Tight junction proteinek és jelátviteli utak molekuláris patológiai vizsgálata fibrolamellaris carcinomában

Doktori értekezés

Dr. Patonai Attila

Semmelweis Egyetem Patológiai Tudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Schaff Zsuzsa egyetemi tanár, az orvostudományok doktora, az MTA levelező tagja

Hivatalos bírálók:Dr. Tornai István egyetemi docens, CSc, Ph.D.Dr. Kovács Gábor egyetemi docens, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke:	Dr. Keller Éva egyetemi tanár, Ph.D.
Szigorlati bizottság tagjai:	Dr. Herszényi László egyetemi docens,
	az MTA doktora
	Dr. Simon Károly osztályvezető főorvos, Ph.D.

Budapest

2013

TARTALOMJEGYZÉK		
RÖVI	DÍTÉSEK	5
1.BEV	VEZETÉS	9
1.1 A	fibrolamellaris carcinoma általános jellemzői	10
1.2. A	fibrolamellaris hepatocellularis carcinoma (FLC) jellemzői	10
1.2.1	A FLC előfordulása és etiológiája	10
1.2.2	A FLC klinikai jellemzői	12
1.2.3	A FLC klinikai diagnosztikája	14
	1.2.3.1 Klinikai laboratóriumi diagnosztika	15
	1.2.3.2 Radiológiai diagnosztika	16
1.2.4	A FLC makroszkópos megjelenése	17
1.2.5	A FLC citológiai jellegetességei és kórszövettana	17
1.2.6	Molekuláris patológiai eltérések FLC-ban	20
1.2.7	A FLC differenciál diagnosztikai problémái, kevert tumorok	22
1.2.8	A FLC kezelése és prognosztikai faktorai	23
	1.2.8.1 Sebészi rezekció és májtranszplantáció	23
	1.2.8.2 Kemoterápia, citosztatikus kezelés, intervenciós lehetőségek	23
	1.2.8.3 A FLC prognózisáról	24
1. 3 S	ejtkapcsoló struktúrák és tight junction (TJ) proteinek	25
1.3.1	A sejtkapcsoló struktúrák felépítése	25
1.3.2	A TJ proteinek, claudinok	28
1.3.3	A TJ assszociált Marvel proteinek (TAMP)	33
1.4. T	irozin-kináz jelátviteli folyamatok, EGFR, KRAS és Wnt/β-catenin	
szigná	áltranszdukciós útvonalak	35
1.4.1	A humán protein kinázok	35
1.4.2	A tirozin kinázok (TK)	36
1.4.3	EGF, EGFR és jelentőségük a daganatok kialakulásában	37
1.4.4	KRAS és EGFR gén mutációk, szerepük a daganatok kialakulásában	39

1.4.5	A β-catenin és Wnt/β-catenin jelátviteli út	40
1.4.6	A syndecan-1 (CD138)	41
2. CÉ	LKITŰZÉSEK	42
3. AN	YAG ÉS MÓDSZEREK	43
3.1	Betegek	43
3.2	Szövettani vizsgálatok	45
3.3	Immunhisztokémiai vizsgálatok	45
3.4	Immunfluoreszcens vizsgálatok	47
3.5	Morfometriai vizsgálatok	48
3.6.	Statisztikai módszerek	49
3.7	Quantitativ Polymerase láncreakció (qPCR, RT-PCR)	49
3.8	A KRAS mutáció vizsgálata	53
3.9	Az EGFR mutáció vizsgálata	53
3.10	Direkt szekvenálás	53
4. ER	EDMÉNYEK	55
4.1	A FLC makroszkópos képe	55
4.2	A FLC kórszövettani jellegzetességei	56
4.3.	Immunhisztokémiai, immunfluoreszcens vizsgálatok és morfometria	57
4.4	mRNS génexpressziós vizsgálatok	69
4.5	EGFR és KRAS mutáció analízis	70
5. MF	CGBESZÉLÉS	72
6. KÖ	VETKEZTETÉSEK	77
7. ÖS	SZEFOGLALÁS	78

8. ABSTRACT	79
9. IRODALMI HIVATKOZÁSOK	80
10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK	100
11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	103
12. FÜGGELÉK, MELLÉKLET	105

RÖVIDÍTÉSEK

AF-6	nectin és CAM kötő protein = afadin	
AFP	alpha- fetoprotein	
AJ	adherens junction	
anti-HBs	hepatitisB surface antigén elleni antitest	
anti-HBc	hepatits B core antigén elleni antitest	
BLC-PMG	band-like calcification with simplified gyration	
	and polymicrogyria	
BSA	bovine serum albumine	
bTJ	bicellular tight junction	
CAM	cell adhesion molecule	
CCC	cholangiocellularis carcinoma	
CCK-BR	cholecystokinin B receptor = gastrin receptor	
CD	cluster of differentiation	
CEA	carcino-embrionalis antigen	
cHCC	"konvencionális" = nem fibrolamellaris típusú	
	HCC	
CK	citokeratin	
CLDN	claudin	
CMV	citomegalovírus	
CPET	Clostridium perfringens enterotoxin	
СТ	computer tomography	
DAB	3,3-diamino-benzidin	
DAPI	4,6-diamidino-2-fenilindol	
DCP	Des-γ-carboxy prothrombin	
DEPC	dietil-piro-karbonát	
DFNB49	autosomalis recesszív süketség – B49	
DNS	dezoxiribonukleinsav	
EBV	Epstein-Barr vírus	
EGF	epidermal growth factor = epidermális növekedési	
	faktor	

EGFR	epidermal growth factor receptor = epidermális
	növekedési faktor receptora = ErbB-1; HER1
FDG	2-[fluorin-18]fluoro-2-deoxi-d-glukóz
FFPE	formalin fixed, paraffin embedded = formalinban
	fixált, paraffinba ágyazott
FHIT	Fragile Histidine Triade
FLC	fibrolamellaris hepatocellularis carcinoma2
FNAB	fine needle aspiration biopsy = vékonytű aspirációs
	citológiai vizsgálat
FNH	focalis nodularis hyperplasia
FU	fluoro-uracil
GAPDH	gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz
GJ	gap junction
GPC3	glypicane-3
HBsAg	hepatitis B surface antigen
HBV	hepatitis B vírus
HBVX	hepatitis B vírus X gen
НСА	hepatocellularis adenoma
НСС	hepatocellularis carcinoma
HCV	hepatitis C vírus
HDMEC	Human Dermal Microvascular Endothelial Cells
HE	hematoxylin-eosin
HER2	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 =
	Neu, ErbB-2, CD340
Hi-Di [™] Formamide	highly deionized formamide
HRP	horse radish peroxidase
HSA	hepatocyta specifikus antigén = HepPar1
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
IHC	immunohisztokémia
KRAS	V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene
	homolog

MARVEL	MAL and related proteins for vesicle trafficking
	and membrane link
MDCK	Madin-Darby Canine Kidney = egy felnőtt nőstény
	Cocker spánielből származó vese epithel sejtvonal
MMP-2	mátrix metalloproteináz-2
MRI	magnetic resonance imaging
NASH	non-alcoholic steatohepatitis = nem alkoholos
	steatohepatitis
NAFLD	non-alcoholic fatty liver disease = nem alkoholos
	zsírmáj
NCAM	Neural Cell Adhesion Molecule = CD56
OLTx	orthotopikus májátültetés = orthotopic
	transplantation of the liver
PBS	phosphate puffer saline
PDZ	post synaptic density protein = PSD95
PET-CT	pozitron emission computer tomography
PKCdelta	c-ABL protein kináz delta
РКЕ	protein kináz
PrAB	primer antibody = elsődleges antitest
RT	real time = valós idejű
ScAB	secondary antibody = másodlagos antitest
SIOPEL	International Childhood Liver Tumour Strategy
	Group
STE	homologs of yeast sterile 7, sterile 11 and
	sterile 20 kinase
SYN-1	Syndecan-1 = $CD138$
TAMPs	TJ associated Marvel proteins
TCC	transitional cell carcinoma
TCI	transzkobalamin-I
TE Buffer	TRIS-EDTA puffer
TEM	transzmissziós elektron mikroszkóp
TER	transepithelial electric resistance

TGF-α	transforming growth factor alfa
TJ	tight junction
ТК	tirozin kináz
TKI	tirozin kináz inhibitor
TORCH	Toxoplasmosis - Other infections - CMV- Herpes
	simplex2
TRIC	tricellulin
TRIS	TBE = Tromethamine puffer
tTJ	tricellular tight junction
UH	ultrahang
VCI	vena cava inferior
ZO	zonula occludens

1. BEVEZETÉS

A májrák a daganatos halálozásban (mortalitás) világviszonylatban a férfiak között a harmadik, nőknél az ötödik helyen szerepel. [1]

A WHO felmérése szerint 2008-ban 100 ezer főre 748 új májrák eset fordult elő, mely esetek közül 522 férfi és 225 nő volt, akik közül 100 ezer főre számítva 695 beteg halálozott el. [2]

Magyarországon a WHO 2004 update alapján a kor standardizált 100 ezer emberre jutó májrák okozta halálozás 5,8 fő, bár ezen adat pontossága vitatható. [3]

A hepatocellularis carcinoma (HCC), a primer malignus májtumorok leggyakoribb típusa, mely szövettanilag jól elkülöníthető altípusokra osztható. Etiológiailag a HCC hátterében 70-90%-ban krónikus májbetegség, elsősorban májcirrózis áll, a fennmaradó 10-30%-ban a HCC nem társul cirrózissal. [4]

A HCC kialakulásában szerepet játszó tényezők között a

- krónikus hepatotrop vírusinfekciók, így a hepatitis B vírus (HBV) és hepatitis C vírus (HCV) fertőzés,
- a krónikus alkoholfogyasztás,
- aflatoxin-B1,
- NASH/NAFLD és zsírmáj,
- obesitas, II.típusú diabetes mellitus,
- a primer biliaris cirrózis (PBC),
- autoimmun hepatitis (AIH),
- hemochromatosis,
- Wilson-kór és egyéb örökletes májbetegségek,
- foglalkozási ártalmak és több veleszületett anyagcserezavar szerepel. [5]

Bizonyos faktorok képesek csökkenteni a májrák kialakulásának esélyét. Ilyen például a szervezet antioxidáns kapacitása, a szérum retinol (a HCC rizikó 14x-es csökkenése) vagy a béta karotin magasabb szintje (a HCC rizikó 4-8x-os csökkenése), a kávéfogyasztás és a szérum lipid regulátorok közül a statin készítmények szedése. [5]

1.1. A fibrolamellaris carcinoma általános jellemzői

A fibrolamellaris hepatocellularis carcinoma (fibrolamellaris carcinoma, FLC) a HCC ritka variánsa, mely leginkább a fiatal korosztályban, cirrózistól mentes májban alakul ki. [6-11]

A FLC-t mint a hepatocellularis carcinoma hisztológiailag jól elkülöníthető variánsát először 1956-ban Edmondson és munkatársai írták le. [12]

Bermann és munkatársai poligonális sejtekből és fibrózus stromából álló, kedvezőbb prognózisú atípusos hepatocellularis carcinomaként számoltak be FLC esetekről, mely véleményük szerint a focalis nodularis hyperplasia (FNH) és a HCC közötti átmeneti (intermedier stage) tumornak tartható. [13] Mások a FLC-ban kimutatható neuroendokrin és oncocytaer jelleg miatt "primer malignus oncocytoid carcinoid"-ként írták le az FLC-t. [14]

1.2. A fibrolamellaris hepatocellularis carcinoma (FLC) jellemzői

1.2.1. A fibrolamellaris cacinoma előfordulása és etiológiája

A FLC előfordulása (incidencia) a vizsgált földrajzi régiótól függően az összes HCC esetek 1% - 5%-ának felel meg, az Egyesült Államokban az irodalmi adatok szerint a HCC esetek 1-2%-át teszi ki [15,16]. Más földrajzi regiókban, illetve országokban az FLC előfordulási aránya ennél jóval magasabb. Mexikói betegek között végzett vizsgálat szerint a HCC esetek 5,8 %-a volt FLC [17]. Lengyel szerzők közleménye alapján a lengyel HCC-s betegek 5,1 % -a bizonyult FLC-nek [18].

Wood és mtsai egy Egyesült Államokban készült tanulmány szerint 77 HCC-s beteg közül 15 betegben találtak FLC-t, mely 19,4%-nak, kirívóan magas értéknek felel meg. [19] (1. táblázat)

			HCC	FLC	
Szerző	Ország	Év	esetszám	eset	szám (%)
Chedid et al.	USA	1999	224	4	(1.8)
Wood at al.	USA	1988	77	15	(19.4)
Kaczynski et al.	Svájc	1996	532	2	(0.3)
Van Leeuwen et al.	Hollandia	1991	61	2	(3.3)
Dunk et al.	Anglia	1988	41	2	(4.9)
Ashraf et al.	Szaud Arabia	1986	75	1	(1.3)
Arista-Nasr et al.	Mexikó	2002	121	7	(5.8)
El-Serag et al.	USA	2004	7964	68	(0.85)

1. táblázat A fibrolamellaris hepatocellularis carcinoma (FLC) előfordulása hepatocellularis carcinoma (HCC) esetek között (Arista-Nasr J et al 2002 alapján)

Az irodalomban közölt, egyik legnagyobb FLC esetszámot vizsgáló - El-Serag és munkatársai által az Egyesült Államokban készült - tanulmány szerint 1986 és 2000 között diagnosztizált primer HCC átvizsgálása során 7964 esetből 68 FLC-t találtak, mely 0,85 % -nak felel meg. A vizsgált FLC életkorra számított incidenciáját 0,02/100 ezer-nek találták. A betegek életkorát tekintve egyértelműen igazolódott, hogy az FLC-s betegek életkora jóval alacsonyabb. Az átlagéletkor FLC esetében 39 év, a konvencionalis HCC esetében 65 év. A 40 év alatti betegek előfordulása FLC esetében 63,2%-nak, a cHCC esetében 3,6%-nak igazolódott, de az életkorra számított nem és rassz eltérés viszont nem bizonyult szignifikánsnak. Ettől függetlenül azonban megállapítható, hogy az FLC-ben szenvedő betegek nagyobb valószínűséggel voltak nők (51,5% FLC vs 26,3% cHCC) és fehér rasszhoz tartozók (85,3% FLC vs 56,9% cHCC). Az 1 - és 5 éves túlélési arány szignifikánsan hosszabb volt az FLC-s betegek mint cHCC-s betegek esetében. Az 5 éves relatív túlélési aránya 31,8%-nak bizonyult az FLC esetében, szemben a cHCC 6,8%-os relatív túlélési aránnyal. Az életkor, a nem, a rassz, a betegség stádiuma, a rezekció vagy transzplantáció lehetőségét is figyelembe véve független összefüggés állapítható meg az 5 éven belüli halálozás kockázatának 46%-os csökkenésében az FLC javára a cHCC-hez képest. [16]

Az FLC etiológiája nem ismert. Ellentétben a cHCC-vel, az FLC kialakulásának hátterében vírusfertőzés, toxicus vagy metabolikus hatás nem bizonyítható, és a máj cirrhotikus átépülése sem észlelhető. [20]

Néhány tanulmány azonban említi, hogy az FLC tumorszövetből HBV viralis proteineket (HBsAg és anti-HBe) és in situ hybridizációs eljárással tumorszövet genomba integrált HBV DNS szakaszokat és teljes hosszúságú vagy truncalt hepatitis B vírus X gén (HBVX) transzkriptumokat sikerült kimutatni [9,21-24], illetve a beteg szérumában HBsAg pozitivitás [25,26] vagy anti-HBs/anti-HBc ellenanyag jelenléte igazolódott. [24] A HBV és az FLC közötti összefüggés azonban csak esetlegesnek tűnik, egyelőre nincs szilárd bizonyíték emellett és más szerzők részéről sem lett megerősítve. [27]

Az FLC etiológiai faktorai között felvetették az FNH, mint megelőző elváltozás lehetőségét [28], és az orális kontraceptívumok szerepét is, de erre vonatkozólag egyelőre ugyancsak nincs egyértelmű bizonyíték. Felvetődött, hogy az ösztrogének társ-karcinogénként szerepelhetnek a FLC pathogenesisében. [9,20,24,29]

1.2.2. A fibrolamellaris carcinoma klinikai jellemzői

Az FLC-re és a cHCC-re jellemző klinikai tünetek általában nagyon hasonlóak, de az FLC megjelenése a cHCC-hez képest, mint említettük, jóval fiatalabb életkorban jellemző. Továbbá a rezekciót követő túlélési arány hasonló, azonban a teljes túlélési aránya a cHCC-hez képest jelentősen magasabb. [30]

Ez azonban nem minden esetben igaz. Az FLC-s betegek 5 éves teljes halálozási aránya lokalizált betegség esetében 86%, de ha az áttétképződés bizonyítható, akkor már csak 39% ez az érték.

Az irodalomban közöltek igen agresszív lefolyású, számos belszervben kiterjedt metasztázisokat képező, sebészi rezekció után rekurráló (átlag 2,2 évvel) FLC esetet is. A diagnózis idején távoli áttétek jelenléte eleve igen kedvezőtlen prognózist jelent, ilyenkor az 5 éves túlélés csak 15% körüli. [31,32] Az FLC azonban nagyobb arányban metasztázismentes, potenciálisan kuratív terápiára alkalmas (rezekció, transzplantáció), a többi májrákkal szemben (41,2% FLC vs 30,9% cHCC). [16] A jelentősebb FLC-t vizsgáló tanulmányok eredményének összefoglalását mutatja az 2. táblázat.

2. táblázat FLC-vel foglalkozó tanulmányok eredményének összevetése (Kakar S et al.2005 alapján)

Tanulmány (év)	FLC esetek	Túlélés	Megjegyzés
Wood et al. (1988)	15	rezekált esetek 5 éves túlélése 45%, teljes túlélés 25% vs 0% cHCC esetében	cirrhotikus cHCC eseteket nem választották szét
Starzl et al. (1986)	14	12/14 beteg túlélt	5 éves követés csak 2 beteg esetében történt
Craig et al. (1980)	23	teljes túlélés 30%, cHCC-nél kedvezőbb	cirrhotikus cHCC eseteket nem szeparálták, 4 FLC cirrózis/fibrosis talaján
Berman et al. (1988)	12	5 éves túlélés 68%, jobb, mint cHCC esetében	cirrhotikus cHCC-t nem választották el, 3 kevert HCC
Soreide et al. (1986)	9	csak a 6 rezekált beteg élte túl	egyik eset sem volt 5 évig követve
Farhi et al. (1983)	10	teljes túlélés 50%, egyik sem cHCC	cirrhotikus cHCC-t nem választották el
Lack et al. (1983)	5	teljes túlélés 80%, a betegek 3 éven belül meghaltak, átlag túlélés kedvezőbb, mint cHCC-ben	cirrhotikus cHCC-t nem szétválasztva vizsgálták
Pinna et al. (1997)	28	5 éves túlélés 75%	nem specifikált diagnosztikus kritériumok
El-Serag et al. (2004)	68	5 éves túlélés: FLC 32% vs.cHCC 7%	cirrhotikus cHCC-t nem választották el
Nagorney at al (1985)	16	teljes túlélés 31%, kedvezőbb, mint nem cirrhotikus cHCC esetében	nincs túlélési különbség a rezekált FLC és nem cirrhotikus cHCC között
Ringe et al (1992)	20	5 éves túlélés; rezekált betegek 43%, összes vizsgált beteg 37%	FLC és cHCC kimenetele hasonló
Haas et al (1989)	14	5 éves túlélés, 25% FLC és cHCC is	FLC és cHCC kimenetele hasonló
Katzenstein et al (2003)	10	5 éves túlélés 30%, teljes mortalitás 60%	FLC és cHCC kimenetele hasonló
Kakar et al (2005)	20	5 éves túlélés 45%, teljes 62% I.stádiumban	FLC kimenetele hasonló a nem cirrhotikus cHCC-hez, de kedvezőbb, mint cirrhotikus cHCC esetében
Stipa et al (2006)	41	5 éves túlélés 76%, a nem rezekálható FLC túlélése jobb, mint a nem rezekálható cHCC-é	A nyirokcsomó metasztázis volt az egyetlen szignifikáns negatív prognosztikus faktor

1.2.3. A fibrolamellaris carcinoma klinikai diagnosztikája

Az FLC felismerését a klinikai tünetek kialakulása segítheti. A diagnózis a klinikai tünetek mellett a laboratóriumi, a radiológiai (UH, CT, CT-angiográfia, MRI, PET-CT) és a patológiai vizsgálatok eredményei alapján állítható fel.

Az FLC diagnózisának "gold standardja" azonban mindig a *vastagtű biopsziás* ("core biopsy") mintából végzett szövettani vizsgálat. Amennyiben ez nem kivitelezhető, az UH- vagy CT-vezérelt vékonytű aspirációs citológiai vizsgálat (FNAB) is nagy jelentőséggel bírhat. Előfordulhat, hogy a biopsziás és/vagy FNAB mintavétel sikertelensége (elégtelen mennyiségű anyag, stb.) esetében *feltárásos ékbiopsziás* mintavétel szükséges a korrekt diagnózis felállításához. [9,33] Az FLC hisztológiai és citológiai diagnosztikájának részletes jellemzőit később, az 1.2.5. fejezetben tárgyalom.

Az FLC legjellegzetesebb klinikai tünetei között szerepel a tapintható máj körüli terime, mely sokszor érzékeny vagy fájdalmas. A sárgaság csak az esetek 40%-ban jelenik meg. [9]

Emellett számos olyan változatos bevezető tünet hívhatja fel a figyelmet az FLC-re, mint férfiban/fiúgyermekben a gynecomastia [34], vagy alsó végtagi thrombophlebitis [35], esetleg rekurráló mélyvénás trombózis [36], melyek paraneoplasiás tünetként értékelhetők.

Előfordulhat, hogy a tumor az epeutakban terjedve visszatérő epeúti obstrukciót, sárgaságot okoz és tart fent [37-40].

Az említetteken felül leírták, hogy az FLC-ben szenvedő betegekben elsődleges manifesztációként paraneoplasiás hyperthyreosis [41], magas láz [42], Budd-Chiari szindróma [43], cseplesz és peritonealis áttétek okozta nagyfokú ascites [44], vállfájdalom [45], nem-bacterialis, thromboticus endocarditis [46], máj abscessus szindróma [47], hypoglycaemia [48] is kialakulhat. Az említett tünetek vagy eltérések az FLC diagnózisa előtt már megjelenhetnek.

Az esetek egy részében az FLC diagnózisát a távoli metasztázisok (pl. ovarium), kimutatását követően állítják fel [49] vagy esetleg a FLC diagnózisát követően több évvel, távoli szervi metasztázisok jelenléte hívja fel a figyelmet a korábban rezekált FLC rekurrenciájára. [50] Az FLC társulhat egyéb betegségekkel, így colitis ulcerosával és primer sclerotizáló cholangitissel [51], Fanconi anaemiával [52].

Több olyan FLC esetet is közöltek az irodalomban, melyeket terhesség alatt diagnosztizáltak. [9,53-55]

1.2.3.1. A fibrolamellaris carcinoma klinikai laboratóriumi diagnosztikája

Az általános klinikai laboratóriumi vizsgálatok közül a gyorsult vérsüllyedés (We), az epeutak érintettsége, illetve obstrukciója esetén magasabb szérum alkalikusfoszfatáz (ALP), γ-glutamilsav-transaminase (GGT) és bilirubin, esetleg már áttétek esetében a laktát-dehidrogenáz (LDH), paraneoplasiás trombózis esetében a D-dimer szint, esetleg vérzékenységi zavarok lehetnek kórjelzők. Kihangsúlyozandó azonban, hogy ezek az eltérések egyáltalában nem specifikusak. [56]

A májfunkciós enzimek – alanin transzamináz (ALT) és aszpartát transzamináz (AST) – általában nem, vagy csak enyhén magasabbak. [15]

A HCC-ben gyakran használt tumormarker az alfa-fetoprotein (AFP) csak kevés segítséget nyújt az FLC diagnózisának felállításához és csak a betegek egy kis részénél (7-11%) emelkedett. [57,58]

Egyéb tumormarkerek, így a CEA, Ca-125 és a Ca 19-9, szérum szintje FLC esetében általában nem magas. [55]

Ismert azonban, hogy a cHCC esetek jelentős részében (91%) és a FLC esetek mindegyikében (100%) a 3 cm-nél nagyobb méretű tumoroknál a K vitamin hiány következtében a szérum Des-γ-carboxy prothrombin (DCP) fehérje szintje magasabb. [56,59,60]

Ugyancsak jól felhasználható az FLC korai diagnosztikájában a szérum telítetlen B₁₂ vitaminkötő képessége, melynek emelkedett értéke az FLC esetek mintegy 70%-ában igazolható. [9,61-65]

A szérum jelentősen megemelkedett neurotensin szintjét az FLC-s betegek 80%-ban igazolták. [66,67]

Összességében az említett fenti markerek és laborvizsgálatok jelentősége még nem

teljesen tisztázott az FLC esetében, de sokat segíthetnek a tumor korai diagnosztikájában és a rekurrencia kimutatásában. [9]

1.2.3.2. A fibrolamellaris carcinoma radiológiai diagnosztikája

A klinikai tünetek és laboratóriumi eltérések mellett az FLC diagnosztikájában jelentős szerepet kapnak a képalkotó vizsgálatok.

