kiinduló májdaganatok szövettanilag közepesen vagy rosszul differenciáltak bizonyultak és humán primer májrákra hasonlítottak. Az egyes szövettani típusok átlagos gyakorisága a daganat kiindulási sejtjének differenciáltsági fokától függően változott. A HPC-kből származó daganatokra elsősorban az orsó alakú daganatsejtekből álló sarcomatoid megjelenési forma volt jellemző. A HB-kből kiinduló daganatok megjelenésükben főként humán cholangiocarcinomához hasonlítottak, glanduláris és tubuláris struktúrákba rendezett cuboidális-columnaris daganatsejtekből álltak. Az AH-kből származó tumorokat elsősorban humán HCC-re emlékeztető, trabekulákba rendezett polygonalis, hepatocytá-szerű daganatsejtek jellemezték. Az összes daganatsejt HNF4A, cytokeratin 19 és A6 immunpozitivitást mutatott. A sarcomatoid és HCC szövettani típus tumorsejteiben erős laminin és vimentin festődés volt még megfigyelhető.

4.1.3 A HPC-kből, HB-kből és AH-kből kiinduló májdaganatok microarray alapú transzkripció analízise

Bioekvivalencia teszt alapján a különböző daganatcsoportok gén-expressziós mintázata jobban hasonlított egymásra, mint a kiindulási sejtjére. A HPC-kből származó tumorok mutatták a legnagyobb

(71%), az AH-kból kiinduló tumorok a legkisebb (53%) hasonlóságot a normál sejtekhez. Ezzel összhangban az AH-kból kiinduló daganatokban magasabb volt a kiindulási sejtekhez képest eltérően expresszálódó gének száma (2826), mint a HB-kból (574 gén) és HPC-kból (906 gén) származó daganatokban, ami arra utal, hogy az AH-k átprogramozása daganatossejtté a HB-khez és HPC-khez képest lényegesen nagyobb mértékű genomiális változást igényel. A hasonlóan eltérően expresszálódó 590 gén jelentős részét epithelialis-mesenchymalis tranzícióval kapcsolatos gének tették ki, amit qRT-PCR-rel is megerősítettem. A HPC-kból, HB-kból és AH-kból kiinduló tumorokat az 590 közös gén alapján végzett hierarchikus klaszterelemzés a kiindulási sejtjük szerint csoportosította, arra utalva, hogy a hepatocytá irányú sejt vonal sejtjeiben ugyanazon onkogének hatására különböző sejt-specifikus transzkripciós programok aktiválódnak. A molekuláris hálózatok elemzése révén az AH-kból kiinduló tumorokban több transzkripciós faktort azonosítottam (pl. *E2f1*, *Klf6*, *Myc*), mint a HB-kból (pl. *Sp1*, *Foxo1*) és HPC-kból (pl. *Cebpb*, *Esrrb*) származókban. Kiemelendő, hogy az AH-kból kiinduló daganatokban a *Myc* mRNS expressziója a normál AH-khoz képest 21-szeres emelkedést mutatott, míg a HB-kból és HPC-kból kiinduló tumorokban a kiindulási sejtekhez képest alacsonyabb szinten expresszálódott. Géncsoport dúsulás vizsgálat során egy 229 c-Myc E-box célgénből álló génkészlet csak az AH-kból származó májdaganatokban mutatott szignifikáns dúsulást ($p < 0.0001$).

4.1.4 A *Myc* szükséges az érett hepatocyták H-Ras/SV40LT-mediált malignus transzformációjához

A *Myc* gén tartós csendesítése a H-Ras⁺/SV40LT⁺ AH-kban a CD133⁺ sejtek (1,5% versus 21,4% a kontroll sejtekben) és a szegély populáció sejtek (0,07% versus 0,46% a kontroll sejtekben) gyakoriságának, valamint a szferoidformáló képesség és a szferoidok méretének szignifikáns csökkenését eredményezte. A c-*Myc* shRNS-t expresszáló AH-kból kiinduló daganatok szubkután növekedése NOD/SCID egerekben jelentősen lelassult a kontroll shRNS-t expresszáló AH-kból kiinduló tumorokhoz képest.