A hasi ultrahang (UH) vizsgálat során a májban az FLC különböző méretű, egyenletlen/kevert echogenitású terimeként jelenik meg, amennyiben peritonealis metasztázisok és/vagy jelentős ascites, esetleg a portális véna érintettsége is jelen van, az ultrahanggal biztonsággal diagnosztizálható. [44,68]

A has és mellkas computer tomographiás (CT) és mágneses rezonancia (MRI) vizsgálata során az FLC leginkább a májban elhelyezkedő, hipervaszkularizált, éles szélű, lobulált jellegű, szabálytalan alakú, heterogén szerkezetű tumoros terimének látszik, melyhez számos esetben (68%) kalcifikáció is társulhat. Amennyiben a kalcifikáció jelen van az FLC-ben, akkor az egyszerű röntgenfelvétel során is kimutatható. [40] Az FLC jellegzetessége, hogy rendszerint nem előzetesen károsodott vagy cirrhotikusan átépült, hanem sok esetben teljesen ép szerkezetű májban alakul ki és a tumorban centrálisan elhelyezkedő hegszövet található, mely többnyire CT/MRI vizsgálat során kimutatható. A tumor megjelenése általában hipodenz, mely kontrasztanyagos vizsgálat során felerősödik, azonban ez az FNH esetében is igaz, ezért az FLC tévesen FNH-nak diagnosztizálható. [33,68,69] Az áttétek, az ascites vagy intratumoralis bevérzés, necrosis megléte CT vizsgálattal az esetek jelentős részében szintén jól megjeleníthetőek.

Az FLC diagnosztikájában a CT angiográfiás technika is hasznos segítséget nyújthat, mert általában megállapítható a vaszkularizált tumor elhelyezkedése, a portalis vénák esetleges érintettsége és a VCI kompressziója vagy arterio-portalis shuntképződés is. [68,70]

Számos tanulmányban igazolódott, hogy az FLC TNM stádiuma egyértelműen összefügg a tumormentes túléléssel. Azoknál a betegeknél, akiknek nyirokcsomó, vagy környező szervi érintettségük (extrahepatikus érintettség), esetleg érbetörés igazolható rövidebb a túlélésük, mint a májra lokalizált és igazolható érbetörés nélküli FLC betegek esetében. A fentiek megítélése nemcsak az adott tumor prognózisához, hanem a sebészi kezelés és az esetleges rekurrencia megelőzéséhez is szükséges. Ezek pontos felderítéséhez is elengedhetetlen a CT és MRI vizsgálat [40].

Az FLC diagnosztikájában az utóbbi években elterjedő PET-CT vizsgálat nyújthat hasznos segítséget. [9,32,71]

1.2.4. A fibrolamellaris carcinoma makroszkópos megjelenése

A FLC az esetek túlnyomó többségében (80-90%) a környező májnál halványabb, sárgás színű, jól körülírt, egyenletlen szélű, noduláris, inhomogen, heterogen szerkezetű daganat. Legfőbb jellegzetessége a tumorsejt fészkeket szétválasztó különböző szélességű kötőszövetes septumok és a tumorban 75% gyakorisággal megtalálható centrális, néha excentrikus elhelyezkedésű, gyakran csillag alakú hegszövet, mely lemezes szerkezetű kötőszöveti struktúrákból áll.

A tumorban gyakran előfordulhat hialinos degeneráció esetleg kalcifikáció, fokozottabb vaszkularizáció, ritkábban bevérzés vagy necrosis. A környéki májszövet általában épnek tűnik, és nem mutatja cirrhotikus, vagy fibrotikus jellegű átépülés jeleit. [9,42,72,73]

1.2.5. A fibrolamellaris carcinoma citológiai jellegzetességei és kórszövettana

Az FLC mikroszkópos képe jellegzetes. A tumor nagyméretű sejtekből épül fel, átlagos méretük a normál hepatocytáknál mintegy háromszor, egy jól differenciált cHCC tumorsejtnél mintegy 1,6-szer nagyobb, a sejthatárok általában jól definiáltak.

A tumorsejtek igen gyakran oncocytaer jellegűek, citoplazmájuk granuláris, eosinophil halvány, ritkábban sötét karakterű, a jelentős számú mitokondrium miatt. Gyakoriak a halvány, kerekded testek ("pale-bodies"). A sejtmagvak változó nagyságúak, pszeudoinklúziók és hialin testek rendszerint előfordulnak a daganatsejtekben. A tumorsejtek között lemezes szerkezetű kötőszöveti szeptumok találhatók. [74] (1. ábra)

1. ábra Az FLC szövettani képe (H&E, 400x)



Jellegzetes, kötőszöveti sövények között eosinophilen festődő, nagyméretű, poligonális tumorsejtek macronucleussal. A daganatsejtek epepigmentet tartalmazhatnak - nyíllal jelölve.

A tumorsejtekben nagy, vezikulált nucleus és nagyméretű, prominens nucleolus (macronucleolus) figyelhető meg. A mag-citoplazma arány magas, az osztódások (mitózis) viszont meglehetősen ritkák vagy egyáltalán nincsenek. (1. ábra) A FLC tumorsejtekben elvétve epepigment is megjelenhet. [75,76]

A FLC-ban a tumorsejtek húrszerű, trabecularis elrendeződésben figyelhetők meg, melyeket vaskos, kötőszövetes sövények vesznek körül. Kiemelkedően fontos jellegzetessége a daganatnak, hogy ez a különböző vastagságú fibrózus, lemezszerű – "lamellaris" (innen ered a *"fibrolamellaris"* elnevezés is) kötőszövet, mely a tumorsejteket gyakran parallel elrendeződésbe, kisebb nagyobb csoportokba rendezi.

A tumorszövetben különböző gyakorisággal észlelhető gócos meszesedés és ennél csak jóval ritkábban necrosis. A FLC esetek jelentős részében (az esetek 75%-ban) a tumorszövetben réz, vagy rézasszociált protein mutatható ki. [74]

Általában a tumor körüli májszövetben nincs fibrosis vagy cirrózis, de mononuclearis sejtekből, lymphocytákból és plazmasejtekből álló, nem specifikus krónikus gyulladás gyakran előfordulhat.

A fentiek alapján a FLC hisztopatológiai diagnózisát a következő három jellegzetesség alapján határozhatjuk meg:

(a) nagy, poligonális tumorsejtek erősen eosinophil citoplazmával

- (b) macronucleolusok jelenléte a tumorsejtekben
- (c) jelentősen felszaporodott fibrózus stróma, mely különböző vastagságú parallel lamellákat képez a tumorsejtek között. [77]

A fentiektől eltérően az FLC megjelenhet olyan patológiai variánsok formájában is, mint a világos sejtes [20] vagy a pszeudoglanduláris, valamint mucintermelő altípusok. [78]

A daganat hisztopatológiája és immunhisztokémiai tulajdonságai elég jól definiáltak, azonban a FLC megkülönböztetése a fibrózus jellegű cHCC-től még tapasztalt vizsgáló számára is sokszor komoly kihívást jelenthet. [79] (lásd még 1.2.7 fejezet)

Az FLC több olyan cHCC-re specifikus markert expresszál, mint a *HepPar1* (HSA, hepatocyta specifikus antigen) és a *CK* (*citokeratin*) 8 és -18, de az alphafetoproteint (AFP) nem termeli. Ugyanakkor az FLC a cholangiocellularis daganatok specifikus markerének tartott *CK* 7-tel is erősen pozitív [6,20,72,73,80].

Az eddigi eredmények arra utalnak, hogy az FLC olyan speciális cHCC altípus, mely bipotenciális hepatocyta progenitor sejtekből származhat, melyek hepatocyta és cholangiocyta irányban is egyaránt differenciálódhatnak. [73]

A formalinban fixált, paraffinba ágyazott (FFPE) szövetmintákon végzett immunhisztokémia vizsgálatok jelentős támpontot nyújtanak az FLC patológiai diagnosztikájában. Számos immunhisztokémiai vizsgálattal diagnosztikus szempontból jelentős proteint találtak már FLC-ban (lásd fentebb). Ezek közé tartozik egy 32 kD molekulasúlyú, a thymocyták apoptózisáért felelős [81], sejtmembrán (transzmembrán) glycoprotein, a CD99 (MIC2), melynek pozitivitása egyes szerzők szerint erősen FLC diagnózisa mellett szól. Néhány egyéb daganatban (Ewing sarcoma, granulosa sejtes tumor, pancreas endokrin tumor) azonban a CD99 ugyancsak pozitív lehet. [9,82,83].

A neuroendokrin tumormarkerek, mint a synaptophysin és a chromogranin általában

FLC-ben negatívak, ritkán azonban pozitivitást mutathatnak. [18] Kivétel ezalól a CD56 (NCAM), mely az esetek 30-40%-ban pozitív eredményt ad. [11]

Szintén az FLC neuroendokrin érintettségére utalhat, hogy a progasztrin ("glicinben gazdag gasztrin") és a gasztrin receptor (CCK-BR) jelenlétét is sikerült már a tumorban kimutatni. Ez érdekes lehet a tumor proliferáció szempontjából is, mivel a gasztrin jól ismert mitogen hatással rendelkezik. [84]

Az irodalomban olyan FLC esetet is közölnek, amelyben neuroszekretoros differenciálódást és AA típusú amyloid lerakódást is kimutattak. [85]

A FLC-ban a kötőszöveti állomány erősen inhomogén eloszlású, ellentétben az FNHval, a hepatocellularis adenomával (HCA) és a cHCC-vel. [86] A FLC-ban található lemezes, vaskos, lamellaris szerkezetű kötőszövetes állomány megjelenítésére kiválóan alkalmas lehet a trichrome (Masson, Mallory) mellett a pikroszíriusz festés. [72,73]

1.2.6. Molekuláris patológiai eltérések fibrolamellaris carcinomában

A FLC patogenezisére és molekuláris patológiájára vonatkozó ismereteink a tumor ritkább előfordulása és a különböző kutatócsoportok relatíve alacsony esetszámú vizsgálatai miatt erősen limitáltak. [9,73] Számos olyan - cHCC-ben már igazoltan diszregulált működésű - jelátviteli út és gén, mint az AFP, a p53 és a β-catenin gén mutációja vagy a survivin FLC-ben betöltött szerepére még nincs egyértelmű bizonyíték. [17,87,88] Az FHIT (Fragile Histidine Triade) tumorszupresszor gén károsodását és expressziójának elvesztését a Kínában, Tajvanon és Németországban vizsgált cHCC esetek jelentős részében megfigyelték, azonban eddig a FLC-ban nem tudták bizonyítani. [89] Hasonlóan több daganathoz (tüdő-, emlő-, prostatacarcinoma), a primer és metasztatikus FLC esetek több mint 75%-ában egy potenciális onkogén az "anterior gradient-2" overexpresszióját mutatták ki. Ezzel szemben figyelemre méltó, hogy a vizsgált cHCC eseteknek csak a 2%-a mutat "anterior gradient-2" overexpressziót. [8] A sejtproliferációban szerepet játszó gének közül a RAS, MAPK, PIK3, TGF-β, EGFR gének overexpresszióját és a xenobiotikus degradációs folyamatokban történő részvételét is megfigyelték. [8,90-92] Muramori és munkatársai egy FLC betegtől származó mintán a tumorsejtek jelentős aromatáz enzim aktivitása mellett az EGFR protein overexpresszióját igazolták. Egyúttal EGFR 18,19,20,21 exonon és KRAS 2.exon géneket is analizálták, azonban aktiváló mutációt az említett génszakaszon nem tudtak kimutatni. [93]

Egy, az extracelluláris mátrix működésében szerepet játszó enzim, a "matrix metalloproteináz-2" (MMP-2) aktivitását FLC-ban a cHCC-hez és cirrózishoz képest jelentősen magasabbnak találták. [88]

Már korábban felvetődött, hogy a genetikai instabilitásnak esetleg szerepe lehet a FLC patogenezisében és egyes genetikai abnormalitások meglétét több vizsgálat igazolta. [9] Ezek közül az abnormális (triploidhoz hasonló) kariotípust, az 1q és q21 kromoszómakarok morfológiai eltéréseit és emelkedett aromatáz aktivitást [94], valamint az 1. kromoszóma átrendeződését és a 8q karon izokromoszóma jelenlétét [95] igazolták. Az 1q42-43 és 5p kromoszómákon alacsony frekvenciájú allélvesztést [96], az 1q kromoszóma aberrációját és egyéb citogenetikai abnormalitásokat primer és metasztatikus FLC-ben is megfigyeltek [97], de ezek klinikai jelentősége még tisztázatlan. Jelenleg úgy tűnik, hogy a rekurráló és a metasztatizáló FLC daganatokban egyértelműen több kromoszómális eltérés jelenik meg, mint a primer FLC esetében, mely ebből a szempontból hasonlít a cHCC-re. [9,97]

Megállapítást nyert, hogy a kromoszómális eltéréseket tartalmazó FLC-k agresszívabb viselkedésűek a citogenetikai eltérésekkel nem rendelkező ugyanezen típusú daganatoknál. [98] Komparatív genomiális hibridizációs tanulmányok bizonyították, hogy - habár ritkábban, mint a cHCC esetében - de a vizsgált FLC betegek több, mint felében kromoszómális aberrációk vannak jelen. Leggyakrabban az 1., 7. és a 8. kromoszóma érintett, továbbá a 18q kromoszóma regiók gyakori allélvesztése mellett a 7p, 7q és 19p kromoszómális regiók allélgyarapodását is leírták. [99] DNS tartalomban mutatkozó eltérést az FLC-ben azonban nem találtak. [100]

Metasztatizáló FLC daganatokban a xenobiotikus degradációs utakon felül számos zsírsav, triptofán metabolizmusban, a komplement és koagulációs kaszkádban és foszfatidil-inozitol szignáltranszdukciós utak regulálásában szerepet játszó gén overexpresszióját mutatták ki. [8]

1.2.7. A fibrolamellaris carcinoma differenciál diagnosztikai problémái, kevert tumorok

Az FLC klinikai és patológiai jellegzetességei, ezek ismérvei jól ismertek és ezek számos jellegzetességben különböznek a HCC-től, mégis előfordul, hogy tévedésből az FLC-t cHCC-nek diagnosztizálják. Amikor fiatal, ösztrogén vagy progeszteron kezelésben részesült nőbetegről van szó a diagnózis felállításakor feltétlenül figyelembe kell venni az FNH lehetőségét. [74] Az FNH a lemezes szerkezetű, fibrózus néhol hyalinosus részletek miatt gyakran hasonló képet mutathat FLC-hez, nemcsak a radiológia képalkotó vizsgálatokkal (főként az ultrahangvizsgálat), hanem a citológiai és szövettani megjelenés tekintetében is [101]. Azt a tényt is szem előtt kell tartanunk, hogy az FLC mellett egyidejűleg FNH is kialakulhat a májban. [28]

A kezelés lehetőségei és a terápiás konzekvenciák miatt igen fontos az FLC elkülönítése a kötőszövetben gazdag cHCC-től, a hepatocellularis adenomától (HCA), az intrahepaticus hemangiomák egyes típusaitól, a májba terjedő epehólyag adenosquamosus carcinomától és az egyéb nem májsejt eredetű primer tumorok (carcinoid, cholangiocarcinoma, emlő-, nyálmirigy-, pajzsmirigy tumorok stb.) fibrózus metastasisaitól egyaránt. [33]

Amennyiben gyermekkori májdaganat kapcsán vetődik fel az FLC diagnózisának lehetősége, feltétlenül gondolni kell a hepatoblastoma vagy mesenchymalis hamartomától való elkülönítésére.

Előfordulhat, hogy a FLC a májban nem egyedüli daganatként, hanem más tumorral együtt (szinkron) vagy más típusú daganattal keveredve ("mixed tumors") fejlődik ki. A fentiekben már említett FNH-n kívűl az FLC mellett többféle daganat fejlődhet ki, melyek közül leggyakrabban a cHCC és a cholangiocellularis carcinoma megjelenésével kell számolni. [21,78,102]

1.2.8. A fibrolamellaris cacinoma kezelése és prognosztikai faktorok

1.2.8.1. A sebészi kezelés; rezekció és májtranszplantáció

A FLC adekvát sebészi kezelését követő prognózisa jónak mondható. A technikailag megnyugtatóan kivitelezhető komplett sebészi rezekciót követően a gyógyulási arány 50-75% között van, melynek alapja mindenképpen a korai diagnózis kell legyen. [103] A sebészi beavatkozás ki kell terjedjen a tumor teljes eltávolításán túl a megfelelő nyirokcsomók kivételére is. Alapjában véve az a megállapítás fogadható el, hogy az esetek többségében a FLC rezekcióra gyakrabban alkalmas, mint a cHCC.

A megfelelően végzett kuratív sebészi rezectiós műtét teljes 1 éves túlélése 89-100%, a 3 éves túlélése 75-100%, az 5 éves túlélés 50-65 % között van. [103,104]

Abban az esetben ha a tumor túl nagy mérete, jelentős kiterjedtsége vagy a környéki szervekbe terjedése miatt a partialis-subtotalis hepatectomia vagy hemihepatectomia technikailag nem megvalósítható, a total hepatectomiát követően az orthotopikus májátültetés (OLTx) elvégzése javasolt [104,105]. A FLC miatti májtranszplantációt követő 40 hónapon belül a tumor kiújulási aránya 50% körül van és a hosszú távon fenntartott immunszupresszió egyéb mellékhatásaival is kell számolni, a fenti esetben az OLTx a preferálandó eljárás. [59,106] A megromlott májfunkciók és a cirrózis következményei miatt sok esetben a cHCC miatt végzett OLTx ereménye nem kedvező, a betegek 5 éves túlélése átlagosan csak 20% körül van. Ezzel ellentétben a cirrózis nélküli FLC az OLTx-et követő prognózisa sokkal kedvezőbb [106]

1.2.8.2. Kemoterápia, citosztatikus kezelés, intervenciós lehetőségek

A kemoterápia akkor javasolható FLC-ben, ha a tumor nem távolítható el sebészileg, vagy a betegnél bármely okból májtranszplantáció nem végezhető. Ezen túlmenően esetleg a kuratív sebészi beavatkozás előtt adható a kemoterápia, abban a reményben, hogy ezzel a beteg operálhatóvá válik. Egyes kutatók véleménye szerint az inoperábilis esetek mintegy fele sikeres kemoterápiával műtéti beavatkozásra alkalmassá tehető [38,107].

A kemoterápiás szerek közül FLC kezelésére leggyakrabban a ciszplatin, az epirubicin,

az 5-FU vagy ezek kombinációja használatos. [108,109]

A FLC kemoterápiás kezelése az International Childhood Liver Tumour Strategy Group (SIOPEL) protokol szerint végezhető. [105]

A fentieken túl 8 héten át, folyamatos 5-FU intravénás és szekvenciálisan (heti háromszor) subcutan adott rekombináns interferon alfa-2b kombinációjának adásával is próbálkoztak FLC kezelésére, mellyel bíztató terápiás hatást sikerült elérni. Ezzel a kombinációval a betegek 62,5%-nál találtak terápiás választ, továbbá egy beteg komplett, négy beteg részleges remisszióját látták és a teljes túlélés 23,1 hónap volt. [110,111]

Az irodalomban még közölnek előrehaladott állapotú, májtranszplantációra nem alkalmas és kemoterápiára nem reagáló FLC eseteket részleges terápiás válasszal, melyeket alternatívaként arteria hepatica kemoembolizációval kezeltek. [112]

A kiterjedt, rekurráló (kiújuló) FLC megfelelő kezelésére a kiterjesztett, agresszív ("multiorgan") sebészi rezekció és az intraoperatív hyperthermiás kemoterápia kombinációja esetleg ethanol instillatiója javasolható. [113]

1.2.8.3 A fibrolamellaris carcinoma prognózisáról

Általánosságban elmondható, hogy újabban - a korábbiakkal szemben - egyetértés van abban, hogy az FLC-nek a cHCC-nél nincs jelentősen jobb prognózisa. [15,16,114]

A prognózisra vonatkozó kedvezőbb megfigyelések abból adódnak, hogy a FLC általában *fiatalabb páciensekben* észlelhető, *egyéb betegségtől (cirrózis, fibrosis, kifejezett gyulladás) mentes* májban alakul ki és *magas a rezekabilitás aránya*. [115] [20] Azonban ha a FLC prognózisát a cirrózistól mentes cHCC prognózisával hasonlítjuk össze, akkor a túlélésben nem kapunk kedvezőbb eredményt. [74]

Feltétlenül meg kell említeni azt is, hogy a gyermekkorban kialakult FLC-nek egyáltalában nincs kedvezőbb prognózisa és nem reagál jobban az alkalmazott kezelésre, mint a cHCC [109] Megállapítható, hogy a FLC-nak abban az esetben lehet kedvezőbb a prognózisa amennyiben a következő tényezők fennállnak:

- fiatalabb kor

- trombózistól és tumoros infiltrációtól mentes hepatikus erek

- nyirokcsomó és távoli metastasisok hiánya

- tumormentes rezekciós szélek

- normál májfunkciós értékek

A vizsgálatok szerint jelenleg bizonyosnak tekinthető, hogy az FLC esetében a nem, a celluláris atípia és proliferáció nincsenek kapcsolatban a betegség prognózisával. [20] Egyes vizsgálók szerint az olyan FLC esetekben, melyeknél a diagnózis idején nincs kimutatható metasztázis az 5 éves túlélés 86%-nak találták, azoknál akiknél már kimutatható az áttétképződés, viszont csak 39 %. [74] Másfelől az is igazolódott, hogy amikor rezekciót nem lehetett végezni és a daganat már metasztázist adott a diagnózis felállításakor az átlagos túlélés 32 hónap, ugyanez viszont cHCC esetében 6 hónapnak bizonyult. [116]

A sebészi rezekció komplett kivitelezhetősége jelentősen befolyásolja az FLC prognózisát. Egyes tanulmányok szerint a medián túlélés azokban az FLC esetekben, ahol komplett sebészi rezekció nem végezhető 12 hónap, és az 5 évet a vizsgált esetek közül egyik beteg sem érte meg. Viszont azokat az eseteket elemezve, amikor a komplett sebészi rezekció elvégezhető a medián túlélés 112 hónap volt, az 5 éves túlélés pedig 76%-nak igazolódott. Ugyanezen vizsgálatban az FLC és a cHCC esetében is az 5 éves és a teljes mortalitást is hasonlónak találták. [117]

A FLC pTNM stádiuma egyértelmű összefüggést mutat a betegek tumormentes túlélésével, melyet leginkább a vaszkuláris invázió megléte érinti hátrányosan. [59]

Az mindenképpen elmondható, hogy az FLC és cHCC összehasonlításról még reálisabb eredményekhez további nagy, multicentrikus tanulmányok kiértékelésére lenne szükség. [20]

1. 3. Sejtkapcsoló struktúrák és tight junction (TJ) proteinek

1.3.1. A sejtkapcsoló struktúrák felépítése

A többsejtű élőlények külvilág felé határoló hámsejtjei (fedőhám, epithelium) és

belső szervekben található (endothelium, mesothel, mirigyhám) hámsejtjei jellegzetes sejtkapcsoló struktúrákkal kapcsolódnak egymáshoz. Ezek a sejtek egyrészről elsődleges határvonalat, elhatárolódást ("primary barrier"), mintegy "kerítést" ("fence") és sok tekintetben kaput ("gate") is jelentenek a külvilág felé. Másrészről a szervezetnek szüksége van folyadék jellegű anyagainak (gyomor-, béltartalom, vér, vizelet) elhatárolására, kiválasztás (belső és külső), valamint koncentrálás és környezet-szabályozás folyamatára, melyet ezen hámsejtek végeznek el. A fentiekből következik, hogy a sejtkapcsolatoknak, az említett sejtkapcsoló struktúráknak és az őket alkotó fehérje komplexeknek számos fontos szerep jut.

A sejtkapcsoló struktúrák elhelyezkedése a sejt apikális pólusa felől haladva a tight junction (TJ), a zonula adherens (adherens junction-AJ), a desmosoma, hemidesmosoma és a gap junction (GJ) sorrendjében következik. [118]

Az epithelialis sejtek a fenti kapcsolódást junctionalis komplexekkel, különböző fehérjeösszetételű és funkciójú molekula komplexekkel, ún. sejtadheziós molekulakomplexekkel (CAM) valósítják meg. A CAM-ok protein, immunglobulin természetűek, a paracelluláris anyagtranszport szabályozásában játszanak szerepet. Összetételüket tekintve intercelluláris-, transzmembrán- és extracelluláris doménekből állnak, más molekulákhoz homofil vagy heterofil módon kapcsolódnak. Az intercelluláris rész a citoszkeletonnal van összeköttetésben, az extracelluláris rész pedig az extracelluláris matrixhoz, vagy esetleg másik CAM-hoz kapcsolódhat és receptor szerepet is ellát. [119]

- A TJ (vagy zonula occludens)

A TJ esetében az elnevezés is jelöli, hogy a kialakított kapcsolat igen "szoros", mivel a hámsejtek apicalis felszíne között általában megtalálható 15 nm szélességű rés is hiányzik. Ezek a molekulakompexek csak gerinces élőlényekben találhatók meg. A TJ-k egymáshoz igen hasonló struktúrájú proteinekből (fehérje komplexek), fő alkotóként és a TJ-k szerkezetét jelentősen meghatározó occludinból (OCLN) és claudinokból (CLDNs) (lásd következő fejezet) épülnek fel. Ezeken kívűl a TJ-k különböző arányban junkcionális adhéziós molekulákból (JAM) és egyéb proteinekből (cingulin, symplekin, ZO-1, e-cadherin, actin) tevődnek össze. (2. ábra)

A TJ-k funkciója rendkívűl sokrétű, így a paracelluláris réseken keresztül a folyadék és ionháztartás regulálása (= barrier és szabályozó funkció), valamint az apicalis és

basolateralis sejtfelszíni domének szeparalása, azaz a sejtpolaritás kialakítása és fenntartása (= "kerítés", elválasztó funkció). A TJ-k általánosságban három nagyobb csoportba sorolhatók; transzmembrán proteinek (OCLN, CLDNs, tricellulin, JAM), periferiás kapcsolattal rendelkező citoplazmatikus proteinek (ZO, cingulin, symplekin) és szignál proteinek. [118] [120] Újabb vizsgálatok igazolták, hogy a TJ-k részt vesznek számos szignáltranszdukciós folyamat szabályozásában és a veleszületett immunitás kialakításában és fenntartásában is. [121,122]

2. ábra. A hámsejtek apicalis részének kapcsolódása, a TJ szerkezete és összetétele. (http://en.wikipedia.org/wiki/File:Cellular_tight_junction-en.svg. Elérés időpontja: 2013.05.13)



A TJ-ok működésének megértéséhez a dinamikus modellt javasolják [120] és az eredmények azt sugallják, hogy a TJ-k összeépülés és disszociáció gyors és folyamatos ciklusain mennek keresztül. [123]

Különböző patológiás állapotokban, különösen daganatképződés esetében a TJ-k molekuláris összetételében számos változás mutatható ki, melyek összefüggésben állnak a sejt eredetével, a daganat típusával, inváziós képességével és a túléléssel. [124-127]

1.3.2. Tight junction proteinek, claudinok Claudinok (CLDNs)

A legfontosabb TJ-t alkotó integráns membránproteinek a claudinok, melyek a paracelluláris barrier funkció, a sejtpolaritás kialakítása mellett az intercelluláris terek és az epithel/endothel sejtek közötti molekulaáramlások, a transzepithelialis rezisztencia (TER) és az iontranszport legfőbb szabályozói.

A claudinok felfedezése és elnevezése 1998-ra tekint vissza és két japán kutató M.Furuse és S.Tsukita (Kyoto University) nevéhez fűződik. A *claudin* szó a latin elnevezésből ered (claudere=lezárni, elzárni), mely egyben utal ezen proteinek barrier szerepére is.

A CLDN-ok négy transzmembrán doménen kívűl egy nagyobb és egy kisebb extracelluláris hurkot, valamint a citoplazmába nyúló N-terminalis és C-terminalis részletet is tartalmaznak. A claudin családba legújabb eredmények szerint emlősökben 27, emberben 24 féle különböző proteint sorolnak, melyek molekulatömege 20-25 kDa között van. A legtöbb claudin hordoz C-terminalisan PDZ kötő helyet. (kivétel a CLDN-12) [119,128]

A claudinok a legkülönbözőbb fejlettségű élőlényekben - a fonalférgektől (Nematodes) kezdve az emberig megtalálhatók meglehetősen konzervatív aminosav struktúrával. Érdekesség, hogy egy ázsiában honos *Takifugu rubripes* nevű, egyébként tetrodotoxint termelő, igen mérgező gömbhal fajban ("puffer halak"), - ahol a hám barrier szerepe kiemelkedően fontos - eddig 56 féle claudint sikerült kimutatni. [129] A claudinokat feloszthatjuk filogenetikai alapon, szekvenciájuk egyezésének mértéke szerint "klasszikus" (pl. CLDN-1-10, -14, -15, -17, -19) és "nem klasszikus" claudinokra (pl. CLDN 11-13, -16, -18 és 20-24). A CLDN-ok különböző eloszlásban és összetételben mutatkoznak meg a szövetekben, attól függően, hogy az adott szövetben lévő sejtek milyen funkciót látnak el a paracelluláris iontranszpotban és az elektromos rezisztenciában. [119] A másik felosztás szerint a TJ proteinek és a claudinok csoportosíthatók a tömítő funkciójuk ("sealing"), a csatornaképzés ("channel formers"), az ionszelektivitás és permeabilitási tulajdonságaik alapján is. (3. táblázat) A claudinok egymással és a többi TJ proteinnel is kiterjedt és szoros kapcsolatban

állnak [119]

Permeabilitási jellegzetesség	Tight junction protein
Kizárólag tömítők	claudin-1, claudin-3, claudin-5, claudin-11, claudin-14, claudin-19, tricellulin
Csatornaképzők	
Cation-szelektív	claudin-2, claudin-10b, claudin-15
Anion-szelektív	claudin-10a, claudin-17
Víz-permeabilitás regulátor	claudin-2
Változó funkció	claudin-4, claudin-7, claudin-8, claudin-16,
	occludin
Jelenleg ismeretlen funkció	claudin-6, claudin-9, claudin-12, claudin-13,
	claudin-18, claudin-20-27, MarvelD3

3. táblázat Claudinok és TAMP molekulák klasszifikációja a permeabilitási tulajdonságaik alapján

(Schulzke JD et al 2012 alapján)

Az alábbiakban a munkám során vizsgált claudinokat (CLDNs) mutatom be részletesebben.

Claudin1 (CLDN1) Az egyik legfontosabb integráns membránfehérje a TJ szerkezetében, melynek génje a 3. kromoszómán a q28-q29 pozicióban található meg. [130] A bőr és a magas rezisztenciájú hámok elengedhetetlenül fontos tömítő funkciót betöltő alkotórésze. Viszont a TJ-ket nem tartalmazó, áteresztő, permeabilis ("leaky") hámokban (pl. vese proximalis tubulus) a CLDN1 jelenléte egyáltalán nem igazolható. A CLDN1 molekulák az epithelsejtek találkozásánál homophil interakcióval kapcsolódnak egymáshoz a sejtmembránban. A CLDN1 jelenléte a plazmamembránban immunhisztokémiai, immunfluoreszcens vagy fagyasztva-töréses vizsgálatokkal jellegzetes linearis formában mutatható ki. [119]

A CLDN1-et számos daganatban vizsgálták már és expressziója a különböző daganatokban igen eltérő. A szájüregi laphámrákokban igen jelentős expressziója észlelhető és ezen daganatokban progressziós tényezőnek találták. [131] A gastrointestinalis mirigyhám egyes malignus tumoraiban (pl. nyelőcső, gyomor, vastagbél) is emelkedett mértékű expresszióját figyelték meg. [128,132,133]

Emlőszövetben alacsonyabb fokú expresszióját észlelték. [134] A cervix súlyos dysplasiás elváltozásaiban és az in situ cervix carcinomában magasabb CLDN1 expressziót találtak, mint az invasív méhnyakrákban. [135] A CLDN1 proteinről igazolódott, hogy a májban is jelentős mértékben expresszálódik és a CD81 molekulával a HCV májsejtbe lépéséhez szükséges kofaktornak tekinthető. [136] A HCC esetében is észlelhető a CLDN1 normáltól eltérően kifejezettebb, aberráns expressziója. A HCC-ben kimutatták, hogy CLDN1 protein expressziójának elvesztése a daganat agressziv viselkedésével mutat összefüggést. [137]

Claudin2 (CLDN2). Az áteresztő hámok specifikus TJ proteinje, melynek génje az X kromoszómán a Xq23.3-q23 helyen található meg és a ion-csatornákat alkotó ("channelforming") claudinok közé tartozik. A CLDN2 a Ca független sejt-sejt kapcsolatokban, homophil formában a kation szelektív paracelluláris csatornák fő alkotórésze. Főként az olyan ionok számára átjárható szövetekben, mint a bél, vagy a vese proximalis csatornák vagy a plexus choroideus hámjában mutatható ki. [128,138] Újabb vizsgálatok igazolták, hogy a CLDN2 a víz számára is átjárható, ami azt jelenti, hogy a CLDN2 a transzmembrán vízcsatornák, az aquaporinok paracelluláris megfelelője. [139] Ellentétben a CLDN1-el a CLDN2 a plazmamembránban nem folytonos (linearis) hanem szakaszos, pontszerű, granularis megjelenést mutat és a citoplazmában is detektálható. [140] A CLDN2 volt az első olyan TJ protein, melyről igazolták, hogy overexpressziója a transepitheliális ellenállás csökkenését eredményezte. [139]

A CLDN2 magasabb expresszióját igazolták a gastrointestinalis daganatok közül a nyelőcső laphámrákok és a colon adenocarcinomák esetében [128], viszont alacsonyabb CLDN2 expresszió mutatkozott a cervix tumoraiban. [135]

Claudin3 (CLDN3). Génje jellegzetes, intronoktól mentes kódoló DNS szakasz, mely a 7. kromoszóma 7q11.23 karon helyezkedik el. [141] A TJ jelentős összetevője, elsősorban tömítő ("ragasztó"-"sealing") funkciója ismeretes az epithelben, linearis formában mutatkozik a plazmamembránban. [119]

MDKC sejtvonalak vizsgálata során kimutatták, hogy a CLDN3 overexpressziója háromszorosára emeli a transzepitheliális rezisztencia értékét. [139]

A CLDN3 megnövekedett expreszióját már igazolták egyes tumorokban, így a prostata [119], pancreas, gyomor és ovarium serosus adenocarcinoma [142] mellett a nyelőcső, a colon adenocarinoma [143] esetében is. Érdekesség, hogy a CLDN3 mérsékeltebb fokban Clostridium perfringens kötő tulajdonsággal is rendelkezik, emlőtumor sejtvonalakon a Clostridium perfringens enterotoxin (CPET) hatásra a daganatszövet necrosisát, apoptózisát észlelték. [119,128]

Claudin4 (CLDN4). A sejtmembránban integrált TJ protein génje a 7q11.23 lokalizációban található. A gén károsodásakor többszörös neuralis fejlődési anomaliák (pl.Williams-Beuren szindróma) alakulnak ki. A CLDN4 protein sokrétű funkciót tölt be, előfordulása a kevéssé átjárható hámokban (pl.nyálmirigyek) jellemző. Ezekben a hámokban főként az epithel intercelluláris Na-ionok transzportját, a sejtmembrán vezetőképességét csökkenti. Megjelenése főként membránhoz integrált jellegű. [119,144]

A CLDN4-ről kimutatták, hogy a *Clostridium perfringens* enterotoxin (CPET) receptoraként is funkcionál, mely a jövőben további terápiás beavatkozás lehetőségét veti fel. [145,146]

In vivo ovarium tumorsejtvonalakon mutatták ki, hogy a CLDN4 (a CLDN3-hoz hasonlóan) közvetített kölcsönhatásokon keresztül késlelteti az e-cadherin expresszióját és gátolja a β-catenin szignáltranszdukciós folyamatokat, így végeredményben ezen tumorsejtvonalak növekedési potenciálját és a metasztatikus potenciálját csökkenti. [142]

Munkacsoportunk korábban elsőként igazolta - a cHCC-vel ellentétben - a CLDN4 fokozott expresszióját cholangiocellularis carcinomában (CCC) [147,148] melyet később mások is megerősítettek [149]

Az előzőekben említetteken felül emelkedett CLDN4 expressziót mutattak ki még a nyelőcső [143] és gyomor adenocarcinomában [132,143], colon carcinomában, ovarium, prostatata-, és pancreas carcinomában, valamint elszarusodó laphám carcinomában is. [128] Az el nem szarusodó laphám tumorok esetében a CLDN4 alacsonyabb expressziója igazolódott. [150]

Claudin5 (CLDN5). A protein génje a 22. kromoszóma q11.21-es helyén található meg. A gén mutációja a pharyngealis ív, a szív cono-truncalis regiójának, az arc, valamint mellékpajzsmirigy és thymus multiplex fejlődési zavarával járó ún. velocardiofacialis szindróma (VCFS) kialakulását okozza. Alternatív splicing során létrejött transcriptumvariánsok is kódolhatják a CLDN5 proteint. [151]

A CLDN5 jellegzetesen az endothel sejtek tömítő funkciójáért felelős TJ protein, a szervek többségében a normál érendothelen felül kimutatható a vér-agy gát és a plexus choroideus sejtekben és a vese arteriáiban is. [152,153]

Igazolódott, hogy ez a TJ protein nem effektív egyes epithel sejtvonalakban (pl.MDCK), míg más sejtvonalakban (colon) igen [154] Úgy tűnik, hogy funkciójához olyan CLDN kötő partnerre van szüksége (pl.CLDN12), mely csak endothelsejtekben található meg. [139]

Kutyák emlődaganatainak és hyperplasiás elváltozásait vizsgálva megállapítható a CLDN5 (emellett a CLDN1, -2 és -7) alacsonyabb fokú expressziója, mely összefüggésben állhat a daganatsejtek kapcsolódásával és inváziós képességével. [155]

A CLDN5 sejtmembránhoz kötött pozitivitása kimutatható a mesothel és vaszkuláris eredetű tumorokban (hemangioma, cutan angiosarcoma), az ovarium tumorokban, az emlő ductalis carcinomában. [156] A nyelőcső laphámrákokban igazolták, hogy expressziójának mértéke a proliferációval korrelál, a gyomorrákokban a diffúz típusban alacsonyabb, az intestinálisban magasabb CLDN5 expresszió észlelhető. Tüdő és szájüregi laphámrákokban a CLD5 expressziója csökkenik, tüdő adenocarcinoma és pleuralis metastasis esetében viszont kifejezettebb expresszió észlelhető. [152]

Claudin7 (CLDN7). A CLDN7 protein génje a 17. kromoszómára lokalizálódik. (sequencia: NC_000017.10 (7163222..7166512, complement). [157]

A CLDN7 kiiktatása MDCK II sejtvonalon a Na-ion permeabilitás fokozásával csökkenti a rezistenciát. Másrészről a CLDN7 overexpressziója LLC-PK1 sejteken emeli a hám rezisztenciáját a klorid-ion permeabilitás csökkentésével. [139]

Human tüdő carcinoma sejtvonalakon (NCI-H1299) végzett vizsgálatok szerint a CLDN7 az ERK/MAPK jelátviteli utakon keresztül gátolja a sejtek migrációját és invasióját. [158]

A CLDN7 expressziója immunhisztokémiai reakcióval a legtöbb hám eredetű

daganatban kimutatható és néhány melanocytás tumorban, valamint lágyrész, illetve ér eredetű daganatban (angiosarcoma) is megjelenik. Azonban egyes tumorokban, mint a nyelőcső és gyomor adenocc. valamint ovarium carcinoma a CLDN7 expressziója jóval erősebb.[128] Más daganatokban – pl. cervixrák [135], vagy emlőtumorok [134], hám eredetű uterus daganatokban, fej-nyaki tumorokban [128] és HCC-ben expressziója csökkent vagy a többi daganathoz képest alacsonyabb mértékű. [159] A nyelőcső laphámrák esetében a CLDN7 expresszió csökkenését írták le, sőt ezekben a daganatokban a progresszió és az áttétképződés prognosztikai faktorának tekinthető. [160] Tüdő laphámrákok és adenocarcinoma esetében is leírták a CLDN7 downregulációját és erős overexpresszióját. [161]

1.3.3. A tight junction assszociált Marvel proteinek (TAMPs)

Három tagja ismert; az egyik a már korábban fellfedezett *occludin* (OCLN), a másik kettő az újabban megismert *tricellulin* (TRIC) és a *MarvelD3* protein. Az alábbiakban részletesebben az általam vizsgált OCLN és TRIC kerül tárgyalásra.

A TJ-hoz asszociált MARVEL proteinek közé tartozik az egyik legfontosabb TJ protein az OCLN, melynek génje az 5. kromoszómán a 5q13.1 lokalizációban helyezkedik el. [162]

Az OCLN 1993-ban felfedezett, 4 transmembrán doménből (tetraspan) és 522 aminosavból álló, 65 KDa molekulatömegű komplex membrán fehérje. Intracellulárisan egy carboxy (-COOH) és egy amino (-NH2) végződést, extracelularisan pedig két egymáshoz igen hasonló, hurokszerű doménrészt tartalmaz. (3. ábra)

3. ábra Az occludin felépítése. Jól megfigyelhető a négy M1-M4 jelölt, hidrofil tulajdonságú plazmamembránban elhelyezkedő domén. (Furuse M. et al 1993)



A fehérje elnevezése a latinból (occludere=elzárni) ered és a funkcióra utal, de valódi szerepe még két évtizeddel felfedezése után is vita tárgyát képezi.

Mivel az OCLN minden bicelluláris TJ-ben jelen van, ezért gyakran a TJ markerként is használják, ezenkívül tricelluláris sejtkapcsolatok TJ-ben is gyakran kimutatható. Az OCLN knock-out állatok morfológiailag és funkcionálisan normálisnak tűnnek, de növekedésben retardációt, atrophiás gastritist ezekben az állatokban is megfigyeltek. [163]

Az MDCK II sejtek OCLN knock-out-ot követően nem mutatnak barrier funkció károsodást, azonban az OCLN overexpressziója ezekben a sejtekben megemeli a resistenciát. Ha az epithelialis sejtekben az occludin nincs jelen megfelelő mennyiségben, ezt más TJ proteinek tudják kompenzálni ("substitutional redundancy"). [139]

Tricellulin (MarvelD2, TRIC)

Újabban megismert tetraspan TJ protein, mely jellegzetesen a kettős (bicelluláris, bTJ) és főként a hármas (tricelluláris, tTJ) epithelialis sejtkapcsolatok alkotója. [164] Génje az 5. kromoszómán a 5q13.2 helyzetben található. [165] Fiziológiás körülmények között elsősorban a tricelluláris tight junction (tTJ) centrális részének regulációjáért, a tTJ kapcsolatok tömítő funkciójáért, ionregulációjáért felelős. A TRIC négy tranzmembrán doménből (tetraspan), egy nagyobb (41aa) és egy kisebb (30aa) extracelluláris hurokból, valamint a citoplazmában elhelyezkedő C (carboxy)terminalis részből és egy N terminalis részből áll. (4. ábra)

4. ábra Az egér tricellulin "membran folding" modellje (bal o.) és a tTJ sémás szerkezete (jobb o.)



A TRIC az első olyan tetraspan TJ protein, melyet jelentősebb mennyiségben sikerült kimutatni gerincesek tTJ-ben. Négy különböző alternativ splicing során létrejött isoform vátozata ismert. [164]

A TRIC protein bizonyított szerepe a belső fülben a Corti-féle szervben az epithel barrier kialakítása, mely szükséges a normál hallás fiziológiai folyamatához. A gén defektusa autosomalis recesszív süketséget okoz (DFNB49) [165]

A TRIC overexpressziója gátolt makromolekula permeabilitást eredményez a tTJ-k centralis részében, jelentős TRIC overexpresszió esetén a bicelluláris TJ-ben (bTJ) is ionpermeabilitási csökkenés jön létre. [139]

1.4. Tirozin kináz (TK) jelátviteli folyamatok, EGFR, K-RAS és Wnt/Beta catenin szignáltranszdukciós útvonalak

A szervezetben sejtjeink differenciálódása, szaporodása, utánpótlása, de azok elhalása (necrosis) és programozott elhalása (apoptosis) is több szinten szabályozott, bonyolult, egymással több helyen kapcsolódó jelátviteli (szignáltranszdukciós) utakon keresztül történik. A jelátviteli utakban szereplő enzimek, proteinek és receptorok szerkezetének megváltozása a sejtek kóros működéshez, osztódásához, daganatképződéshez vezethet.

1.4.1. A human protein kinázok (PK)

A humán protein kinázok olyan enzimek, melyeknek szubsztrátjuk egy másik protein, melyet módosítanak egy foszfát csoport hozzáadásával (foszforiláció). A foszforiláció rendszerint a szubsztrát célfehérje funkcionális módosulását, megváltozott aktivitását eredményezi.

A human fehérjék mintegy 30%-a módosulhat PK aktivitással. A PK-ok szabályozzák a legjelentősebb celluláris jelátviteli útvonalakat és speciális szignáltranszdukciós folyamatokat. [166]

A protein kinázok az enzimek olyan csoportja, mely katalitikus alegysége a gamma termimalis foszfátot transzportál át egy nukleotid trifoszfátról (leggyakrabban ATP) egy vagy több aminosavra. Igy végül is foszforilációt (autofoszforiláció) végez, mely a protein konformáció változását és funkciójának módosulását eredményezi. A konformáció változás következménye a szignáltranszdukciós folyamat megindulása, mely számos alapvető sejtfunkció ki- és bekapcsolását jelenti. [167]

A PK-ok a szubsztrát specificitás alapján két nagy osztályba sorolhatók; szerin / treonin specifikus és tirozin specifikus kinázokra. [166]

1.4.2. A tirozin kinázok (TK)

A tirozin kinázok olyan tirozin specifikus protein kináz enzimek, melyek csak a többsejtű élő szervezetekben találhatók meg. Kiemelkedően fontos funkciójuk a többsejtű szervezet sejtek közötti szignáljainak növekedésre, adhesiora, motilitásra, sejthalálra vonatkozó információinak továbbítása, közvetítése. A TK proteinek két nagy csoportra oszthatók; a 90 körüli TK közül 58 receptor típusú alcsaládba tartozik, a további 32 non-receptor TK pedig 10 alcsaládba sorolható. Emlős állatokban jelenleg 50 –nél több TK ismert. A TK-ok jelentős szerepet játszanak a morphogenesisben, a sejtosztódásban, sejt differenciálódásban egyaránt. Human viszonylatban a TK-okat történetileg először oncogenként azonosították és bizonyítottan szerepelnek olyan betegségek kifejlődésében, mint a diabetes mellitus, veleszületett fejlődési rendellenességek vagy malignus daganatok. [168]

A TK-ok egy citoplazmába nyúló tirozin kináz doménből és egy transzmembrán elhelyezkedésű TK receptorból állnak. A TK extracelluláris domén komponense a molekula ligand kötő része, mely disulfid hidakkal kapcsolódik a TK maradék részéhez. Két TK receptor összekapcsolódása is létrejöhet, mely szintén disulfid hidakkal történik (homo-, heterodimerek). A transzmembrán receptor egy simpla alfa-helix strukturát alkot, az intracelluláris (citoplazmatikus) domén felelős a kináz aktivitásért, így végeredményben a szabályozó funkció kialakításáért is. [169]

A TK-ok egy része transzmembrán receptor TK (jelérzékelő), másrészük citoplazmán belül helyezkedik el. Szerepük rendkívűl jelentős a sejt növekedés, differenciálódás, a sejtciklus reguláció, sejtmigráció, -proliferáció és az apoptosis szabályozásában. A TK receptorok egy jelentős része növekedési faktor (GF). (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. A sejtfelszíntől a sejtmag felé vonuló kaszkád-aktivációs folyamat hatására a
sejtmagban több gén átírása megváltozik, mely a sejtben a proliferáció vagy túlélés irányba ható folyamatokat indít be. [169]

A továbiakban a jelátviteli folyamatok általunk vizsgált TK elemeit ismertetem részletesebben.