4.2 Eltérő claudin expressziós profil HCC-ben, CRLM-ben és PLM-ben

Immunhisztokémiával a claudin-1 mérsékelt apikális membránfestődést mutatott HCC-ben, míg a membránfestődés a tumorsejtek teljes területén jelentkezett CRLM-ben és PLM-ben. Normál és tumor környéki májban az epeutak erős, a hepatocyták gyenge apikális pozitívítást mutattak. Az immunreakciók morfometriai elemzése alapján a claudin-1 CRLM-ben mutatta a legmagasabb expressziót. A claudin-2 citoplazmatikus, granuláris immunreakciót adott mind tumoros, mind normál sejtekben. Morfometriai vizsgálattal szignifikánsan alacsonyabb expressziót mértem mindhárom tumorcsoportban a környező, nem tumoros májszövethez képest. A claudin-3 membránpozitívítás CRLM-ben szignifikánsan magasabbnak mutatkozott a HCC-hez és a PLM-hez képest. Normál és tumor környéki májban a hepatocytá-

kat gyenge, elszórt claudin-3 membránpozitivitás jellemezte, míg az epeúti sejtek erősebben festődtek. Claudin-4 esetében erős, membránókus reakció volt megfigyelhető a CRLM és a PLM minták tumorsejtjeiben és normál epeúti sejtekben, ezzel szemben a HCC sejtek és a normál hepatocyták negatívak voltak. A claudin-7 expresszió szignifikánsan magasabb volt CRLM-ben, mint a többi csoportban. A hepatocyták gyenge membránfestődést, az epeúti sejtek erős claudin-7 pozitivitást mutattak normál és tumor környéki májban.

A claudin-2, -3, -4 és -7 mRNS expresszió jól korrelált a fehérje expresszióval, ami arra utal, hogy ezen claudin fehérjék előállításának szabályozása főleg transzkripciós szinten történik. Az immunhisztokémiai vizsgálatok eredményével ellentétben szignifikánsan alacsonyabb claudin-1 mRNS expressziót mértem CRLM-ben a HCC-hez, valamint a normál és tumor környéki májhoz képest.

5. KÖVETKEZTETÉSEK

1. Elsőként igazoltam, hogy egerekben a hepatocyta irányú sejtvonaltól bármely sejtalakja átveszhet malignus transzformációt és felvehet daganatossejt tulajdonságokat, de a máj progenitor sejtek fogékonyabbak a malignus transzformációra, mint a hepatocyta fejlődési vonal magasabb differenciáltsági fokú sejtjei.
2. A hepatocyta irányú sejtvonaltól sejtalakjainak malignus transzformációja különböző szövettani képet mutató (sarcomatoid, cholangiocarcinoma és HCC), humán primer májrákra emlékeztető májdaganatok kialakulásához vezethet; az egyes szövettani típusok átlagos gyakorisága a daganat kiindulási sejtjétől függően változik.
3. Közös és sejt-specifikus jelátviteli utak egyaránt szerepet játszanak a hepatocyta irányú sejtvonaltól különböző sejtjeinek malignus transzformációjában.
4. A c-Myc fokozott expressziója szükséges az érett hepatocyták daganatossejtté válásához.
5. A hepatocelluláris carcinoma, a colorectalis carcinoma májmetasztázisai és a pancreas ductalis carcinoma májmetasztázisai eltérő claudin expressziós mintázatot mutatnak.

6. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

Megjelent közlemények összesített impakt faktora (IF): 85,654

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények (IF: 16,329):

Holczbauer Á, Factor VM, Andersen JB, Marquardt JU, Kleiner D, Raggi C, Kitade M, Seo D, Akita H, Durkin M, Thorgeirsson SS. (2013) Modeling pathogenesis of primary liver cancer in lineage-specific mouse cell types. *Gastroenterology*, 145: 221-231. **IF: 13,926**

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: 294-305. **IF: 2,403** (*megosztott első szerzők)

Az értekezés témájától független közlemények (IF: 69,325):