1.4.3. EGF, EGFR és jelentőségük a daganatok kialakulásában

Az (EGFR HER1, Erb1) génje a 7. kromoszómán 7p12 karon helyezkedik el, a kódolt fehérje TK aktivitású transzmembrán glycoprotein, mely köti az EGF-t és a TGF-α molekulát is. [170] Inaktív monomer formából aktiválódáskor homodimer formát vesz fel. Működése TK-ra jellegzetes autofoszforilatiót követően szignáltranszdukciós szabályozási folyamaton, 1.4.1. fejezetben а tárgyalt kinázkaszkádon keresztül érvényesül.

Az epidermalis növekedési faktor (EGF) a hámsejtek felszínén fiziológiásan is előforduló sejtfelszíni transzmembrán receptor, de számos daganat növekedésében is bizonyítottan szerepet játszik. A jelentősebb EGFR-t expresszáló tumorok (az összes adott tumor %-ában): NSCLC (40-80%), fej-nyaki squamosus carcinomák. (95%), colorectalis carcinoma (25.77%), glioblastoma multiforme (40-60%), emlő carcinoma (14-91%), nyelőcsőcarcinoma (35-88%) és pancreas carcinoma (30-50%), prosztata carcinoma (41-100%), ovarium carcinoma (35-70%) [171]

Egyes tumorok nem expresszálják az EGFR-t, ilyenek: a SCLC, sarcoma, lymphoma, leukaemia, myeloma. [172,173]

Az EGFR downstream jelátviteli útja több párhuzamos csatornával is rendelkezik. Az EGFR a SOS/GRB2 proteinek segítségével aktiválja a RAS fehérjét, mely a fő jelátviteli vonalhoz tartozó RAF-ot aktiválja (pozitív feedback), emellett a PI3, PKC, SRC, STAT, RAL-GEF, PLCγ fehérjékkel is kölcsönhatásba lép. (5. ábra)

Az EGFR-t kódoló génszakaszban mutáció léphet fel, mely megváltoztatja a jelátviteli folyamatot. (pl.NSCLC) Az aktiváló pontmutációk leggyakrabban az EGFR 18-22 exonján jönnek létre és az ATP kötő hely megváltozásával járnak, egyúttal a receptor kötőfehérje nélküli konstitutív aktiválódása alakul ki. Egy másik típusú EGFR mutáció az EGFRvIII mutáció, amikor a sejtfelszínre egy truncált (extracelluláris részét elvesztett) receptor fehérje kerül ki, melynek intracelluláris része állandóan aktív és a jelút további részét (főleg RAS, PI3, K, JNK) aktiválva tartja. [174]

A célzott EGFR gátló kezelés targetje az EGFR extracelluláris vagy intracelluláris doménje lehet, ezek a monoklonális antitestek (MAB) a receptor aktiváló kötőfehérje helyére bekötődve gátolják az aktivációt és tumorellenes hatást fejtenek ki. A kis molekula súlyú tirozin kináz gátlók (TKI) a mutáns fehérjéhez szelektíven kapcsolódva fejetenek ki tumorellenes hatást. [174]

Gátlószer	Támadáspont	Javallat
Cetuximab	EGFR blokkolás	EGFR + CRC , fej nyaki cc
Erlotinib, gefitinib	EGFR tirozináz gátlás	NSCLC
Lapatinib	EGFR/HER2 gátlás	emlő cc.
Matuzumab,	EGFR blokkolás	EGFR + CRC
Nimotuzumab,	EGFR blokkolás	EGFR + CRC
Panitumumab	EGFR blokkolás	EGFR + CRC
Vandetanib	EGFR/VEGF/RET gátlás	medullaris pajzsmirigy cc.

4. táblázat Néhány EGFR-t érintő célzott kezelés támadáspontja és javallatai [174]

5. ábra Az EGFR szignáltranszdukciós jelút folyamata. [175]

(Lee J et Moon C, Experimental Biology and Medicine 2011, 236:375-389)



1.4.4. A KRAS protein, KRAS gén mutációk és szerepük a daganatok kialakulásában

A KRAS (V-Ki-ras-2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) RAS protein családba tartozó GTPase aktivitású enzimfehérje, mely az EGFR jelátviteli útban központi szerepet tölt be. Fiziológiás körülmények között a sejtmag felé molekuláris be és kikapcsoló feladatot lát el. ("molecular on/off switch")

Funkciója az aktivált EGFR/HER2-HER4 receptorok felől a szignáltranszdukció továbbítása a RAF-MEK-ERK fehérjéken keresztül a sejtmag felé. A sejtmagban a JUN, FOS, ELK, FOXO, STAT, MYC fehérjéken keresztül a magban elhelyezkedő gének aktiválásával a proliferáció, adhézió, migráció, angiogenezis irányában ható folyamatok aktiválódnak.

A KRAS fehérjét kódoló gén a 12. kromoszómán 12p12.1 lokalizációban található. A génen mutáció léphet fel, mely leggyakrabban a 12 és 13 kodonon alakul ki. Ritkábban a 61, 146 kodonokon észlelhető mutációja. [176]

A KRAS gén szomatikus mutációja elsősorban metasztatizáló colon carcinoma, nem kis sejtes tüdőrák (NSCLC), pancreasrák és leukaemiák pathogenesében játszik fontos szerepet.

A mutáció a fehérje GTP-áz aktivitását gátolja és a KRAS molekulát az aktivált GTP kötő módosulatban tartja, így az EGFR jelút állandó aktiválódott állapotát tartja fenn. [177]

Aktiváló mutációjának szerepét igazolták a következő malignus daganatok esetében; pancreas carcinoma (95%), pajzsmirigyrák (55%), colorectalis carcinoma (35-40%) NSCLC (35-40%) [178]

Ha az EGFR-t és a KRAS-t vagy más kulcsfontosságú fehérjéket előállító génekben nincsenek jelen génhibák, akkor a sejt egészséges marad és szabályozottan tud osztódni és növekedni. Amennyiben viszont mutáció alakul ki a fenti génekben, akkor a sejtek nem kontrollálható osztódásba, növekedésbe kezdhetnek, ennek következtében pedig malignus daganat alakulhat ki. A KRAS mutációját a tüdődaganatok közül a NSCLC és a coloncarcinomák kb.40%-ában lehet mutációkat igazolni.

Amennyiben a KRAS gén mutáns típusú, a betegnél nem alkalmazható EGFRellenes célzott terápia, mivel a kóros KRAS protein jelenléte meghiúsítja a kezelés sikerét. Amennyiben viszont a KRAS "vad" típusú (tehát nincs jelen a gént érintő mutáció), akkor – az EGFR mutációinak jelenléte esetén – várhatóan eredményesen alkalmazható az EGFR-ellenes kezelés. Ha a daganatból végzett molekuláris patológiai vizsgálat "vad" típusú KRAS gént igazol, akkor várhatólag jó eredménnyel adható az EGFR-ellenes célzott kezelés. Ebben az esetben a tumorsejtek kóros KRAS fehérjéi nem gátolják meg a célzott gyógyszerek rákellenes hatását, a daganat így általában gyorsabban és jobban reagál az anti-EGFR terápiára. [174,179-181]

1.4.5. A Beta-catenin és Wnt/ β-catenin jelátviteli út

A β -catenin kettős funkciójú fehérje, mely a sejtek közötti adhesióért és a géntranszkripció szabályozásáért felelős. A proteint a CTNNB1 gén kódolja a 3 kromoszóma rövid karján p21 helyen található. Drosophilában a β -catenin homológja az armadillo protein. [182]

A β-catenin az adherens junction komponense és cadherin protein komplex alegysége és az axin/conductin nevű fehérjékkel összekapcsolódva a Wnt szignáltranszdukciós út központi fontosságú, intracelluláris jelátalakító résztvevője. Overexpresszióját számos tumorban kimutatták (pl.endometrium cc.) [183]

Az aktív Wnt hiányában a β -catenin degradálódik és a leendő target gének inaktivált állapotban maradnak. Ha a Wnt szignál aktív akkor a β -catenin degradáció csökken és az ilymódon felhalmozódott β -catenin be tud lépni a sejtmagba megkötni olyan fontos transzkripciós faktorokat, mint a TCF (T-cell factor) és az LEF (lymphoid enhancer-binding protein) így aktiválja a transzkripciót.

A Wnt/β-catenin jelutat először a fejlődő embrióban vizsgálták. Igazolódott, hogy a jelút aktiválódása összefüggésben áll az embriósejtek túlélésével, szaporodásával, mozgásával és proliferációjával. A Wnt/β-catenin jelút a felnőtt szervezetben is fontos szerepet kap és a jelút kóros működése számos betegséghez vagy tumorhoz kapcsolható. [184]

A Wnt/β-catenin jelút igen sok represszor elemet tartalmaz, mely jelzi, hogy ez a jelpálya milyen fontos "főkapcsoló" jellegű szerepet tölt be a sejtmagi regulációban. Felvetődik a lehetősége annak, hogy minden olyan mutáció, mely konstitutív módon erőteljesen aktiválja a β-catenin jelútvonalat valószínűleg részt vesz bizonyos malignus tumorok iniciációjában és progressziójában.

A β-cateninhez kapcsolódóan az egyik legfontosabb és legtöbbet tanulmányozott jelút egy tumor szupresszor génhez, az APC (adenomatous polyposis coli) -hez kapcsolódik, ennek sporadikus és öröklött mutációja észlelhető a FAP (familiaris polyposis) esetében. [185,186]

A β-catenin gén (CTNNB1) mutációjának szerepét már igazolták CRC-ben (50%), melanomában, prostatarákban, endometrium carcinomában (13%), ovarium carcinomában és pilomatrixomában is.

A β -catenin fontos szerepet tölt be a hepato-carcinogenesisben is. Ezt igazolja, hogy a cmyc és a HRAS expressziója mellett primer HCC-ben (interstitialis deletio -50%), hepatoblastomában (exon3 deletio-48%) igazolódott a CTNNB1 gén mutációja. [187]

1.4.6 A syndecan-1 (CD138)

Syndecan-1 a heparán szulfát proteoglycan család tagja, 320 aminosavból és három doménből (ektodomén vagy extracelluláris, transmembrán és citoplazmatikus domének) álló 32,4 KDa molekulasúlyú összetett fehérje, melynek génje 2p23-24.1 kromoszóma lokalizációban található. [188,189] A CD138 a monoclonal anti-syndecan-1 antitest elnevezése, mely erős citoplazmatikus membrán pozitivitást mutat és plazmasejt irányú differenciálódás kimutatására használható, ezért gyakran plazmasejt markerként használják a patológiai diagnosztikában. A syndecan-1 szerepet játszik a sejt-sejt kapcsolatban és a sejt-kollagén kapcsolatban, felelős a sejt és extracelluláris környezete közötti interakció szabályozásáért, gátolja a sejtinváziót a kollagén mátrixban. Regulálja a sejtproliferációt, a sejtmigrációt, valamint szabályozza a szignáltranszdukciót és a citoszkeleton szerkezeti változásait is. [188]

Számos daganat expresszálja a CD138-at, így a myeloma multiplex mellett a diffúz nagy B sejtes lymphoma és plasmocytoid tumorok is pozitivak.[190]

A fentieken túl a prosatata carcinoma, emlő carcinoma, colorectalis carcinoma és cervix carcinoma és világos sejtes veserák esetében is kimutatható a CD138 pozitivitás. Az RCC és cervixrák esetében a syndecan-1 protein expressziója és a hisztológiai grade közötti inverz korreláció igazolódott. [191]

2.CÉLKITŰZÉSEK

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

Célunk volt ezért olyan sejtbiológiai 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 célpontjául 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 ;

- 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 CCCval összehasonlítva fehérje és mRNS szinten.
- A újonnan felismert TJ fehérje, a tricellulin (TRIC) expressziójának vizsgálata FLC, cHCC és CCC primer májdaganatokban.
- A β-catenin és syndecan-1 fehérjék expressziójának vizsgálata FLC, cHCC és CCC esetében.
- Az EGFR protein expressziójának vizsgálata FLC, cHCC és CCC daganatokban.
- 5. Az EGFR és KRAS gének vizsgálata, az esetleges mutációk kimutatása FLCben.

3. ANYAG ÉS MÓDSZEREK

3.1. Betegek

Vizsgálatainkat a Semmelweis Egyetem Regionális Etikai Bizottságának engedélyével fibrolamellaris carcinoma diagnózissal lezárt esetekből végeztük. A 11 eset közül 6 eset a Semmelweis Egyetem I. és II.sz. Patológiai Intézetének 1999 és 2009 között archivált anyagából, 3 eset Magyarország vidéki centrumaiból konzíliumba küldött (1 eset a Gyöngyösi Bugát Pál Kórházból, 1 eset Szegedi Tudomány Egyetem, Általános Orvostudományi Kar Patológiai Intézetéből, 1 eset a Debreceni Egyetem Patológiai Intézetéből), 2 eset a Ruprecht-Karls Egyetem (Heidelberg, Németország) Patológiai Intézetének anyagából állt össze. A 11 beteg anyagából 8 sebészeti rezekátumot és 3 vastagtű biopsziás szövetmintát vizsgáltunk. A 11 beteg közül egyik esetében sem volt a májban cirrózis vagy vírusfertőzés kimutatható.

Az FLC esetek mindegyikében a diagnózis klinikai tünetek, képalkotó eljárások (ultrahang, CT, MRI) és a szövettani vizsgálat alapján került felállításra.

A betegek életkora 11-66 év között (átlagosan 20,81 év), a férfi/nő arány 5/6 volt. A vizsgált 11 FLC beteg közül 6 esetében metastasisok kialakulása volt igazolható. (5. táblázat)

Beteg	Nem	Kor (év)	Cirrózis	Vírus fertőzés	Tumor méret (mm)	Metastasis
1.	nő	11	nincs	nincs	80x80x35	nincs
2.	férfi	15	nincs	nincs	66x96x66	nincs
3.	nő	14	nincs	nincs	100x80x80	tüdő
4.	nő	21	nincs	nincs	100x60x90	nyirokcsomó tüdő
5.	férfi	19	nincs	nincs	110x70x100	nyirokcsomó tüdő, máj
6.	férfi	16	nincs	nincs	30x40	nincs
7.	nő	16	nincs	nincs	110x90x80	nincs
8.	nő	18	nincs	nincs	60x36	retro- peritonealis nyirokcsomó
9.	nő	18	nincs	nincs	110x104x94	peritonealis
10.	férfi	66	nincs	nincs	multifokális	peritonealis
11.	férfi	15	nincs	nincs	100x80x70	nincs

5. táblázat. FLC betegek kliniko-patológiai jellemzői

A 11 betegből származó FLC mintákat 7 konvencionális hepatocellularis carcinomával (6. táblázat) (cHCC; nem fibrolamellaris/trabecularis-acinaris típus, grade II-III.), 7 cholangiocellularis carcinomával (intrahepaticus CCC, grade II-III.) (7. táblázat) és 5 nem tumoros "kontroll" májjal hasonlítottuk össze.

Beteg	Nem	Kor (év)	Cirrózis	Vírus fertőzés	Tumor méret (mm)	Metastasis
1.	nő	82	van	nincs	50x60	nincs
2.	férfi	78	nincs	nincs	65x55	nincs
3.	férfi	70	van	nincs	90x75	nincs
4.	férfi	60	van	HCV, EBV	55x50	multiplex HCC
5.	férfi	75	nincs	nincs	33x30	nincs
6.	férfi	67	nincs	nincs	42x30	nincs
7.	férfi	30	nincs	CMV	80x100	nincs

6. táblázat. Betegek "konvencionális" hepatocellularis carcinomával (cHCC)

7. táblázat. Betegek cholangiocellularis carcinomával (CCC)

Beteg	Nem	Kor (év)	Cirrózis	Vírus fertőzés	Tumor méret (mm)	Metastasis
1.	nő	78	nincs	nincs	6x25	nyirokcsomó
2.	nő	49	van	nincs	85x70	nyirokcsomó
3.	férfi	65	nincs	nincs	40x8	nyirokcsomó
4.	nő	61	nincs	nincs	50x30	nincs
5.	nő	36	nincs	nincs	35x22	nincs
6.	nő	74	nincs	nincs	50x30	nincs
7.	férfi	57	fibrosis	nincs	5x25	nyirokcsomó

Az 5 normál májszövet közül 2 benignus focalis májlaesio (1 hepatocellularis adenoma-HCA és 1 focalis nodularis hyperplasia-FNH) mellől, további 2 pedig FLC mellől lett eltávolítva. Mindegyik mintát az elváltozástól \geq 10 cm-ről metszettük ki. Egy esetben közúti baleset során elhunyt személytől származó, a baleseti halált követően 12 órán belül igazságügyi patológiai vizsgálatra (autopsia) került esetben normál májnak bizonyult szövetet használtunk fel. 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.

A cHCC betegek közül 2 esetben vírusfertőzés (egy betegnél HCV és EBV, egy betegnél CMV) volt kimutatható, 3 esetben alapelváltozásként májcirrózist lehetett igazolni, egy betegnél multiplex tumoros elváltozást találtak.

3.2. Szövettani vizsgálatok

A szövetmintákat beérkezést követően 10%-os, neutralis (pH 7,4) PBS-ben beállított formalinban fixáltuk 24 órán át szobahőmérsékleten, majd alkoholsorban (70%, 90%, 100%) és xylolban történő dehidrálást követően paraffinba ágyaztuk. A paraffin blokkba ágyazott (FFPE) mintákból 3-4 µm-es metszetek készültek, amelyeket haematoxylin-eosinnal és kötőszöveti festéssel (pikroszíriusz) festettünk meg.

A szövettani metszetek értékelését fénymikroszkóppal végeztük.

3.3. Immunhisztokémiai vizsgálatok

Az FFPE szövetblokkokból 2-5 µm vastagságú metszeteket készítettünk Silannal vagy Poly-l-lysinnel bevont *Superfrost UltraPlus*® (Thermo Fisher Scientific, Gerhard Menzel GmbH&Co., Braunschweig, Germany) tárgylemezekre. Az immunhisztokémia reakciók során használt primer antitestek tulajdonságai, a gyártók és az alkalmazott higítások a 8. táblázatban találhatók meg.

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 inhibitort, < 50 µg/mL HRP Multimert, 0,04% DAB H₂O₂ – t és 5 g/L CuSO₄ –ot tartalmazó *UltraViewTM Universal DAB Detection Kit* (LOT: 802552, REF: 760-500) alkalmazásával történt. Az immunhisztokémiai reakciók mellett a metszeteken magfestésként hematoxylint használtunk. (9. táblázat)

Primer Hightés		Species/	Pozitív	Catalog	Cyróntó
antitest	nigitas	clone	kontroll	No.	Gyarto
CK7	1:1000	monoklonális egér (OV- TL1230)	húgyhólyag, transitionalis cc.	M7018	DAKO
CK8	1:80	monoklonális egér (35βH11)	normál máj	M0631	DAKO
CK18	1:400	monoklonális egér (DC10)	normál bőr	NCL- CK18	Vision/ Novocastra
СК19	1:100	monoklonális egér (RCK108)	normál bőr	M0888	DAKO
AFP	1:2000	monoklonális egér (C3)	human placenta	NCL- AFP	Vision/ Novocastra
HepPar1 (HSA)	1:50	monoklonális egér (OCH1E5)	normál felnőtt máj	NCL- HSA	Vision/Novo castra
Glypican3 (GPC3)	1:100	monoklonális egér (1G12)	hepatocellularis májrák	MSK06 7-05	Zytomed
Claudin1	1:100	poliklonális nyúl	normál bőr	51-9000	Invitrogen
Claudin2	1:20	monoklonális egér (12H12)	normál colon	3087911 4R	Invitrogen
Claludin3	1:80	poliklonális nyúl (Z23.JM)	normál colon	34-1700	Invitrogen
Claudin4	1:200	poliklonális nyúl	normál colon	36-4800	Invitrogen
Claudin5	1:200	poliklonális nyúl	normál colon	34-1600	Invitrogen
Claudin7	1:100	poliklonális nyúl	normál emlő	34-9100	Invitrogen
Tricellulin (C-term)	1:50	poliklonális nyúl	normál duodenum	488400	Invitrogen
Occludin	1:100	poliklonális nyúl	normál vékonybél	71-1500	Invitrogen
CD-31 (PECAM-1)	1:80	monoklonális egér (JC70A)	epithelialis angiosarcoma	M0823	DAKO
CD-34 (Class II.)	1:500	monoklonális egér (QBEnd10)	normál bőr tonsilla	IR632	DAKO
β-catenin	1:200	monoklonális egér (14)	pancreas neuroendokrin tu., hepatoblastoma	61015	BD Bio- sciences
EGFR (Confirm TM-3-C6)	1 μg/ml	monoklonális egér (3C6)	tüdő squamosus carcinoma	790- 2988	Ventana
Syndecan-1 (CD138)	1: 60	monoklonális egér (MI15)	diffúz nagy B sejtes lymphoma	M7228	DAKO

8. táblázat. Immunhisztokémiai vizsgálatokhoz használt primer antitestek jellemzői.

9. táblázat. Immunhisztokémiai reakciók lépései Ventana Benchmark XT immunautomatában. (PrAB=elsődleges antitest; ScAB=másodlagos antitest; RT=szobahőmérséklet; DAB=3,3'-diaminobenzidin)

Lépés	Reagens	Idő	Catalog No.
Deparaffinálás	xylol	2x10' szobahőn	S1699
	alkohol (10,50,70%)	3x5' szobahőn	253-2187
Feltárás	DAKO Target Retrieval	30' microhullámmal	A2153-50G
	Solution – 200W		
Blokkolás	Inhibitor (3%H ₂ O ₂)		253-2188
Jelölés	PrAB (higítás:10% BSA)	42°C, 32'	253-2189
Előhívás	UltraView TM Universal		LOT: 802552, REF:
	DAB Detection Kit		760-500
ScAB	< 50 µg/mL HRP		LOT: 802552, REF:
	Multimer + ScAB		760
Vízualizálás	0,04% DAB H ₂ O ₂		LOT: 802552, REF:
			760
	5 g/L CuSO ₄		LOT: 802552, REF:
	-		760
Magfestés	Hematoxylin		
Háttérfestés	Blueing Reagent		
Dehydrálás	alkohol 96%	3x10'	1408
	xylol	2x10'	S1699
Lefedés	Sakura Tissue-Tek [®] Glas		1408
	TM Mounting Medium		

3.4. Immunfluoreszcens vizsgálatok

A fehérje lokalizáció pontos megjelenítéséhez TRIC, OCLN, CD31 primer antitestekkel immunfluoreszcens vizsgálatokat végeztünk. A minták rögzítése folyékony nitrogénben (-147 °C, Messer Hungarogáz Kft) és izopentánban (2-methylbutane, Product No: 277258, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) történt. A fagyasztásos technika segítségével a frissen fagyasztott (kivágás után azonnal lefagyasztott) tumorszövetből -80 °C-on tárolást követően 4-5 µm vékony szeleteket metszettünk le -23 °C-ra hűtött mikrotomkés használatával, fagyasztókamrás mikrotom készülék (Shandon Cryotome[®] Cryostat, Thermo Electron Corporation, Waltham, Massachusetts, USA) segítségével. A metszeteket *Superfrost UltraPlus*® (Thermo Fisher Scientific, Gerhard Menzel GmbH&Co., Braunschweig, Germany) tárgylemezekre vittük fel, majd ezeket metanol (metil-alkohol) és aceton (dimetil-keton) 1:1 arányú keverékével fixáltuk 10 percig. Szobahőmérsékleten történő szárítás után 20 percig 4 °C-on nedves kamrában pH 7,4-re beállított PBS-ben inkubáltuk. Ezt követően a nem specifikus proteinkötő helyek blokkolása céljából speciális proteinblokkoló oldatot (Protein BlockSerum Free, Code No. X0909, Dako Cytomation, Glostrup, Denmark) vittünk a metszetekre 30 percre, 37°C-os termosztátban. PBS mosás után tricellulin (TRIC), occludin (OCLN) és CD31 primer antitestekkel (8. táblázat) a metszeteket egy éjszakán át ("overnight") 4 C-on, nedves kamrában inkubáltuk (higítás 10%-os BSA-ban). A metszeteket ismételten PBS-ben mostuk 3x5 percig, majd másodlagos antitestként Fluorescence Alexa Fluor 488 (FITC)(donkey-antimouse, Invitrogen, Molecular ProbesTM, Eugene, Oregon, USA) és/vagy Alexa 568 (goat-antirabbit, Invitrogen, Molecular ProbesTM, Eugene, Oregon, USA) jelölt antitestekkel kezeltük (1:200 higítás) 30 percig. A magfestéshez és lefedéshez DAPI-t (koncentráció: 1,5 µg/ml) tartalmazó Vectashield Mounting Medium (Cat.No.H-1200, Vector Laboratories, Inc.Burlingame, CA, USA) fedőanyagot használtunk. A fagyasztott, jelölt metszeteket Pieper FK-7512-IQ CCD Kamerával (Pieper GmbH, Schwerte, Germany) felszerelt Leica DMRXA széleslátóteres fluorescens mikroszkóppal, adott hullámhosszú ScAB gerjesztési maximumot adó fluorescens fény segítségével vizsgáltuk és fotóztuk, majd a képet Leica CW4000 FISH Visualisation and Documentation Software (Leica Microsystems Imaging Solutions Ltd., Wetzler, Germany) segítségével rögzítettük. A fagyasztott metszeteket BioRad Radiance 2100 laser confocalis scanning mikroszkóp és LaserSharp 2000 Software (MRC1024, Bio-Rad Laboratories Ltd., Hercules, CA, USA) használatával is vizsgáltuk.

3.5. Morfometriai vizsgálatok

A claudin1, claudin2, claudin3, claudin4, claudin5, claudin 7, tricellulin, EGFR, syndecan-1 és β-catenin immunreakciókat digitális morfometriai vizsgálattal értékeltük. Az összes metszetet, melyen immunreakció történt *Mirax Panoramic MIDI és Mirax Panoramic SCAN digital slide scanner* készülékkel (3D HISTECH Ltd., Budapest) digitalizáltuk. Tizenöt át nem fedő területet 40-szeres virtuális objektív nagyítással fotóztunk ki az immunreakciót mutató metszetről. A különböző immunreakciók erősségét és kiterjedését *Leica QWin Software* (Leica Microsystems Imagine Solutions, Cambridge, UK) segítségével mértük le és értékeltük. Az immunreakciók értékelhetőségi alapszintjét, a háttér zavaró nem specifikus jeleit, a festődési intenzitás eltéréseit és a kisebb zavaró eltéréseket minden mintánál külön figyelembe véve korrigáltuk.

3.6. Statisztikai analízis

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

3.7. PCR vizsgálatok

3.7.1. RNS kinyerése szövetmintákból

A vizsgált fehérjére vonatkozóan, a szabályozási szint megállapítása végett mRNS expresszió vizsgálatokat végeztünk.

Az 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 Eppendorf csőbe 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 (Függelék: 1 sz.melléklet). *NanoDrop 1000 Spectrophotometer* (ThermoFisher Scientific Inc., Wilmington, DE, USA) készülékkel OD mérés alapján ellenőriztük a kapott nukleinsav tisztaságát és koncentrációját.

3.7.2. RNS-cDNS átírás (cDNS szintézis)

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, Cat. No. 4387406) alkalmazásával történt. *Eppendorf Mastercycler gradient* (Eppendorf Scientific Inc., Westbury, NY, USA) készüléken ribonukleáz inhibitor jelenlétében reverz transztkriptázt (Applied Biosystems, Fosters City, CA, USA) és random hexamert (Applied Biosystems) használva a gyártó utasításai szerint végeztük el az átírást. (10. táblázat)

Reagens	Gyártó	Térfogat (µl)	Reakció hố (°C)	Reakció idő
2xRT Buffer	Applied Biosystems	10	25	10 min
20xRT	Applied Biosystems	1	37	60 min
Enzyme Mix	Applied Diosystems	1	51	00 1111
DEPC H ₂ O	Eppendorf	9_x	95	5 min
(nuclease free)	Eppendorr	<i>)</i>	,,	5 1111
mRNS (2 µg)		Х	4	∞
Total per		20		
reakció		20		

10. táblázat RNS-cDNS átírás paraméterei

3.7.3. Primer tervezés specifikus mRNS meghatározásához

Adott génekre specifikus primereket terveztünk AlleleID 6.01 (Premier Biosoft International, Palo Alto, CA, USA) primer design software segítségével.

A CLDN1 és TRIC gének esetében - a genomiális DNS amplifikációjának elkerülése miatt - a célprimert az exon-exon határra terveztük. A CLDN3, -4, -5 gének csak egy exont tartalmaznak. 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. A felhasznált primerek tulajdonságait és szekvenciasorrendjét a 11. táblázat tartalmazza.

3.7.4. qPCR

A minta/termék referencia (housekeeping) génhez (12. táblázat) viszonyított mRNS mennyiségét szintetizált cDNS felhasználásával valósidejű PCR vizsgálattal állapítottuk meg.

A célfehérjét meghatározó mRNS mennyiségének vizsgálatára SYBR Green technológiával működő valós idejű polymerase láncreakciót (Real-time RT-PCR, qPCR) végeztünk ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) rendszeren. Belső kontrol (housekeeping, referencia) génként az ABL (BCR-ABL oncogen) és 36b4 (ARP, human acidic ribosomal phosphoprotein-PO) géneket

használtuk fel. A primer specifikus amplifikációt olvadáspont (melting) analízis és 2%os agaróz gélelektroforézis használatával értékeltük. A primereket 60°C-os annellációs hőmérsékletre terveztük. A végső 20 µl reakciókeverék 10 µl Power SYBR Green PCR Master Mix-et (Applied Biosystems), 0.4 µl 25 µM forward és reverse primert, 8.2 µl DEPC/RNase mentes vizet és 1 µl template cDNS-t tartalmazott.

Az amplifikációt a következő beállítási paraméterekkel végeztük el:

Inkubáció: 95°C - 10 min, majd 45 cikluson át 95°C - 15 sec, 72°C - 15 sec, 60°C - 60 sec.

Ezt követően olvadáspont elemzést végeztünk a következő paraméterekkel:

felfűtés 95°C - 20 sec, lehűtés 45°C - 10 sec, újrafűtés 95°C - 0.11°C/sec sebességgel. A qPCR vizsgálatok során az adatok statisztikai értékeléséhez a REST software-t (Relative Expresssion Sofware Tool; www.wzw.tum.de/gene-quantification) használtuk.

Gén neve	Primer sequencia (5'-3')	Amplicon méret
Referenciagén (house	keeping)	
ABL	Sense ACGAGTCTGGTTGATGCTGTG	105
	Antisense GGCGGACTGTGGCTTTGG	
36b4	Sense AGATGCAGCAGATCCGCAT	158
	Antisense ATATGAGGCAGCAGTTTCTCCAG	
Cél gének (target)		
TRIC	Sense TGGAACAACAGGAGATAAATGAGC	86
	Antisense GTCTCTTTGTCTGTCACCACTG	
CLDN-1	Sense GTGCGATATTTCTTCTTGCAGGTC Antisense TTCGTACCTGGCATTGACTGG	113
CLDN-3	Sense CTGCTCTGCTGCTCGTGTCC Antisense TTAGACGTAGTCCT GCGGTCGTAC	129
CLDN-4	Sense GGCTGCTTTGCTGCAACTGTC Antisense GAGCCGTGGCACCTTACACG	108
CLDN-5	Sense TTCCTGAAGTGGTGTCACCTGAAC Antisense TGGCAGCTCTCAATCTTCACAG	97

11. táblázat. A qPCR vizsgálatokhoz használt primerek és referenciagének jellemzői

Gén neve		Primer sequencia $(5'-3')$
KRAS codon 12	Sense	GAATATAAACTTGTGGTAGTTGGACCT
	Antisense	GGTCCTGCACCAGTAATATG
KRAS codon 13	Sense	TATAAACTTGTGGTAGTTGGCCCTGGT
	Antisense	GGTCCTGCACCAGTAATATG
EGFR codon 18	Sense	GTGACCCTTGTCTCTGTGTT
	Antisense	CCAGGGACCTTACCTTATACA
EGFR codon 19	Sense	CACAATTGCCAGTTAACGTCTTC
	Antisense	TTAGGATGTGGAGATGAGCAGG
EGFR codon 20	Sense	CAGGAAGCCTACGTGATG
	Antisense	TGATTACCTTTGCGATCTG
EGFR codon 21	Sense	CAGGGTCTTCTCTGTTTCAG
	Antisense	CCTAAAGCCACCTCCTTACT

12. táblázat A mutáció vizsgálatokhoz használt primerek jellemzői

3.8. KRAS mutáció vizsgálata Mikrofluid Alapú Restrikciós Fragment Hossz Polymorphismus elemzéssel (Restriction Fragment Microfluidic Based Detection, RFMD)

A DNS izoláláshoz FFPE szövetmintákból steril körülmények között 1,7 ml-es Eppendorf csőbe (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) 4 db 3-5 µm vastagságú mintákat metszettünk.

A gyártó útmutatásait követve (2.sz melléklet), QIAmp®DNA FFPE Tissue Kit (QIAGEN, Hilden, Germany, Cat.No.56404) segítségével DNS-t izoláltunk. A kinyert DNS mennyiségét (abszorpciós vizsgálat, OD ellenőrzés) 260 nm hullámhosszon mérve NanoDrop spectrophotometerrel (ND-1000, Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, DE, USA) határoztuk meg.

A DNS-t AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) DNS polymerase enzimmel (Mastercycler® thermal cycler készülék, Eppendorf AG, Hamburg, Germany) szaporítottuk fel.

A reakciókeverék összetétele reakciónként és mintánként a következő volt:

- 2.5 μ l 10x PCR puffer+Mg2⁺,
- 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 Bg1I restrictios endonuclease felismerő részét.

A felhasznált primer párokat a 12. táblázat mutatja.

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 mutáció*ra 80U BgII –vel emésztettük (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA). Az enzimatikus 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, ill mikrofluid alapú *Experion* (BioRad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) gélelektroforézis rendszerrel *BioRad ExperionTM DNA 1K Analysis Kit* segítségével vizsgáltuk.

3.9. EGFR mutáció vizsgálata

EGFR 18, 19, 20, 21 primerek jellemzőit a 12. táblázat tartalmazza. A 18-21 exonok amplikonjait *High Resolution Melting* (olvadáspont analízis) eljárással Roche Light Cycler 480 Real Time PCR készülékkel (Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, IN, USA) High Resolution Melting Mix (Cat.No.04909631001, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) használatával elemeztük. A kiértékelést a gyártó által a gépbe épített Gene scanning programmal végeztük.

3.10. Direkt szekvenálás

Az olvadáspont analízis eredményét direkt szekvenálással validáltuk. A direkt szekvenálást a 18 és 21 exon vizsgálatait követően az eredmények egyértelmű vad típusú volta miatt a futási kontrollokon végeztük el, valamint a 19 és 20 exonokat

validáltuk ezzel a független módszerrel is, mivel ezeknél az exonoknál az olvadáspont elemzés nem adott egyértelmű eredményt.

A reakciót *BigDye*® *Terminator v1.1 cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems, Foster City, USA) felhasználásával végeztük a gyártó által mellékelt protokoll szerint. A szekvenáló reakciót *BigDye X terminator purification kit* (Applied Biosystems, Foster City, USA) segítségével történő tisztítás és sequenáló PCR után ABI 3130 Genetic Analyser System (Applied Biosystems, Foster City, USA) készülékkel analizáltuk. (6. melléklet)

4. EREDMÉNYEK

4.1. Az FLC makroszkópos képe

A vizsgált 11 FLC eseteink között 8 sebészeti resecátumot vizsgáltunk, mindegyik esetben az FLC jellegzetes makroszkópos megjelenése volt megfigyelhető. Az eltávolított specimeneken a tumor metszéslapja lágy tapintatú, sárgás-fehér színű, kis centralis vagy excentrikus, különböző vastagságú, elágazódó, lamellaris struktúrájú kötőszövetes heggel, septumokkal. (6. ábra)

A tumorok átlagos átmérője 86x73x76 mm volt. (5. táblázat)

A tumor körüli májszövet architektúráját normálisnak láttuk, fibrosist vagy cirrózist nem lehetett kimutatni.

6. ábra Az FLC makroszkópos képe



Sebészileg rezekált FLC noduláris szerkezettel, kis excentrikus, kötőszöveti heggel (csillaggal jelölve) és vékony septumokkal.

4.2 A FLC szövettani jellegzetességei

A tanulmányban vizsgált 11 FLC eset mindegyike tipikus hisztopatológiai képet mutatott. A tumor nagy, poligonális, granuláris szerkezetű, eosinophil citoplazmával rendelkező daganatsejtekből állt, melyek oszlopokba vagy hálózatokba rendeződtek vagy helyenként glanduláris struktúrát alkottak. A tumorsejtek citoplazmájában alkalmanként "pale"-testeket (hyalin/colloid inclusiós testek), intranuclearis pszeudoinclusiókat, helyenként nagy prominens nucleolusokat és cholestasist lehetett megfigyelni, osztódást alig láttunk. A tumorsejtek csoportjai jellegzetes lamellarislemezes szerkezetű, fibrotikus sövényekkel, septumokkal voltak tagolva. (7. ábra)

7. ábra Az FLC szövettani képe



A prominens nucleolussal rendelkező, eosinophil FLC tumorsejteket válozó szélességű, lamellaris szerkezetű fibrotikus lemezek tagolják. H&E (A x200, B x400)

A vizsgált daganatszövet mintákban necrosis nem volt, kisfokú kalcifikációt két esetben találtunk. Világos sejtes FLC variáns a vizsgált eseteink között nem fordult elő.

A tumor környéki májszövet 5 esetben teljesen normál struktúrát mutatott, míg egy mintában észleltünk enyhe, nem specifikus portális gyulladást.

4.3 Az immunhisztokémiai és morfometriás vizsgálatok eredménye

Az immunhisztokémiai vizsgálatok az FLC-re jellegzetes eredményt adták. A *CK7* (8/c. ábra), *CK8* és *CK18*, valamint a *HSA*(*HepPar1*) (8/d. ábra), a pozitív volt, az *AFP* és a *CK19* azonban negatív volt az összes vizsgált FLC esetében.

8. ábra Az FLC immunhisztokémiai jellemzői. (x200)



c./ Intenzív CK7 és d./ HSA (HepPar1) pozitív FLC tumorsejtek immunhisztokémiai festéssel.

A glypican-3 (GPC3) esetek jelentős többségében negatív eredményt adott, csak két alkalommal jelent meg gyenge, fokális citoplazmatikus reakció a tumorsejteken.

9. ábra Fokális glypican-3 (GPC3) immunhisztokémiai reakció FLC-ban. (x200)



A *CLDN1* és -2 hasonló festődési mintázatot mutatott mind a három vizsgált tumorcsoportban. Az anti-CLDN1 antitesttel végzett immunhisztokémiai reakció intenzív, membranosus, a tumorsejteket teljesen körülvevő, jellegzetes "méhsejt" ("honeycomb") szerű elrendeződésben jelent meg. (10./e ábra) A morfometriai vizsgálatok alapján szignifikánsan magasabb CLDN1 expressziót figyeltünk meg a CCC esetében a kontroll csoportokhoz képest, sorendben a cHCC-nél és FLC-nél, illetve a legalacsonyabb CLDN1 expresszió a normal májszövetben mutatkozott. A FLC és cHCC csoportok közötti különbség CLDN1 expresszió tekintetében is szignifikánsnak bizonyult. (15. ábra)

10. ábra CLDN1 és CLDN2 immunhisztokémiai megjelenése FLC-ban



e./ Pozitív, membranózus CLND1immunhisztokémiai reakció FLC tumorsejteken, mely jellegzetes "méhsejt"-hez hasonlatos szerkezetet mutat, a betétképen jól látható a nuclearis pozitivitás. (x200, betétkép x600) f./ Granuláris és szubmembranózus lokalizációjú CLDN2 immunhisztokémiai reakció FLC-ben. (x200, betétkép x600)

A CLDN1 immunhisztokémiai vizsgálat során a 11 FLC közül 4 esetében a daganatsejtek 0,5 %-ában észleltünk magi pozitivitást. (10/e. ábra betétkép). A cHCC-s betegek között – az FLC-vel megegyezően - szintén 4 esetben találtunk CLDN1 magi pozitivitást, míg a CCC-ben és a normál májszövetben egyáltalán nem észleltünk a sejtmagban pozitív festődést.

Az FLC CLDN2 expressiója kifejezetten erős volt, az immunreakció granuláris

citoplazmatikus/szubmembranózus jellegű pozitivitást adott a tumorsejteken, (10./f ábra) de a különbség a normál májhoz viszonyítva nem volt szignifikáns.

A tumorcsoportok CLDN2 expresszióját vizsgálva azt találtuk, hogy mindegyik csoport között szignifikáns különbség adódott, az adatok alapján így megállapítható, hogy a FLC-ban szignifikánsan magasabb CLDN2 expresszió jelent meg cHCC-hez és a CCC-hez viszonyítva. (15. ábra)

A *CLDN3* esetében gyér, igen gyenge intenzitású pozitivitást lehetett detektálni a cHCC és FLC tumorsejteken, a tumorcsoportok és normal máj között szignifikáns különbség nem mutatkozott.

A CLDN4 és CLDN7 esetében az immunhisztokémiai reakciók cHCC és FLC tumorcsoportokban negatívnak mutatkoztak, ellentétben a CCC-vel, ahol erős, intenzív, membranózus pozitiv festődést lehetett észlelni CLDN4 esetében. A CLDN4 protein expressziója immunhisztokémiai vizsgálatok és morfometria szerint szignifikánsan magasabb CCC-ben, mint a többi vizsgált csoportban, ahol gyakorlatilag negatívnak bizonyult.(15. ábra)

A *CLDN5* a vizsgált 11 FLC közül 9 esetében különböző intenzitással mutatkozott pozitívnak (12/a. ábra) ellentétében a cHCC-vel, CCC-vel és a normál kontroll májjal, melyekben negatív volt. A morfometriás vizsgálatokkal kapott adatok alapján végzett statisztikai vizsgálatok szerint a CLDN5 protein expressziója szignifikánsan magasabb volt a normál májhoz viszonyítva. Az FLC-ban szignifikánsan magasabb CLDN5 expressziót találtunk a cHCC-hez viszonyítva is. (15. ábra) A CLDN-5 immunreakció többnyire membranózus formában jelent meg, 3 esetben – a membranosus pozitív részek mellett - helyenként gyenge citoplazmatikus pozitivitás is észlelhető volt az FLC tumorsejeteken. Az 5 sebészetileg rezekált FLC mintában a diffuse eloszlás mellett fokálisan emelkedett intenzitásban látszott CLDN5 pozitivitás, a tűbiopsziás mintákban intenzív pozitív festődést észleltünk. A FLC tumorsejtek mellett az endothelsejtek, a normál kontroll máj endothelje is CLDN5 pozitív volt, utóbbi kettő *CD31-el* és *CD34-*el is pozitívnak mutatkozott.

Az anti-*CD34* és *CD31* immunhisztokémiai reakció jellegzetes lineáris poztivitás formájában látszott a vaszkuláris endothelen minden vizsgált csoport esetében. (12/c. ábra) A fenti két endothel marker antitesttel a FLC tumorsejtek negatívak voltak.

A *tricellulin* (TRIC) immunhisztokémiai vizsgálatok során az FLC-ben pszeudoglanduláris szerkezetnek megfelelően, illetve a tumorsejtek mentén néhol lineáris, máshol pontszerű membranózus pozitivitás formájában mutatkozott a reakció. (12/d. ábra) A normál májban a TRIC pontszerű immunreakciót mutatott a három sejt kapcsolatok területén. Intenzív reakció volt látható a hepatocyták apikális pólusán és a biliaris epithelsejteken. (11/a. ábra) Több helyen is kettős "sínpár" szerű pozitív részeket és magi pozitivitást is tapasztaltunk, mely különösen az immunfluoreszcens jelöléssel volt jól megfigyelhető. (11./b ábra)

11. ábra TRIC (vörös) immunfluoreszcens képen cHCC-ban (a) és FLC-ban (b). A sejtmagvak DAPI festés után kékes színűek.

a.





A TRIC fehérje expressziója magasabb volt a tumorok jól differenciált trabecularis vagy pseudoglandularis részeiben, míg a solid és anaplasticus jelllegű részeken jóval alacsonyabb volt, vagy hiányzott.

A TRIC immunreakció formája és intenzitása hasonló volt a tumorokban és a tumor környéki májszövetben, azonban a pozitív tumorsejtek aránya a vizsgált tumorokban szignifikánsan alacsonyabb volt a normál májnál. (15. ábra) **12. ábra** A TRIC, CLDN-5 és endothelmarkerek (CD31, CD34) immunhisztokémiai vizsgálata FLC-ban.



a./ Különböző intenzitással, membranózus jellegűen festődő CLDN-5 pozitív FLC daganatsejtek. (x200, betétkép x600)

b./ CD34 és c./ CD31 immunhisztokémiai reakciók.

Az érképletek és endothel intenzív pozitív, az FLC daganatsejtek negatívak. (x200) d./ Tricellulin (TRIC) imunhisztokémiai reakció FLC-ben. A pseudoglandularis szerkezetnek megfelelően illetve a tumorsejtek mentén pontszerű pozitivitás mutatkozik. (x600, betétkép x1200) Az *EGFR* immunhisztokémiai vizsgálat intenzív, plazmamembránhoz asszociált pozitivitást adott. (13. ábra) Az EGFR protein expressziója az összes vizsgált tumorcsoportban magasabb volt a normál májhoz viszonyítva. (16. ábra) A morfometriás vizsgálatok adatai alapján végzett statisztikai számításaink szerint az FLC-ben - a CCC csoporthoz hasonlóan - a cHCC-hez és a normál kontroll májhoz viszonyítva is szignifikánsan magasabb EGFR protein expresszió igazolható. Az EGFR protein expresszió tekintetében az FLC és CCC csoportok között csak minimális (nem szignifikáns) különbséget találtunk. (15. ábra)

A β -catenin immunreakció membranózus pozitivitást jelzett a vizsgált tumorokban. A pozitív kontroll hepatoblastoma mintákon észlelhető nuclearis transzlokáció - magi pozitivitás - sem az FLC sem a cHCC csoportokban nem volt kimutatható.

A syndecan-1 (CD138) immunhisztokémiai vizsgálat mindegyik vizsgált tumorcsoport esetében membranózus-szubmembranózus pozitivitást mutatott. Normál máj esetében sinusoidalis pozitív festődést láttunk. (14. ábra) A legkiterjedtebb pozitivitást cHCC esetében észleltük, de az FLC esetében is intenzív pozitivitás mutatkozott. FLC és cHCC esetében is intenzívebb pozitivitást láttunk a CCC-hoz viszonyítva. (15. ábra) A morfometriás vizsgálatok alapján a SYN-1 protein expresszió a CCC-hez viszonyítva FLC-ben és cHCC-ben is szignifikánsan magasabbnak igazolódott, viszont nem volt szignifikáns különbség az FLC és a cHCC csoportok között. (15. ábra) 13. ábra Az EGFR immunhisztokémiai vizsgálatok eredménye



A./ EGFR nomál májon (x200) B./ intenzív EGFR pozitív immunhisztokémiai reakció FLC-ben (x200) C./ erősen EGFR pozitív területek cHCC-ben (x200) és D./ CCC-ben (x200)

FLC fibrolamellaris hepatocellularis carcinoma, *cHCC* "konvencionális" hepatocellularis carcinoma, *CCC* cholangiocellularis carcinoma, *NL* normál máj, *EGFR* epidermal growth factor receptor



14. ábra A syndecan-1 (SYN-1; CD138) immunhisztokémiai vizsgálatok eredménye

a./ sinusoidalis SYN-1 immunhisztokémai reakció nomál májon (x200) b./ intenzív SYN-1 pozitív immunhisztokémiai reakciót adó FLC tumorsejtcsoportok (x200) c./ erősen SYN-1 pozitív területek cHCC-ban (x200) és d./ gyengébben festődő SYN-1 pozitív tumorsejtek CCC-ban (x200)

FLC fibrolamellaris hepatocellularis carcinoma, *cHCC* "konvencionális" hepatocellularis carcinoma, *CCC* cholangiocellularis carcinoma, SYN-1 syndecan-1 (CD138)



15. ábra A CLDN és TRIC immuhisztokémiai vizsgálatok morfometriás eredménye.