Vermulst M, Denney AS, Lang MJ, Hung CW, Moore S, Moseley MA, Thompson JW, Madden V, Gauer J, Wolfe KJ, Summers DW, Schleit J, Sutphin GL, Haroon S, **Holczbauer A**, Caine J, Jorgenson J, Cyr D, Kaerberlein M, Strathern JN, Duncan MC, Erie DA. (2015) Transcription errors induce proteotoxic stress and shorten cellular lifespan. *Nat Commun*, 6: 8065. **IF: 11,329**

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: 493-502. **IF: 1,855** (*megosztott első szerzők)

Raggi C, Factor VM, Seo D, **Holczbauer Á**, Gillen MC, Marquardt JU, Andersen JB, Durkin M, Thorgeirsson SS. (2014) Epigenetic reprogramming modulates malignant properties of human liver cancer. *Hepatology*, 59: 2251-2262. **IF: 11,055**

Kitade M, Factor VM, Andersen JB, Tomokuni A, Kaji K, Akita H, **Holczbauer Á**, Seo D, Marquardt JU, Conner EA, Lee SB, Lee YH, Thorgeirsson SS. (2013) Specific fate decisions in adult hepatic progenitor cells driven by MET and EGFR signaling. *Genes Dev*, 27: 1706-1717. **IF: 12,639**

Lee SB, Seo D, Choi D, Park KY, **Holczbauer Á**, Marquardt JU, Conner EA, Factor VM, Thorgeirsson SS. (2012) Contribution of hepatic lineage stage-specific donor memory to the differential potential of induced mouse pluripotent stem cells. *Stem Cells*, 30: 997-1007. **IF: 7,701**

Marquardt JU, Raggi C, Andersen JB, Seo D, Avital I, Geller D, Lee YH, Kitade M, **Holczbauer Á**, Gillen MC, Conner EA, Factor VM, Thorgeirsson SS. (2011) Human hepatic cancer stem cells are charac-

terized by common stemness traits and diverse oncogenic pathways. *Hepatology*, 54: 1031-1042. **IF: 11,665**

Nemes B, Doros A, **Holczbauer Á**, Sárváry E, Nagy P, Lengyel G, Kiss A, Schaff Z. (2009) Expression pattern of molecular chaperones after liver transplantation in hepatitis C positive recipients. Relation to serum HCV-RNA titers. *Interv Med Appl Sci*, 1: 35-40. **IF: -**

Szabó E, Korpos E, Batmunkh E, Lotz G, **Holczbauer Á**, Kovalszky I, Deák F, Kiss I, Schaff Z, Kiss A. (2008) Expression of matrilin-2 in liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Pathol Oncol Res*, 14: 15-22. **IF: 1,260**

Batmunkh E, Tátrai P, Szabó E, Lódi C, **Holczbauer Á**, Páska C, Kupcsulik P, Kiss A, Schaff Z, Kovalszky I. (2007) Comparison of the expression of agrin, a basement membrane heparan sulfate proteoglycan, in cholangiocarcinoma and hepatocellular carcinoma. *Hum Pathol*, 38: 1508-1515. **IF: 3,034**

Halász J*, **Holczbauer Á***, Páska C, Kovács M, Benyó G, Verebély T, Schaff Z, Kiss A. (2006) Claudin-1 and claudin-2 differentiate fetal and embryonal components in human hepatoblastoma. *Hum Pathol*, 37: 555-561. **IF: 2,810** (*megosztott első szerzők)

Lódi C, Szabó E, **Holczbauer Á**, Batmunkh E, Szijártó A, Kupcsulik P, Kovalszky I, Paku S, Illyés G, Kiss A, Schaff Z. (2006) Claudin-4 differentiates biliary tract cancers from hepatocellular carcinomas. *Mod Pathol*, 19: 460-469. **IF: 3,753**

Gyórfy H*, **Holczbauer Á***, Nagy P, Szabó Z, Kupcsulik P, Páska C, Papp J, Schaff Z, Kiss A. (2005) Claudin expression in Barrett's esophagus and adenocarcinoma. *Virchows Arch*, 447: 961-968. **IF: 2,224** (*megosztott első szerzők)