Szignifikáns összefüggések: *p<0,05; ** p<0,001 FLC fibrolamellaris hepatocellularis carcinoma, *cHCC* "konvencionális" hepatocellularis carcinoma, *CCC* cholangiocellularis carcinoma, *NL* normál máj, *CLDN* claudin



16. ábra Az EGFR immunhisztokémiai vizsgálatok morfometriás eredménye

Szignifikáns összefüggések: *p < 0,05; ** p < 0,001. FLC fibrolamellaris hepatocellularis carcinoma, *cHCC* "konvencionális" hepatocellularis carcinoma, *CCC* cholangiocellularis carcinoma, *NL* normál máj, *EGFR* epidermal growth factor receptor

17. ábra A syndecan-1 (CD138) immunhisztokémiai vizsgálatok morfometriás eredménye



Szignifikáns összefüggések: *p<0,05; ** p<0,001. FLC fibrolamellaris hepatocellularis carcinoma, *cHCC* "konvencionális" hepatocellularis carcinoma, *CCC* cholangiocellularis carcinoma

	FLC	cHCC	CCC	Normál máj
CLDN1	+	++	+++	+/-
CLDN2	++	+	-	+
CLDN3	+	+	+/-	+/-
CLDN4	-	-	+++	-
CLDN5	+++	-	-	endothel
CLDN7	-	-	-/+	-
OCLN	+	+	+	+
TRIC	+	++	+	+++
EGFR	++	+	++	-
β-catenin	+/-	+/-	+	+/-
SYN-1 (CD138)	++	++	+	sinusoid
AFP	-	++	-	+
Hep-Par1 (HSA)	+++	++	-	++
GPC3	+/-	+/-	-	-
СК8, 18	-	-	-	+
СК7, -19	+	-	++	epeút

13. táblázat Az immunhisztokémiai vizsgálatok eredményének összefoglalása

4.4. Az mRNS génexpresszió vizsgálatok

A mRNS expressziós vizsgálatok során a cHCC csoport magasabb CLDN1 és TRIC mRNS expresszióját találtuk FLC és a normál máj csoporthoz viszonyítva. Ehhez képest a normál máj CLDN1 mRNS és TRIC mRNS expressziója alacsonyabb volt. Az FLC esetében találtuk a legalacsonyabbnak a CLDN1 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. (18. ábra)

Ki kell hangsúlyozni azonban, hogy a fent leírt mRNS expresszióban mutatkozó kicsiny különbségek egyike sem bizonyult statisztikailag szignifikánsnak.

18. ábra qPCR vizsgálattal detektált mRNS expresszió



FLC fibrolamellaris hepatocellularis carcinoma, *cHCC* "konvencionális" hepatocellularis carcinoma, *NL* normál máj

4.5 Az EGFR és KRAS mutációs vizsgálatok eredménye

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

19. ábra. A KRAS gén 12 valamint 13. codon pontmutációjának kimutatása.



A specifikusan amplifikált PCR termékek restrikciós endonukleázos emésztést követő agaróz gélelektroforézis képe

Az olvadáspont elemzéssel (HRM) és direct sequentia analízis vizsgálatokkal mutációt az EGFR gén 18 19 20 és 21 exonokban nem tudtunk kimutatni. (20. ábra)





A vizsgált minták homogén "vad" típusú csoportot alkottak. A görbék normalizálás után gene scanning softverrel kerültek kiértékelésre.

5.MEGBESZÉLÉS

Az FLC a HCC egyik ismert variánsa (altípusa), melynek pontos etiológiája és patogenezise jelenleg ismeretlen. Klinikai viselkedésén túl számos immunhisztokémiai marker expresszálásában vagy annak hiányában különbözik a cHCC-től, a CCC-től és a hepatoblastomától is. [7]

Az FLC citokeratin profiljára jellemző, hogy hepatocytára (CK8, -18) és biliáris hámra (CK7) jellemző citokeratinokat egyaránt expresszál, melyet saját vizsgálataink és az irodalomban közölt tanulmányok [6,11,192] is alátámasztanak.

Újabb eredmények bizonyították, hogy a cHCC differenciáltságától függően 56-89% gyakorisággal, a FLC pedig 64% -ban expresszál egy heparin sulfate proteoglikánt, a glypican-3-at (GPC-3). A GPC-3-at a fetalis máj és a placenta is termeli, de nem mutatható ki a normál felnőtt májban. [6,193,194] Saját vizsgálataink szerint a 11 FLC esetek közül 2-ben észleltünk gyengén pozitív GPC-3 festődést, ami ezen marker viszonylag gyenge diagnosztikus értékére utal ebben a tumorban.

Munkánk során elsőként igazoltuk, hogy a CLDN fehérjék expressziós profilja FLC-ban megváltozik. Megállapítható, hogy a FLC a cHCC-hez ugyan jobban hasonlít, mint a CCC-hez, azonban mindkettőtől jelentősen különbözik egyes TJ proteinek mennyiségi és minőségi jellemzőinek tekintetében.

A claudinok a TJ proteinek legfőbb transzmembrán komponensei és fontos barrier funkciókat látnak el, ugyanakkor felelősek a hepatocyták sinusoidokat (basolateralis) és az epecsatornákat (apicalis) elkülönítő polarizációs tulajdonságáért. [122,146,195]

A TJ proteinek szövetspecifikus módon expresszálódnak [124] és újabb eredmények szerint részt vesznek a szignáltranszdukció folyamatában, befolyásolva a sejtproliferációt és differenciálódást. [125,145]. A legtöbb epithelsejt többféle claudint is expresszál, melyek homo- és heterodimereket alkotva egymással és más TJ proteinekkel is bonyolult kapcsolatban állnak. [146] Az emlősökben különböző eloszlásban és funkcionális jellemzőkkel 24 féle CLDN családba tartozó transzmembrán proteint írtak le, melyhez a közelmúltban 3 további claudin fehérje leírása társult. A TJ funkció szabályozása alapvetően fontos a paracelluláris permeabilitás változásainak létrejöttében és többféle alapvető élettani funkcióhoz is nélkülözhetetlen. [196]
Munkánk során igazoltuk, hogy az FLC alacsonyabb CLDN1 és magasabb CLDN2 protein expressziót mutat a cHCC-nél és CCC-nél, ugyanakkor mindkét claudin szignifikánsan magasabban mértékben expresszálódik FLC-ben, mint a normál kontroll májban. A CLDN1 általában az epithelsejtekben expresszálódik nagyobb mértékben, így fenntartja sejtek polarizációját és biztosítja a barrier funkciót. Dysregulációja összefüggésben állhat a molekuláris jelátviteli utak megváltozásával egyes laphámrákok esetén, valamint elképzelhető, hogy egyes tumorok agresszívabb viselkedésért is felelős lehet. [135,197] A CLDN1 csökkent expresszióját igazolták néhány olyan mirigyhám eredetű tumorban, mint például az emlőcarcinoma [134], az I. típusú endometrialis carcinoma [198], a colorectalis carcinoma [199] továbbá néhány egyéb malignus daganat esetében is. [125,126,146,156,159]

A CLDN1 hepatocarcinogenesisben betöltött szerepéről az eddig megismert adatok vitatottak. Egyes kutatók vizsgálatai szerint a CLDN1 expressziójának hiánya összefüggést mutat a HCC malignus viselkedésével. [137] Azonban azt is kimutatták, hogy a CLDN1 in vitro a PKC delta szignáltranszdukciós folyamatokon keresztül kritikus szerepet játszik a HCC sejtvonalak inváziós képességének kialakulásában. [127] Vizsgálataink során azt találtuk, hogy az FLC, a cHCC és a CCC mindegyike a normál májszövetnél szignifikánsan erősebben expresszálja a CLDN1 proteint. A CLDN1 protein expresszió mértéke legerősebb a CCC, majd a cHCC, legvégül az FLC esetében és a tumorok közötti expresszió mértéke is szignifikánsan különbözik. Habár mindegyik vizsgált tumor malignus, de megállapítható, hogy a CLDN1 protein expresszió mértéke fordítottan arányos a tumor invazív képességének mértékével, így ezen eredmény támogatja Yoon CH és munkatársainak fenti megállapítását.

A CLDN2 - mely vizsgálataink szerint jobban expresszálódik FLC-ben, mint cHCC és CCC esetében - összefüggésben van a magasabb paracelluláris ionpermeabilitással, a pórusképződéssel és a transzepithelialis elektromos resistenciával (TER). [200]

A CLDN2 felül és alulszabályozódását már számos tumor esetében leírták. [135,198]. A fokozott expresszió FLC-ban feltehetőleg kapcsolatos ezen daganat sajátos morfológiai megjelenésével, a különösen a nagy, poligonális jellegű sejtformák kialakulásával.

A CLDN4 expressziója immunhisztokémiai vizsgálatokkal - hasonlóan cHCC-

hez - FLC esetében sem mutatható ki. Munkacsoportunk korábbi vizsgálataink során már igazolta a CLDN4 magas expresszióját CCC-ben. [147] A CLDN4 protein különböző mértékben fokozottabb expresszióját korábban szintén bizonyítottuk normál epeúti hámon és cholangiocellularis tumorokon. [148] A CLDN4 protein megjelenését intrahepaticus CCC és expressiójának hiányát cHCC esetében immunhisztokémiai vizsgálatok mellett génexpressziós analízissel is alátámasztották. [149] Az a megfigyelésünk, hogy az FLC tumorsejtek még a mirigyformáló részeken sem expresszálják a CLDN4 proteint arra enged következtetni, hogy az FLC differenciálódása inkább hepatocyta, mint cholangiocyta irányú, habár jellemzően CK7 pozitív és az AFP negatív.

Különösen érdekes azon megfigyelésünk, hogy egy - korábban elsősorban endothel specifikus TJ protein – a CLDN5 jelentősen magas expresszióját találtuk FLC esetében. Több kutatócsoport igazolta, hogy a CLDN5 megjelenhet a normál epithelsejtekben [201], a retinális epithelium fejlődése során [202] és a normál tüdő hengerhám sejtjein, valamint pneumocytákban. [203] A CLDN5 protein expresszióját azonban megfigyelték már tumorokban is; [159], így az emlő Paget kórjában [156] és tüdő adenocarcinoma [203] esetében. Az említetteken kívűl a CLDN5 jelenléte igazolható kutyák angiosarcomájában, perianalis ("hepatoid gland") tumoraiban; perianalis adenomáiban és gyengén differenciált carcinomáiban, továbbá emlőmirigy hyperplasiájában és adenomájában is. [204] Comper és munkatársai mutatták ki, hogy humán solid pseudopapillaris pancreas neoplasmában a CLDN5 és CLDN2 is intenzíven expresszálódik a citoplazmában ellentétben egyéb pancreas tumorokkal, melyek negatívak erre a két TJ proteinre nézve. Felvetették, hogy ez összefüggésben állhat ezen tumorok speciális morfológiai felépítésével. [205] Vizsgálatainkban a cHCC és a CCC mintákban nem mutatkozott a tumorsejtek CLDN5 expressziója, kivéve a daganatok vaszkuláris neoendothel sejtjeit. A vizsgált mintáinkon a CD34/31-et - mint a vaszkuláris endothel specialis markerét - csak az endothelsejteken találtuk pozitívnak, az FLC tumorsejtek CD34 és CD31 negatívnak mutatkoztak. Nem volt különbség az FLC és cHCC között a CD34 és CD31 festődés tekintetében. Jelenleg nincs egyértelmű magyarázat arra, hogy az FLC miért CLDN5 pozitív, ellentétben a cHCC-vel és a CCCvel, azonban ez a megállapítás arra enged következtetni, hogy ezek a tumorok jelentősen különböznek molekuláris biológiai tulajdonságaikban. A legújabb kutatási eredmények szerint a CLDN5 ösztrogén targetként szerepelhet a vaszkuláris endothelben, így a munkánk során FLC-ben igazolt jelentős CLDN5 expressziónak fontos szerepe lehet az FLC patogenesisében és esetleges jövőbeli újabb terápiák kidolgozásában.

Egyelőre még nem világos, hogy a tirozin-kináz, RAF-kináz és VEGF gátló sorafenib - melyet 2007 októbere óta használnak Európában a metasztatizáló cHCC célzott kezelésére - milyen megfontolásokkal alkalmazható FLC-ban. Az elsőként sorafenibbel kezelt, hyperammonaemiás encephalopathiával járó, többszörös áttétet adó FLC esetet már publikálták, azonban a betegség kimeneteléről a közlés nem ad információt. [31]

A syndecanok olyan transzmembrán proteoglikánok, melyek számos növekedési faktorral és extracelluláris matrix komponenssel kapcsolatban állnak és jelen vannak a normál májban és májtumorokban egyaránt [206,207]. Egyes kutatók vizsgálatai szerint a syndecan-1 (SYN-1) expressziója negatív korrelációt mutat a cHCC esetében a tumor differenciálódásával és progressziójával. [207] Saját eredményeink szerint FLC-ben és cHCC-ben magasabb SYN-1 protein expressziót találtunk CCC-hez viszonyítva, azonban nem volt szignifikáns különbség az FLC és a cHCC SYN-1 expressziója között. A tumorok osztályozására vonatkozóan további adatok nem állnak rendelkezésre, mert munkám során vizsgált cHCC és CCC esetek mindegyike grade II.-III.-nak felelt meg. A kapott eredmények arra engednek következtetni, hogy a CCC-ben kapott alacsonyabb SYN-1 expresszió ezen tumorok agresszívabb viselkedésével lehet összefüggésben. A fenti megerősítésére azonban a jövőben további vizsgálatokra van még szükség.

Összefoglalva, tanulmányunk hozzájárult a FLC további speciális jellemzőinek feltárásához. Ennek során számos a FLC, a cHCC és a CCC közötti, a TJ proteinek összetételében meglévő különbséget igazoltunk. (13. táblázat) Az eredmények alapján megfogalmazható, hogy a CLDN mintázat tekintetében az FLC inkább hasonlít a cHCC-re, mint a CCC-re. A FLC-nak a CLDN5 protein expresszálása jellegzetes és specifikus tulajdonságnak tekinthető, mely megkülönbözteti az FLC-t az vizsgált egyéb primer malignus májtumoroktól. A CLDN5 ennek alapján differenciál diagnosztikus markerként is felhasználható és további fontos információkat adhat a FLC pathogenesisének megértéséhez és esetleg további terápiás célpont is lehet. Munkánk további olyan eredményekkel egészítette ki az FLC speciális jellemzőit és a korábbi megfigyeléseket [92], mint a tumor fokozott EGFR expressziója. Megállapítható, hogy az FLC a cHCC-nél fokozottabban expresszálja az EGFR-t, ezenkívűl EGFR és KRAS mutációt sem hordoz, melyek alapján a jövőben ezen tumorok sikeres anti-EGFR kezelésének lehetősége merülhet fel.

6. KÖVETKEZTETÉSEK

- Elsőként mutattuk ki a TJ proteinek mintázatának jellegzetes változását FLCben.
- Kimutattuk a CLDN5 magas expresszióját FLC-ban, egyéb primer májtumorokkal szemben.
- A CLDN4 negativitása FLC-ban a tumor cHCC-hez való hasonlóságát igazolja és elkülöníti a CCC-től.
- Elsőként mutattuk ki a tricellulin expressziót FLC-ben és annak magi pozitivitását.
- 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 májráktól jól elkülöníthető. Az igazolt fokozott CLDN5 és EGFR expresszió jövőbeli terápiás célpont alapjául szolgálhatnak FLC-ben.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A fibrolamellaris carcinoma (FLC) a hepatocellularis carcinoma (HCC) ritkább előfordulású, jellegzetes szövettani megjelenést mutató altípusa, melyet fiatal korban, cirrózistól mentes májban való előfordulás jellemez és etiopatogenesise tisztázatlan. A tight junction proteinek (claudinok, occludin, tricellulin) eloszlása jellemző a különböző típusú normál szövetekre és eltérő formában mutatkozik a különféle daganatos megbetegedésekben.

Célunk volt ezért az FLC olyan sejtbiológiai tulajdonságainak karakterizálása, melyek segíthetnek a májrák egyéb formáitól való elkülönítésben, közelebb visznek a daganat etipatogenezisének megértéséhez és egyben terápiás célpontként is szolgálhatnak. FLC, HCC és cholangiocellularis carcinoma (CCC) eseteket vizsgáltunk immunhisztokémiai és molekuláris biológiai módszerekkel.

Eredményeink alapján megállapítottuk, hogy protein és mRNS szinten az FLC sejtkapcsoló struktúráinak tight junction (TJ) fehérjéi, sajátos változást, jellegzetes mintázatot mutatnak. Megállapítottuk, hogy a claudin (CLDN)1 a FLC-ban alacsonyabban expresszálódik, mint HCC-ben, azonban ez fokozottabb a normál májhoz viszonyítva. Leírtuk a CLDN1 nukleáris pozitivitását FLC-ben. A CLDN4 negativitása FLC-ben a tumor cHCC-hez való hasonlóságát igazolja és elkülöníti a CCC-től. Ennek alapján a claudinok expressziós mintázata FLC-ben a HCC-hez mutat hasonlóságot és különbözik a CCC-re jellemző képtől. Elsőként igazoltuk a tricellulin, mint a közelmúltban leírt új TJ fehérje komponens expresszióját FLC-ben.

Munkánk során elsőként írtuk le, hogy az FLC, az elsősorban endothel sejtekre jellemző CLDN5 proteint jelentős mértékben expresszálja, mely egyéb primer májcarcinomában nem észlelhető és az FLC szövettani diagnosztikájában alkalmazható. Kimutattuk az EGFR fehérje fokozott expresszióját FLC-ben és egyúttal igazoltuk, hogy emögött nem áll az EGFR gén mutációja. Emellett az FLC-ben sem a KRAS gén mutációja, sem pedig a β-catenin mutációt jelző magi expressziója nem volt igazolható.

A fentiek alapján megállapítottuk, hogy az FLC a HCC-k olyan speciális altípusa, mely a TJ protein mintázat alapján egyéb primer májrákoktól jól elkülöníthető. Az általunk feltárt molekuláris eltérések a jövőben új terápiás célpontok alapjául szolgálhatnak FLC-ben.

8. ABSTRACT

Fibrolamellar carcinoma (FLC) is a subtype of hepatocellular carcinoma (HCC) presenting with characteristic histology and showing relatively low incidence. The tumor characteristically occurs at young age and in non-cirrhotic liver, and its etiopathogenesis remains as yet unclear. The expression pattern of tight junction proteins (claudins (CLDN), occludin and tricellulin) characterizes different types of normal tissue moreover; different tumor types reveal irregular variations.

Our aim therefore was to explore the cell biological characteristics of FLC which might help to distinguish this tumor from other hepatic malignancies and bring us closer to understand its etiopathogenesis, and to discover markers which might also serve as therapeutic targets. FLC, HCC and cholangiocellular carcinoma (CCC) cases were investigated by immunohistochemistry and molecular biological methods.

Based on our results we were able to reveal that the tight junction (TJ) proteins show characteristically altered mRNA and protein expression patterns in FLC. CLDN1 showed decreased expression in FLC compared with HCC, but increased expression when compared with normal liver tissue. We described CLDN1 nuclear positivity in FLC. CLDN4 negativity in FLC proved the similarity of the tumour to conventional HCC, distinguishing it from CCC. Accordingly, the CLDN expression pattern in FLC is similar to that observed in HCC and differs from the pattern detected in CCC. Our group was the first to describe the expression of tricellulin, a recently described protein component of TJs in FLC.

Further, we were the first to prove that tumor cells of FLC express a considerable amount of CLDN5, a protein otherwise primarily found in endothelial cells. This feature can not be detected in HCC and CCC; it could therefore be used in the histological diagnostics of FLC. We showed increased expression of EGFR in FLC and proved that this finding did not imply the mutation of the EGFR gene. Furthermore, neither KRAS gene mutation, nor the nuclear expression of beta-catenin indicating its mutation was detected in FLC.

Taken together, it can be stated that FLC is a specific subtype of HCC, which can be well distinguished from primary hepatic carcinomas based on the expression profile of TJ proteins. The detected molecular alterations might also serve as new therapeutic targets in FLC.

9. IRODALMI HIVATKOZÁSOK

- WHO (2004) The Global Burden of Disease (GBD) report: WHO. pp. 2004 update. <u>http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GBD_report_2004update</u> <u>full.pdf</u>. Elérés ideje: 2013.03.14
- Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. (2010) Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. Int J Cancer 127: 2893-2917.
- 3. WHO (2008) Age-standardized mortality rate (per 100 000 population). The global burden of disease: 2004 update WHO. pp. Civil registration with complete coverage and medical certification of cause of death.
- 4. Sanyal AJ, Yoon SK, Lencioni R (2010) The Etiology of Hepatocellular Carcinoma and Consequences for Treatment. Oncologist 15: 14-22.
- 5. Tornai I (2010) Role of environmental factors in the etiology of hepatocellular carcinoma Orv Hetil 151: 1132-1136.
- Abdul-Al HM, Wang G, Makhlouf HR, Goodman ZD (2010) Fibrolamellar Hepatocellular Carcinoma: An Immunohistochemical Comparison With Conventional Hepatocellular Carcinoma. Int J Surg Pathol 18: 313-318.
- Ishak KG, Goodman ZD, Stocker JT (2001) Tumors of the Liver and Intrahepatic Bile Ducts. Atlas of Tumor Pathology, Series Vol Third, Fascicle 31, Washington DC: Armed Forces Istitute of Pathology.
- Kannangai R, Vivekanandan P, Martinez-Murillo F, Choti M, Torbenson M (2007) Fibrolamellar carcinomas show overexpression of genes in the RAS, MAPK, PIK3, and xenobiotic degradation pathways. Hum Pathol 38. Apr; 38(4):639-44
- Liu S, Chan KW, Wang B, Qiao L (2009) Fibrolamellar hepatocellular carcinoma. Am J Gastroenterol 104: 2617-2624; quiz 2625.
- Torbenson M, Vivekanandan P, Kannangai R (2005) Gene expression profiling of fibrolamellar carcinomas demonstrates limited changes in primary tumors but identifies several possible oncogenes on chromosome 1q. Gastroenterology 128.
 Apr, ISSN:0016-5085, WOS:000228619303448, Annual Meeting of the American-Gastroenterological-Association/Digestive-Disease-Week, MAY 14-19, 2005 Chicago, IL, Am Gastroenterol Ass.
- 11. Ward SC, Huang JT, Tickoo SK, Thung SN, Ladanyi M, Klimstra DS. (2010)

Fibrolamellar carcinoma of the liver exhibits immunohistochemical evidence of both hepatocyte and bile duct differentiation. Modern Pathol 23: 1180-1190.

- Edmondson HA (1956) Differential diagnosis of tumors and tumor-like lesions of liver in infancy and childhood. AMA J Dis Child 91: 168-186.
- Berman MM, Libbey NP, Foster JH (1980) Hepatocellular carcinoma. Polygonal cell type with fibrous stroma--an atypical variant with a favorable prognosis. Cancer 46: 1448-1455.
- Payne CM, Nagle RB, Paplanus SH, Graham AR (1986) Fibrolamellar carcinoma of liver: a primary malignant oncocytic carcinoid? Ultrastruct Pathol 10: 539-552.
- 15. Craig JR, Peters RL, Edmondson HA, Omata M (1980) Fibrolamellar carcinoma of the liver: a tumor of adolescents and young adults with distinctive clinicopathologic features. Cancer 46: 372-379.
- El-Serag HB, Davila JA (2004) Is fibrolamellar carcinoma different from hepatocellular carcinoma? A US population-based study. Hepatology 39: 798-803.
- Arista-Nasr J, Gutierrez-Villalobos L, Nuncio J, Maldonaldo H, Bornstein-Quevedo L (2002) Fibrolamellar hepatocellular carcinoma in mexican patients. Pathol Oncol Res 8: 133-137.
- Górnicka B, Ziarkiewicz-Wróblewska B, Wróblewski T, Wilczynski GM, Koperski L, Krawczyk M.;Wasiutynski A (2005) Carcinoma, a fibrolamellar variantimmunohistochemical analysis of 4 cases. Hepato-gastroenterol 52: 519-523.
- Wood WJ, Rawlings M, Evans H, Lim CN (1988) Hepatocellular carcinoma: importance of histologic classification as a prognostic factor. Am J Surg 155: 663-666.
- Torbenson M (2007) Review of the clinicopathologic features of fibrolamellar carcinoma. Adv Anat Pathol 14.
- 21. Chang YC, Dai YC, Chow NH (2003) Fibrolamellar hepatocellular carcinoma with a recurrence of classic hepatocellular carcinoma: a case report and review of Oriental cases. Hepato-gastroenterol 50: 1637-1640.
- 22. Davison FD, Fagan EA, Portmann B, Williams R (1990) HBV-DNA sequences in tumor and nontumor tissue in a patient with the fibrolamellar variant of hepatocellular carcinoma. Hepatology 12: 676-679.

- 23. Dadke D, Jaganath P, Krishnamurthy S, Chiplunkar S (2002) The detection of HBV antigens and HBx-transcripts in an Indian fibrolamellar carcinoma patient: a case study. Liver 22: 87-91.
- 24. Hadengue A, Thiers V, Santelli D, Bismuth H, Bréchot C (1986) [Presence of DNA sequences of hepatitis B virus in a fibrolamellar carcinoma of the liver]. Gastroenterol Clin Biol 10: 677-680.
- 25. Yoshida K, Amemiya A, Kobayashi S, Sakurai K, Suzuki M, Aizawa S (1988) Fibrolamellar carcinoma of the liver in the Orient. J Surg Oncol 39: 187-189.
- 26. Yoshida K, Kobayashi S, Miyamoto S, Kudo J, Hachiya K, Inada S, Sakurai K (1986) [Fibrolamellar carcinoma of the liver: a case report]. Nihon Geka Gakkai Zasshi 87: 1485-1490.
- Lapis K, Schaff Z, Kopper L, Karácsonyi S, Ormos J (1990) [Fibrolamellar liver carcinoma]. Zentralbl Allg Pathol 136: 135-149.
- 28. Saul SH, Titelbaum DS, Gansler TS, Varello M, Burke DR, Atkinson, BF, Rosato EF (1987) The fibrolamellar variant of hepatocellular carcinoma. Its association with focal nodular hyperplasia. Cancer 60: 3049-3055.
- 29. Imkie M, Myers SA, Li Y, Fan F, Bennett TL, Forster J, Tawfik O (2005) Fibrolamellar hepatocellular carcinoma arising in a background of focal nodular hyperplasia: a report of 2 cases. J Reprod Med 50: 633-637.
- Nagorney DM, Adson MA, Weiland LH, Knight CD, Smalley SR, Zinsmeister AR. (1985) Fibrolamellar hepatoma. Am J Surg 149: 113-119.
- 31. Sethi S, Tageja N, Singh J, Arabi H, Dave M, Badheka A, Ravenkar S (2009) Hyperammonemic Encephalopathy: A Rare Presentation of Fibrolamellar Hepatocellular Carcinoma. Am J Med Sci 338: 522-524.
- 32. Liu S, Wah Chan K, Tong J, Wang Y, Wang B, Qiao L (2011) PET-CT scan is a valuable modality in the diagnosis of fibrolamellar hepatocellular carcinoma: a case report and a summary of recent literature. QJM 104: 477-483.
- 33. Reinus JF, Yantiss RK (2000) 36-2000 case records of a Massachusets General Hospital- Weekly Clinicopathological Exercise a 22-year-old man with night sweats, weight loss, and a hepatic mass. N Engl J Med 343. 1553-1560.
- 34. McCloskey JJ, Germain-Lee EL, Perman JA, Plotnick LP, Janoski AH (1988) Gynecomastia as a presenting sign of fibrolamellar carcinoma of the liver.

Pediatrics 82: 379-382.

- 35. Mansouri D, Van Nhieu JT, Couanet D, Terrier-Lacombe MJ, Brugières L, Cherqui, D, Suciu V. Vielh P (2006) Fibrolamellar hepatocellular carcinoma: a case report with cytological features in a sixteen-year-old girl. Diagn Cytopathol 34: 568-571.
- 36. Marrannes J, Gryspeerdt S, Haspeslagh M, van Holsbeeck B, Baekelandt M, Lefere P. (2005) Fibrolamellar hepatocellular carcinoma in a 65-year-old woman: CT features. JBR-BTR 88: 237-240.
- 37. Albaugh JS, Keeffe EB, Krippaehne WW (1984) Recurrent obstructive jaundice caused by fibrolamellar hepatocellular carcinoma. Dig Dis Sci 29: 762-767.
- Soyer P, Roche A, Levesque M (1991) Fibrolamellar hepatocellular carcinoma presenting with obstructive jaundice. A report of two cases. Eur J Radiol 13: 196-198.
- 39. Eckstein RP, Bambach CP, Stiel D, Roche J, Goodman BN (1988) Fibrolamellar carcinoma as a cause of bile duct obstruction. Pathology 20: 326-331.
- 40. Ichikawa T, Federle MP, Grazioli L, Marsh W (2000) Fibrolamellar hepatocellular carcinoma: pre- and posttherapy evaluation with CT and MR imaging. Radiology 217: 145-151.
- Carri J, Peral F, Surreco M, Luján A, Leguizamón R, Martínez, G, Salvucci M (1989) Fibrolamellar hepatocellular carcinoma: a clinical report with paraneoplastic hyperthyroidism (apropos of a case) Acta Gastroenterol Latinoam 19: 155-164.
- 42. Tanaka J, Baba N, Arii S, Fujita K, Tamura J, Kawakami Y, Tsuji S, Imamura M. Yamabe H, Nakai S (1994) Typical fibrolamellar hepatocellular carcinoma in Japanese patients: report of two cases. Surg Today 24: 459-463.
- 43. Lamberts R, Nitsche R, de Vivie RE, Peitsch W, Schauer A, Schuster, R. Tebbe, U. Kreuzer, H. Creutzfeldt, W. (1992) Budd-Chiari syndrome as the primary manifestation of a fibrolamellar hepatocellular carcinoma. Digestion 53: 200-209.
- 44. Gupta P, Dhar S, Strickland NH (1999) Fibrolamellar carcinoma: an unusual clinico-radiological presentation. Eur J Radiol Issue 2. 32. 119-123.
- 45. Moghadam FM, Bahremand GH, Vejdani A (2008) Shoulder pain as the first sign of

a hepatic fibrolamellar carcinoma in a young man. J Gastrointest Liver 17: 234-236.

- 46. Vaideeswar P, Pandit MJ, Deshpande JR, Sivaraman A, Vora IM (1993) Fibrolamellar carcinoma of the liver--an unusual presentation. J Postgrad Med 39: 159-161.
- 47. Debray D, Pariente D, Fabre M, Foucaud P, Valayer J, Bernard O (1994) Fibrolamellar hepatocellular carcinoma: report of a case mimicking a liver abscess. J Pediatr Gastroenterol Nutr 19: 468-472.
- Tangkijvanich P, Thong-Ngam D, Kullavanijaya P, Suwangool P (2000) Fibrolamellar hepatocellular carcinoma in a Thai man who presented with hypoglycemia: case report and review of literature. J Med Assoc Thai 83: 809-816.
- 49. Montero A, Allende H, Tallada N, Ramon y Cajal S, Margarit C, Viladomiu L (2007) Fine needle aspiration cytology of massive bilateral ovarian metastasis of fibrolamellar hepatocellular carcinoma. Acta Cytol 51: 682-683.
- 50. Kutluk MT, Yalçin B, Büyükpamukçu N, Kale G, Büyükpamukçu M (2001) Fibrolamellar hepatocellular carcinoma with skeletal metastases. Pediatr Hematol Oncol 18: 273-278.
- 51. Snook JA, Kelly P, Chapman RW, Jewell DP (1989) Fibrolamellar hepatocellular carcinoma complicating ulcerative colitis with primary sclerosing cholangitis. Gut 30: 243-245.
- LeBrun DP, Silver MM, Freedman MH, Phillips MJ (1991) Fibrolamellar carcinoma of the liver in a patient with Fanconi anemia. Hum Pathol 22: 396-398.
- 53. Kroll D, Mazor M, Zirkin H, Schulman H, Glezerman M (1991) Fibrolamellar carcinoma of the liver in pregnancy. A case report. J Reprod Med 36: 823-827.
- 54. Gemer O, Segal S, Zohav E (1994) Pregnancy in a patient with fibrolamellar hepatocellular carcinoma. Arch Gynecol Obstet 255: 211-212.
- Louie-Johnsun MW, Hewitt PM, Perera DS, Morris DL (2003) Fibrolamellar hepatocellular carcinoma in pregnancy. HPB (Oxford) 5: 191-193.
- Müller V. (2013) A májrák laboratóriumi kórisméje. In: Tulassay Zs, editor. A máj daganatai. Budapest: Medicina Könyvkiadó Zrt. pp. 87-90.

- 57. Hemming AW, Langer B, Sheiner P, Greig PD, Taylor BR (1997) Aggressive surgical management of fibrolamellar hepatocellular carcinoma. J Gastrointest Surg 1: 342-346.
- 58. McLarney JK, Rucker PT, Bender GN, Goodman ZD, Kashitani N, Ros PR (1999) Fibrolamellar carcinoma of the liver: radiologic-pathologic correlation. Radiographics 19: 453-471.
- 59. Pinna AD, Iwatsuki S, Lee RG, Todo S, Madariaga JR, Marsh JW, Casavilla A, Dvorchik I, Fung J, Starzl TE (1997) Treatment of fibrolamellar hepatoma with subtotal hepatectomy or transplantation. Hepatology 26: 877-883.
- 60. Liebman HA, Furie BC, Tong MJ, Blanchard RA, Lo KJ, Lee SD, Coleman MS, Furie B (1984) Des-gamma-carboxy (abnormal) prothrombin as a serum marker of primary hepatocellular carcinoma. N Engl J Med 310: 1427-1431.
- 61. Paradinas FJ, Melia WM, Wilkinson ML, Portmann B, Johnson PJ, Murray-Lyon IM, Williams R (1982) High serum vitamin B12 binding capacity as a marker of the fibrolamellar variant of hepatocellular carcinoma. Br Med J (Clin Res Ed) 285: 840-842.
- 62. Sheppard KJ, Bradbury DA, Davies JM, Ryrie DR (1983) High serum vitamin B12 binding capacity as a marker of the fibrolamellar variant of hepatocellular carcinoma. Br Med J (Clin Res Ed) 286: 57.
- 63. Van Tonder S, Kew MC, Hodkinson J, Metz J, Fernandes-Costa F (1985) Serum vitamin B12 binders in South African blacks with hepatocellular carcinoma. Cancer 56: 789-792.
- 64. Wheeler K, Pritchard J, Luck W, Rossiter M (1986) Transcobalamin I as a "marker" for fibrolamellar hepatoma. Med Pediatr Oncol 14: 227-229.
- 65. Kanai T, Takabayashi T, Kawano Y, Kuramochi S, Miyazawa N (2004) A case of postoperative recurrence of fibrolamellar hepatocellular carcinoma with increased vitamin B12 binding capacity in a young Japanese female. Jpn J Clin Oncol 34: 346-351.
- 66. Soreide O, Czerniak A, Bradpiece H, Bloom S, Blumgart L (1986) Characteristics of fibrolamellar hepatocellular carcinoma. A study of nine cases and a review of the literature. Am J Surg 151: 518-523.
- 67. Collier NA, Weinbren K, Bloom SR, Lee YC, Hodgson HJ, Blumgart LH (1984)

Neurotensin secretion by fibrolamellar carcinoma of the liver. Lancet 1: 538-540.

- Adam A, Gibson RN, Soreide O, Hemingway AP, Carr DH, Blumgart LH, Allison DJ (1986) The radiology of fibrolamellar hepatoma. Clin Radiol 37: 355-358.
- 69. Pombo F, Rodriguez E, Arnal-Monreal F (1993) Multicystic fibrolamellar hepatocellular carcinoma. CT appearance. Clin Imaging 17: 67-69.
- Dubois J, Garel L, Russo P, Jéquier S (1993) Pediatric case of the day. Fibrolamellar hepatocellular carcinoma. Radiographics 13: 691-692.
- 71. Badiee S, Franc BL, Webb EM, Chu B, Hawkins RA, Coakley F, Singer L, (2008) Role of IV iodinated contrast material in 18F-FDG PET/CT of liver metastases. AJR Am J Roentgenol 191: 1436-1439.
- 72. Patonai A, Erdélyi-Belle B, Korompay A, Somorácz A, Törzsök P, Kovalszky I, Barbai T, Rásó E, Lotz G, Schaff Z., Kiss A (2013) Molecular Characteristics of Fibrolamellar Hepatocellular Carcinoma. Pathol Oncol Res 19 (1):63-70. doi: 10.1007/s12253-012-9558-0. Epub 2012 Aug 8.
- 73. Patonai A, Erdelyi-Belle B, Korompay A, Somoracz A, Straub BK, Schirmacher P, Kovalszky I, Lotz G, Kiss A, Schaff Z (2011) Claudins and tricellulin in fibrolamellar hepatocellular carcinoma. Virchows Arch 458: 679-688.
- 74. Kakar S, Burgart LJ, Batts KP, Garcia J, Jain D, Ferrel LD (2005) Clinicopathologic features and survival in fibrolamellar carcinoma: comparison with conventional hepatocellular carcinoma with and without cirrhosis. Mod Pathol 18: 1417-1423.
- 75. Pérez-Guillermo M, Masgrau NA, García-Solano J, Sola-Pérez J, de Agustín y de Agustín P (1999) Cytologic aspect of fibrolamellar hepatocellular carcinoma in fine-needle aspirates. Diagn Cytopathol 21: 180-187.
- 76. Sarode VR, Castellani R, Post A (2002) Fine-needle aspiration cytology and differential diagnoses of fibrolamellar hepatocellular carcinoma metastatic to the mediastinum: case report. Diagn Cytopathol 26: 95-98.
- 77. Kitabayashi K, Yokoi M, Ueno K, Saito H, Takashima S, Kurose N, Nojima T (2003) Fibrolamellar hepatocellular carcinoma: report of a case. Hepatogastroenterol 50: 1886-1888.
- 78. Tanaka K, Honna T, Kitano Y, Kuroda T, Morikawa N, Matsuda H, Kawashima N, Matsuoka K, Miyauchi J (2005) Combined fibrolamellar carcinoma and

cholangiocarcinoma exhibiting biphenotypic antigen expression: a case report. J Clin Pathol 58: 884-887.

- 79. Malouf G, Falissard B, Azoulay D, Callea F, Ferrell LD, Goodman ZD, Hayashi Y, Hsu HC, Hubscher S G, Kojiro M, Ng IO, Paterson AC, Reynes M, Zafrani ES, Emile JF (2009) Is histological diagnosis of primary liver carcinomas with fibrous stroma reproducible among experts? J Clin Pathol 62: 519-524.
- 80. Klein WM, Molmenti EP, Colombani PM, Grover DS, Schwarz KB, Boitnott J, Torbenson MS (2005) Primary liver carcinoma arising in people younger than 30 years. Am J Clin Pathol 124: 512-518.
- 81. Bernard G, Breittmayer JP, de Matteis M, Trampont P, Hofman P, Senik A, Bernard A (1997) Apoptosis of immature thymocytes mediated by E2/CD99. J Immunol 158: 2543-2550.
- 82. Vasdev N, Nayak NC (2003) CD99 expression in hepatocellular carcinoma: an immunohistochemical study in the fibrolamellar and common variant of the tumour. Indian J Pathol Microbiol 46: 625-629.
- 83. Ali A, Serra S, Asa SL, Chetty R (2006) The predictive value of CK19 and CD99 in pancreatic endocrine tumors. Am J Surg Pathol 30: 1588-1594.
- 84. Caplin M, Khan K, Savage K, Rode J, Varro A, Michaeli D, Grimes S, Brett B, Pounder R, Dhillon A (1999) Expression and processing of gastrin in hepatocellular carcinoma, fibrolamellar carcinoma and cholangiocarcinoma. J Hepatol 30: 519-526.
- 85. Lloreta J, Vadell C, Fabregat X, Serrano S (1994) Fibrolamellar hepatic tumor with neurosecretory features and systemic deposition of AA amyloid. Ultrastruct Pathol 18: 287-292.
- Sárosi I, Kiss A, Schaff Z, Lapis K (1991) Connective tissue content of fibrolamellar carcinoma and other human liver tumors. Acta Microbiol Hung 39: 321-331.
- Seitz G, Zimmermann A, Friess H, Büchler MW (2002) Adult-type hepatocellular carcinoma in the center of a fibrolamellar hepatocellular carcinoma. Hum Pathol 33: 765-769.
- 88. Kannangai R, Wang J, Liu QZ, Sahin F, Torbenson M (2005) Survivin overexpression in hepatocellular carcinoma is associated with p53 dysregulation.

Int J Gastrointest Cancer 35: 53-60.

- 89. Kannangai R, Sahin F, Adegbolal O, Ashfaq R, Su GH, Torbenson M (2004) FHIT mRNA and protein expression in hepatocellular carcinoma. Modern Pathol 17., 6 . 653-659
- 90. Orsatti G, Hytiroglou P, Thung SN, Ishak KG, Paronetto F (1997) Lamellar fibrosis in the fibrolamellar variant of hepatocellular carcinoma: A role for transforming growth factor beta. Liver 17. Jun;17(3):152-6.
- 91. Kannangai R, Sahin F, Torbenson MS (2006) EGFR is phosphorylated at Ty845 in hepatocellular carcinoma. Modern Pathol 19: 1456-1461.
- 92. Buckley AF, Burgart LJ, Kakar S (2006) Epidermal growth factor receptor expression and gene copy number in fibrolamellar hepatocellular carcinoma. Hum Pathol 37: 410-414.
- 93. Muramori K, Taguchi S, Taguchi T, Kohashi K, Furuya K, Tokuda K, Ishii E (2011) High aromatase activity and overexpression of epidermal growth factor receptor in fibrolamellar hepatocellular carcinoma in a child. J Pediatr Hematol Oncol 33, 5: e195-197.
- 94. Hany MA, Betts DR, Schmugge M, Schönle E, Niggli FK, Zachmann M, Plüss HJ (1997) A childhood fibrolamellar hepatocellular carcinoma with increased aromatase activity and a near triploid karyotype. Med Pediatr Oncol 28: 136-138.
- 95. Lowichik A, Schneider NR, Tonk V, Ansari MQ, Timmons CF (1996) Report of a complex karyotype in recurrent metastatic fibrolamellar hepatocellular carcinoma and a review of hepatocellular carcinoma cytogenetics. Cancer Genet Cytogenet 88: 170-174.
- 96. Ding SF, Delhanty JD, Bowles L, Dooley JS, Wood CB, Habib NA (1993) Infrequent chromosome allele loss in fibrolamellar carcinoma. Br J Cancer 67: 244-246.
- 97. Wilkens L, Bredt M, Flemming P, Kubicka S, Klempnauer J, Kreipe H (2000) Cytogenetic aberrations in primary and recurrent fibrolamellar hepatocellular carcinoma detected by comparative genomic hybridization. Am J Clin Pathol 114: 867-874.
- 98. Kakar S, Chen X, Ho C, Burgart LJ, Sahai V, Dachrut S, Yabes A, Jain D,

Ferrell LD (2009) Chromosomal changes in fibrolamellar hepatocellular carcinoma detected by array comparative genomic hybridization. Mod Pathol 22: 134-141.

- 99. Marchio A, Pineau P, Meddeb M, Terris B, Tiollais P, Bernheim A, Dejean A (2000) Distinct chromosomal abnormality pattern in primary liver cancer of non-B, non-C patients. Oncogene 19: 3733-3738.
- 100. Orsatti G, Greenberg PD, Rolfes DB, Ishak KG, Paronetto F (1994) DNA-Ploidy of Fibrolamellar Hepatocellular Carcinoma by Image Analysis.. Hum Pathol Sep;25(9):936-9.
- 101. Reuland P, Aicher KP, Brambs HJ, Enderle G, Feine U, Gärtner HV, Weber P. (1994) Incidental finding of a hepatic lesion: differential diagnostic problems for fibrolamellar hepatic carcinoma. J Nucl Med 35: 1342-1346.
- 102. Okada K, Kim YI, Nakashima K, Tada I, Yoshida T, Kobayashi M, Yokohama S (1993) Fibrolamellar hepatocellular carcinoma coexistent with a hepatocellular carcinoma of common type: report of a case. Surg Today 23: 626-631.
- 103. Starzl TE, Iwatsuki S, Shaw BW, Nalesnik MA, Farhi DC, Van Thiel DH (1986) Treatment of fibrolamellar hepatoma with partial or total hepatectomy and transplantation of the liver. Surg Gynecol Obstet 162: 145-148.
- 104. El-Gazzaz G, Wong W, El-Hadary MK, Gunson BK, Mirza DF, Mayer AD, Buckels JA, McMaster P (2000) Outcome of liver resection and transplantation for fibrolamellar hepatocellular carcinoma. Transpl Int 13 Suppl 1: S406-409.
- 105. Avila LF, Encinas JL, Leal N, Guinea A, García Miguel P, Jara P, Murcia J, Gamez M, López Santamaría M, Tovar JA (2007) Liver transplatation for malignant tumors in children. Cir Pediatr 20: 189-193.
- 106. Stauber RE, Mischinger HJ, Trauner M, Pristautz H (1993) Indications for liver transplantation in neoplasms of the liver. Acta Med Austriaca 20: 57-60.
- 107. Meriggi F, Forni E (2007) Surgical therapy of hepatic fibrolamellar carcinoma. Ann Ital Chir 78: 53-58.
- 108. Bower M, Newlands ES, Habib N (1996) Fibrolamellar hepatocellular carcinoma responsive to platinum-based combination chemotherapy. Clin Oncol (R Coll Radiol) 8: 331-333.

- 109. Katzenstein HM, Krailo MD, Malogolowkin MH, Ortega JA, Qu W, Douglass EC. Feusner JH, Reynolds M, Quinn JJ, Newman K, Finegold MJ, Haas JE, Sensel MG, Castleberry RP, Bowman LC (2003) Fibrolamellar hepatocellular carcinoma in children and adolescents. Cancer 97: 2006-2012.
- 110. Patt YZ, Hassan MM, Lozano RD, Brown TD, Vauthey JN, Curley SA, Ellis LM (2003) Phase II trial of systemic continuous fluorouracil and subcutaneous recombinant interferon Alfa-2b for treatment of hepatocellular carcinoma. J Clin Oncol 21: 421-427.
- 111. Spence RA, Rosen A, Krige JE, Blumgart RL, Temple-Camp CR, Terblanche J (1987) Unresectable fibrolamellar hepatocellular carcinoma treated with intraarterial lipiodolised doxorubicin. A case report. S Afr Med J 72: 701-703.
- 112. Czauderna P, Zbrzezniak G, Narozanski W, Korzon M, Wyszomirska M, Stoba C (2006) Preliminary experience with arterial chemoembolization for hepatoblastoma and hepatocellular carcinoma in children. Pediatr Blood Cancer 46: 825-828.
- 113. Braune C, Fangmann J, Scheumann GF, Klempnauer J (2001) Multiorgan resection in combination with intraoperative, hyperthermic chemotherapy in recurrent fibrolamellar hepatocellular carcinoma. An individual therapeutic concept for a 21-year-old patient. Zentralbl Chir 126: 318-321; discussion 322.
- 114. Myszor MF, Record CO (1990) Primary and secondary malignant disease of the liver and fulminant hepatic failure. J Clin Gastroenterol 12: 441-446.
- 115. Moreno-Luna LE, Arrieta O, García-Leiva J, Martínez B, Torre A, Uribe M, León-Rodriguez E (2005) Clinical and pathologic factors associated with survival in young adult patients with fibrolamellar hepatocarcinoma. BMC Cancer 5: 142.
- 116. Wetzel WJ, Costin JL, Petrino RL (1983) Fibrolamellar carcinoma: distinctive clinical and morphologic variant of hepatoma. South Med J 76: 796-798.
- 117. Stipa F, Yoon SS, Liau KH, Fong Y, Jarnagin WR, et al. (2006) Outcome of patients with fibrolamellar hepatocellular carcinoma. Cancer 106: 1331-1338.
- 118. AM.Tokes ZS, A.M.Szasz, J.Kulka (2013) Tight Junctions in Cancer Metastasis. In: Richard J.Ablin WGJ, editor. Tight Junctions in Cancer Metastasis. Dordrecht Heidelberg New York London: Springer. pp. 29-65.
- 119. Gonzalez-Mariscal L, Betanzos A, Nava P, Jaramillo BE (2003) Tight junction

proteins. Prog Biophys Mol Biol 81: 1-44.

- 120. Shen L, Weber CR, Turner JR (2008) The tight junction protein complex undergoes rapid and continuous molecular remodeling at steady state. J Cell Biol 181: 683-695.
- 121. Tsukita S, Furuse M, Itoh M (2001) Multifunctional strands in tight junctions. Nat Rev Mol Cell Biol 2: 285-293.
- 122. Kojima T, Murata M, Yamamoto T, Lan MD, Imamura M, Son S, Takano KI, 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: 1463-1472.
- 123. Steed E, Balda MS, Matter K (2010) Dynamics and functions of tight junctions. Trends Cell Biol 20: 142-149.
- 124. Forster C (2008) Tight junctions and the modulation of barrier function in disease. Histochem Cell Biol 130: 55-70.
- 125. Martin TA, Jiang WG (2009) Loss of tight junction barrier function and its role in cancer metastasis. BBA-Biomembranes 1788: 872-891.
- 126. Ouban A, Ahmed AA (2010) Claudins in human cancer: A review. Histolo Histopathol 25: 83-90.
- 127. 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 C delta (PKC delta) Signaling and Has a Causal Role in the Acquisition of Invasive Capacity in Human Liver Cells. J Biol Chem 285: 226-233.
- 128. Gonzalez-Mariscal L, Lechuga S, Garay E (2007) Role of tight junctions in cell proliferation and cancer. Prog Histochem Cytochem 42: 1-57.
- 129. Loh YH, Christoffels A, Brenner S, Hunziker W, Venkatesh B (2004) Extensive expansion of the claudin gene family in the teleost fish, Fugu rubripes. Genome Res 14: 1248-1257.
- 130. NCBI (2013) <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/9076</u>; Claudin 1 [Homo sapiens (human)] Gene ID: 9076. 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, NCBI. Elérés ideje: 2013.03.15
- 131. Dos Reis PP, Bharadwaj RR, Machado J, Macmillan C, Pintilie M, Sukhai MA,

Perez-Ordonez B, Gullane P, Irish J, Kamei-Reid S (2008) Claudin 1 overexpression increases invasion and is associated with aggressive histological features in oral squamous cell carcinoma. Cancer 113: 3169-3180.

- 132. Resnick MB, Gavilanez M, Newton E, Konkin T, Bhattacharya B, Britt DE, Sabo E, Moss SF (2005) Claudin expression in gastric adenocarcinomas: a tissue microarray study with prognostic correlation. Hum Pathol 36: 886-892.
- 133. 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. Modern Pathol 18: 511-518.
- 134. Tokes AM, Kulka J, Paku S, Szik A, Paska C, NovakPK, 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: R296-R305.
- 135. Sobel G, Paska C, Szabo I, Kiss A, Kadar A, Schaff Z (2005) Increased expression of claudins in cervical squamous intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma. Hum Pathol 36: 162-169.
- 136. Evans MJ, von Hahn T, Tscherne DM, Syder AJ, Panis M, Wölk B, Hatziioannou 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: 801-805.
- 137. Higashi Y, Suzuki S, Sakaguchi T, Nakamura T, Baba S, Reinecker HC, Nakamura S, Konno H (2007) Loss of claudin-1 expression correlates with malignancy of hepatocellular carcinoma. J Surg Res 139: 68-76.
- 138. NCBI (2013) <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/9075</u>; CLDN2 claudin 2 [Homo sapiens (human)]; Gene ID: 9075. 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. Elérés ideje: 2013.03.15
- Schulzke JD, Günzel D, John LJ, Fromm M (2012) Perspectives on tight junction research. Ann N Y Acad Sci 1257: 1-19.
- 140. Furuse M, Fujita K, Hiiragi T, Fujimoto K, Tsukita S (1998) Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. J Cell Biol 141: 1539-1550.
- 141. NCBI (2013) <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1365</u>; Claudin 3 [Homo sapiens (human)] Gene ID: 1365. 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA

National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, NCBI. Elérés ideje: 2013.03.15

- 142. Shang X, Lin X, Alvarez E, Manorek G, Howell SB (2012) Tight junction proteins claudin-3 and claudin-4 control tumor growth and metastases. Neoplasia 14: 974-985.
- 143. Montgomery E, Mamelak AJ, Gibson M, Maitra A, Sheikh S, Amr SS, Yang S, Brock M, Forastiere A, Zhang S, Murphy KM, Berg KD (2006) Overexpression of claudin proteins in esophageal adenocarcinoma and its precursor lesions. Appl Immunohistochem Mol Morphol 14: 24-30.
- 144. NCBI (2013) <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1364</u>; CLDN4 claudin 4 [Homo sapiens (human)] 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA NCBI, U.S. National Library of Medicine. Elérés ideje: 2013.03.15
- 145. Balda MS, Matter K (2009) Tight junctions and the regulation of gene expression. Biochim Biophys Acta. 1788(4): 761-767.
- 146. Tsukita S, Yamazaki Y, Katsuno T, Tamura A (2008) Tight junction-based epithelial microenvironment and cell proliferation. Oncogene 27: 6930-6938.
- 147. 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. Modern Pathol 19: 460-469.
- 148. Nemeth Z, Szasz AM, Tatrai P, Nemeth J, Gyorffy H, Somoracz, A. Szijarto A, Kupcsulik P, Kiss A, Schaff Z (2009) Claudin-1,-2,-3,-4,-7,-8, and-10 Protein Expression in Biliary Tract Cancers. J Histochem Cytochem 57: 113-121.
- 149. Nishino R, Honda M, Yamashita T, Takatori H, Minato H, Zen Y, Sasaki M, Takamura H, Horimoto K, Ohta T, Nakanuma Y, Kaneko S (2008) Identification of novel candidate tumour marker genes for intrahepatic cholangiocarcinoma. J Hepatol 49: 207-216.
- 150. Morita K, Tsukita S, Miyachi Y (2004) Tight junction-associated proteins (occludin, ZO-1, claudin-1, claudin-4) in squamous cell carcinoma and Bowen's disease. Br J Dermatol 151: 328-334.
- 151. NCBI (2013) <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7122</u>; CLDN5 claudin 5 [Homo sapiens (human)] 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA National

Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. pp. National Center for Biotechnology Information. Elérés ideje: 2013.03.15

- 152. CM.Couthino-Camillo SLaFS (2103) Claudin-5 and Cancer Metastasis. In: Richard J.Ablin WGJ, editor. Tight junctions in cancer metastasis. Dordrecht Heidelberg New York London: Springer. pp. 263-274.
- 153. Morita K, Sasaki H, Furuse M, Tsukita S (1999) Endothelial claudin: claudin-5/TMVCF constitutes tight junction strands in endothelial cells. J Cell Biol 147: 185-194.
- 154. Lippoldt A, Kniesel U, Liebner S, Kalbacher H, Kirsch T, Wolburg H, Haller H (2000) Structural alterations of tight junctions are associated with loss of polarity in stroke-prone spontaneously hypertensive rat blood-brain barrier endothelial cells. Brain Res 885: 251-261.
- 155. Jakab C, Halasz J, Szasz AM, Kiss A, Schaff Z, Rusvai M, Galfi P, Kulka J (2008) Expression of Claudin-1,-2,-3,-4,-5 and-7 Proteins in Benign and Malignant Canine Mammary Gland Epithelial Tumours. J Comp Pathol 139: 238-245.
- 156. Soini Y (2004) Claudins 2, 3, 4, and 5 in Paget's disease and breast carcinoma. Hum Pathol 35: 1531-1536.
- 157. NCBI (2013) <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1366</u>; CLDN7 claudin 7 [Homo sapiens (human)] Gene ID: 1366. 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. Elérés ideje: 2013.03.15
- 158. Lu Z, Ding L, Hong H, Hoggard J, Lu Q, Chen YH (2011) Claudin-7 inhibits human lung cancer cell migration and invasion through ERK/MAPK signaling pathway. Exp Cell Res 317: 1935-1946.
- 159. Soini Y (2005) Expression of claudins 1, 2, 3, 4, 5 and 7 in various types of tumours. Histopathology 46: 551-560.
- 160. Usami Y, Chiba H, Nakayama F, Ueda J, Matsuda Y, Sawada N, Komori T, Ito A, Yokozaki H (2006) Reduced expression of claudin-7 correlates with invasion and metastasis in squamous cell carcinoma of the esophagus. Hum Pathol 37: 569-577.
- 161. Sawada N (2013) Tight junction-related human diseases. Pathol Int 63: 1-12.
- 162. NCBI (2013) http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/100506658; OCLN occludin [

Homo sapiens (human)] Gene ID: 100506658. 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, NCBI. Elérés ideje: 2013.03.15

- 163. Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S (1993) Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. J Cell Biol 123: 1777-1788.
- 164. Ikenouchi J, Furuse M, Furuse K, Sasaki H, Tsukita S (2005) Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. J Cell Biol 171: 939-945.
- 165. NCBI (2013) <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/153562</u>; MARVELD2 MARVEL domain containing 2 [Homo sapiens (human)] Gene ID: 153562. 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. Elérés ideje: 2013.03.15
- 166. Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S (2002) The protein kinase complement of the human genome. Science 298: 1912-1934.
- 167. Hanks SK, Quinn AM (1991) Protein kinase catalytic domain sequence database: identification of conserved features of primary structure and classification of family members. Method Enzymol 200: 38-62.
- 168. Robinson DR, Wu YM, Lin SF (2000) The protein tyrosine kinase family of the human genome. Oncogene 19: 5548-5557.
- 169. Higashiyama S, Iwabuki H, Morimoto C, Hieda M, Inoue H, Matsushita N (2008) Membrane-anchored growth factors, the epidermal growth factor family: beyond receptor ligands. Cancer Sci 99: 214-220.
- NCBI (2013) <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1956</u>; EGFR epidermal growth factor receptor [Homo sapiens (human)]Gene ID: 1956. 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. pp. National Center for Biotechnology Information, EGFR epidermal growth factor receptor [Homo sapiens (human)]Gene ID: 1956. Elérés ideje: 2013.03.15
- 171. Arteaga C (2003) Targeting HER1/EGFR: a molecular approach to cancer therapy. Semin Oncol 30: 3-14.
- 172. Ciardiello F, Tortora G (2003) Epidermal growth factor receptor (EGFR) as a

target in cancer therapy: understanding the role of receptor expression and other molecular determinants that could influence the response to anti-EGFR drugs. Eur J Cancer 39: 1348-1354.

- 173. Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, Normanno N (1995) Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. Crit Rev Oncol Hematol 19: 183-232.
- 174. Micsik T (2013) A daganatok célzott kezelése. In: Tulassay Zs., editor. A máj daganatai. Budapest: Medicina Könyvkiadó Zrt. pp. 121-130.
- 175. Lee J, Moon C (2011) Current status of experimental therapeutics for head and neck cancer. Exp Biol Med (Maywood) 236: 375-389.
- 176. T. WFaL (1999) <u>http://atlasgeneticsoncology.org//Genes/KRASID91.html</u>; Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology. pp. KRAS (Kirsten rat sarcoma 2 viral oncogene homolog). Elérés ideje: 2013.03.16
- 177. Reference GH (2012) <u>http://ghr.nlm.nih.gov/gene/KRAS</u>; In: Medicine USNLo, editor: Lister Hill National Center for Biomedical Communications; U.S. National Library of Medicine; National Institutes of Health; Department of Health & Human Services; USA.gov. Elérés ideje: 2013.03.16
- 178. Kranenburg O (2005) The KRAS oncogene: past, present, and future. Biochim Biophys Acta 1756: 81-82.
- 179. 2013 G (2013) <u>http://www.mutacio.hu/EGFR-mutacio;</u> 1125 Budapest, Istenhegyi út 29-31: Istenhegyi Géndiagnosztikai Centrum. pp. EGFR mutáció.
- 180. 2013 G (2013) <u>http://www.mutacio.hu/KRAS-mutacio</u>; 1125 Budapest, Istenhegyi út 29-31 Istenhegyi Géndiagnosztikai Centrum. pp. KRAS mutáció.
- 181. 2013 G (2013) <u>http://www.mutacio.hu/celzott-daganatterapia</u>, 1125 Budapest, Istenhegyi út 29-31: Istenhegyi Géndiagnosztikai Centrum. pp. Célzott daganat terápia. 179.-181. Elérések ideje: 2013.03.16
- 182. Kraus C, Liehr T, Hulsken J, Behrens J, Birchmeier W, Grzeschik KH, Ballhausen WG (1994) Localization of the human beta-catenin gene (CTNNB1) to 3p21: a region implicated in tumor development. Genomics 23: 272-274.
- 183. Morin PJ (1999) beta-catenin signaling and cancer. Bioessays 21: 1021-1030.
- 184. Moon RT, Kohn AD, De Ferrari GV, Kaykas A (2004) WNT and beta-catenin

signalling: diseases and therapies. Nat Rev Genet 5: 691-701.

- 185. Weihl CC, Miller RJ, Roos RP (1999) The role of beta-catenin stability in mutant PS1-associated apoptosis. Neuroreport 10: 2527-2532.
- 186. Miller JR, Hocking AM, Brown JD, Moon RT (1999) Mechanism and function of signal transduction by the Wnt/beta-catenin and Wnt/Ca2+ pathways. Oncogene 18: 7860-7872.
- 187. da Costa LT, He TC, Yu J, Sparks AB, Morin PJ, Polyak K, Laken S, Vogelstein B, Kinzler KW (1999) CDX2 is mutated in a colorectal cancer with normal APC/beta-catenin signaling. Oncogene 18: 5010-5014.
- 188. Anurag Purushothaman RDS (2008)

www.atlasgeneticsoncology.org/Genes/SDC1ID42223ch2p24.html.

Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology. pp. SDC1 (syndecan 1). Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol. March 2008.

- 189. NCBI (2013) SDC1 syndecan 1 [Homo sapiens (human)] 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. pp. National Center for Biotechnology Information.
- 190. O'Connell FP, Pinkus JL, Pinkus GS (2004) CD138 (syndecan-1), a plasma cell marker immunohistochemical profile in hematopoietic and nonhematopoietic neoplasms. Am J Clin Pathol 121: 254-263.
- 191. Gokden N, Greene GF, Bayer-Garner IB, Spencer HJ, Sanderson RD, Gokden M (2006) Expression of CD138 (Syndecan-1) in renal cell carcinoma is reduced with increasing nuclear grade. Appl Immunohistochem Mol Morphol 14: 173-177.
- 192. Kakar S, Chen X, Ho C, Burgart LJ, Sahai V, Dachrut S, Yabes A, Jain D, Ferrell LD (2009) Chromosomal changes in fibrolamellar hepatocellular carcinoma detected by array comparative genomic hybridization. Modern Pathol 22: 134-141.
- 193. Shafizadeh N, Ferrell LD, Kakar S (2008) Utility and limitations of glypican-3 expression for the diagnosis of hepatocellular carcinoma at both ends of the differentiation spectrum. Modern Pathol 21: 1011-1018.
- 194. Libbrecht L, Severi T, Cassiman D, Borght SV, Pirenne J, Nevens F, Verslype C,

van Pelt J, Roskams T (2006) Glypican-3 expression distinguishes small hepatocellular carcinomas from cirrhosis, dysplastic nodules, and focal nodular hyperplasia-like nodules. Am J Surg Pathol 30: 1405-1411.

- 195. Rahner C, Mitic LL, Anderson JM (2001) Heterogeneity in expression and subcellular localization of claudins 2, 3, 4, and 5 in the rat liver, pancreas, and gut. Gastroenterology 120: 411-422.
- 196. Ikari A, Atomi K, Takiguchi A, Yamazaki Y, Miwa M, Sugatani J (2009) Epidermal growth factor increases claudin-4 expression mediated by Sp1 elevation in MDCK cells. Biochem Bioph Res Com 384: 306-310.
- 197. Bello IO, Vilen ST, Niinimaa A, Kantola S, Soini Y, Salo T. (2008) Expression of claudins 1, 4, 5, and 7 and occludin, and relationship with prognosis in squamous cell carcinoma of the tongue. Hum Pathol 39: 1212-1220.
- 198. Szabo I, Kiss A, Schaff Z, Sobel G (2009) Claudins as diagnostic and prognostic markers in gynecological cancer. Histol Histopathol 24: 1607-1615.
- 199. 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. Modern Pathol 18: 511-518.
- 200. Van Itallie CM, Holmes J, Bridges A, Anderson JM (2009) Claudin-2-dependent Changes in Noncharged Solute Flux Are Mediated by the Extracellular Domains and Require Attachment to the PDZ-scaffold. Molecular Structure and Function of the Tight Junction: from Basic Mechanisms to Clinical Manifestations 1165: 82-87.
- 201. Amasheh S, Schmidt T, Mahn M, Florian P, Mankertz J, Tavalali S, Gitter A, Schulzke JD, Fromm M (2005) Contribution of claudin-5 to barrier properties in tight junctions of epithelial cells. Cell Tissue Res 321: 89-96.
- 202. Kojima S, Rahner C, Peng S, Rizzolo LJ (2002) Claudin 5 is transiently expressed during the development of the retinal pigment epithelium. J Membrane Biol 186: 81-88.
- 203. Paschoud S, Bongiovanni M, Pache JC, Citi S (2007) Claudin-1 and claudin-5 expression patterns differentiate lung squamous cell carcinomas from adenocarcinomas. Modern Pathol 20: 947-954.
- 204. Jakab C, Halasz J, Kiss A, Schaff Z, Rusvai M, Galfi P, Abonyi TZ, Kulka J

(2009) Claudin-5 protein is a new differential marker for histopathological differential diagnosis of canine hemangiosarcoma. Histol Histopathol 24: 801-813.

- 205. Comper F, Antonello D, Beghelli S, Gobbo S, Montagna L, Pederzoli P, Chilosi M, Scarpa A (2009) Expression Pattern of Claudins 5 and 7 Distinguishes Solid-pseudopapillary From Pancreatoblastoma, Acinar Cell and Endocrine Tumors of the Pancreas. Am J Surg Pathol 33: 768-774.
- 206. Roskams T, De Vos R, David G, Van Damme B, Desmet V (1998) Heparan sulphate proteoglycan expression in human primary liver tumours. J Pathol 185. Jul;185(3):290-7.
- 207. Li HG, Xie DR, Shen XM, Li HH, Zeng H, Zeng YJ (2005) Clinicopathological significance of expression of paxillin, syndecan-1 and EMMPRIN in hepatocellular carcinoma. World J Gastroentero Mar 14;11(10):1445-51.

10.SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

<u>Patonai A</u>, Erdélyi-Belle B, Korompay A, Somorácz Á, Straub BK, Schirmacher P, Kovalszky I, Lotz G, Kiss A, Schaff Zs. (2011) Claudins and tricellulin in fibrolamellar hepatocellular carcinoma.

Virchows Arc 458:(6) pp. 679-688.

IF: 2.491

<u>Patonai A</u>, Erdelyi-Belle B, Korompay A, Somoracz A, Torzsok P, Kovalszky I, Barbai T, Raso E, Lotz G, Schaff Zs, Kiss A (2013) Molecular Characteristics of Fibrolamellar Hepatocellular Carcinoma.

Pathol Oncol Res 19:(1) pp. 63-70. doi: 10.1007/s12253-012-9558-0. Epub 2012 Aug 8. IF: 1.555

Nem az értekezés alapjául szolgáló közlemények :

Csébi Péter, Németh Tibor, Jakab Csaba, <u>Patonai Attila</u>, Garamvölgyi Rita, Manczur Ferenc, Spitzner A, Arany Tóth Attila, Kóbori László (2011) Experimental results of using autologous rectus fascia sheath for venous patch grafts in dogs Acta Vet Hung 59:(3) pp. 373-384. IF: 0.673

Jakab Cs, Csébi P, Szász AM, Szabó Z, <u>Patonai A</u> Krónikus, óriásredős gyomorgyulladás kutyában: Chronic hypertrophic gastritis in a dog. Case report (2009) Magyar Állatorvosok 131: pp. 601-609. IF: 0.200

Kobori L, Nemeth T, Nagy P, Dallos G, Sotonyi P, Fehervari I, Nemes B, Gorog D, <u>Patonai A</u>, Monostory K, Doros A, Sarvary E, Fazakas J, Gerlei Z, Benko T, Piros L, Jaray J, De Jong KP (2008) Experimental results and clinical impact of using autologous rectus fascia sheath for vascular replacementActa Vet Hung 56:(3) pp. 411-420.IF: 0.624

Horvath A, <u>Patonai A</u>, Banhegyi D, Szlavik J, Balazs G, Gorog D, Werling K (2008) A human Echinococcus multilocularis infectio első hazai esete. [The first case of human alveolar Echinococcosis in Hungary] Orv Hetil 149:(17) pp. 795-799.

Nemes B, Sárváry E, Kóbori L, Gerlei Zs, <u>Patonai A</u>, Perner F, Weszelits V, Járay J, Schaff Zs (2005) Serum hepatitis C virus-ribonucleotide acid monitoring after liver transplantation Digest Liver Dis 37:(1) pp. 68-69.

Lengyel G, Kóbori L, Fehérvári I, Nemes B, Görög D, <u>Patonai A</u>, Sárváry E, Varga M, Hagymási K, Perner F, Fehér J, Tulassay Zs (2005) Combined interferon-alpha-2b and ribavirin therapy in patients with recurring chronic hepatitis C (genotype 1) following liver transplantation in Hungary Arch Med Sci 1:(1) pp. 8-12.

Lotz G, Simon S, <u>Patonai A</u>, Sótonyi P, Nemes B, Sergi C, Glasz T, Füle T, Nashan B, Schaff Zs (2004) Detection of Chlamydia pneumoniae in liver transplant patients with chronic allograft rejection Transplantation 77:(10) pp. 1522-1528. IF: 3.568

Lengyel G, Kóbori L, Fehérvári I, Nemes B, Görög D, <u>Patonai A</u>, Sárváry E, Varga M, Perner F, Fehér J (2003) Kombinált interferon-alfa-2b és ribavirin terápia májtranszplantációt követő krónikus Chepatitisben Orv Hetil 144:(48) pp. 2367-2370.

<u>Patonai A</u>, Nemes B, Görög D, Kóbori L, Sótonyi P Jr, Fehérvári I, Weszelits V, Doros A, Dallos G, Schaff Z, Perner F (2001)
A hazai májtranszplantációk értékelése patológiai szempontból [Pathologic evaluation of orthotopic liver transplantation in Hungary]
Orv Hetil 142:(9) pp. 435-441.

Patonai A, Csikós A, Deák G Visceral aluminum deposition in chronic renal insufficiency - Light microscopy and Xray microanalysis (1996) Pathol Oncol Res 2:(1-2) pp. 94-97.

Könyvfejezet:

Schaff Zs., <u>Patonai A.</u>, Nagy P. A májtranszplantáció patológiája. In: Perner F., Petrányi Gy.(szerk); Szervátültetés. Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest, 2013: 210-219

11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Az értekezés szerzőjeként ezúton szeretném megköszönni mindazoknak a szíves közreműködését, akik értekezésem elkészítésében bármi módon segítségemre voltak.

Köszönöm témavezetőmnek, **Dr. Schaff Zsuzsa** professzor asszonynak a hivatás szeretetét, amellyel a patológiai pályán elindított, köszönöm irányomban mindvégig támogató figyelmét és tanácsait, továbbá, hogy a patológiai tudományokban és ezen munkám során is folyamatosan segített és irányított.

Köszönöm **Dr. Tímár József** professzor úrnak - a II.sz.Patológiai Intézet igazgatójának, hogy az általa irányított intézetben folytathattam kutatásaimat és a munkámhoz támogató hozzáállását és megtisztelő tanácsait.

Köszönöm **Dr. Kiss András** és **Dr. Lotz Gábor** docens uraknak, kollegáimnak és barátaimnak a sok értékes segítséget, tanácsot és együttműködést, melyet a munkámmal kapcsolatban nyújtottak.

Köszönöm az együttműködést és segítséget közös munkáinkban és a közleményeinkben társszerzőimnek és fiatal, - korábbi doktori ösztöndíjas kollégáimnak - **Dr. Korompay Annának** és **Dr. Somorácz Áronnak.**

Külön köszönettel tartozom biológus munkatársaimnak Erdélyi-Belle Boglárkának Dr. Rásó Erzsébetnek, Barbai Tamásnak és Dr. Spisák Sándornak a molekuláris biológiai vizsgálatokban és szekvenálásban nyújtott pótolhatatlan segítségükért és tanácsaikért.

Köszönettel tartozom a Heidelbergi Rupprecht-Karls Egyetem Patológiai Intézet igazgatójának; **Dr. Peter Schirmacher** professzor úrnak segítségéért valamint értékes anyagaiért. Munkatársai közül **Dr. med. Beate Straub** kolleganőt illeti köszönet az együttműködésért.

Köszönöm **Dr. Schönfeld Tibor, Dr. Kenessey István** és **Dr. Törzsök Péter** kollegáimnak a statisztikai számításokban és a digitális fotók szerkesztésében nyújtott önzetlen segítségüket.

Köszönöm Pekár Zoltánnénak, Somogyi Évának, Tordainé Szabó Hedvignek, Dr. Sklánitzné Samodai Erikának, Gregor Viktória szakasszisztenseknek a minták kezelésében és immunhisztokémiai és immunfluoreszcens vizsgálatokban nyújtott fáradhatatlan segítségüket.

Sok k öszönettel tartozom **dr.Tőkés Anna-Máriának** és **Rigóné Kálé Elvirának** a kéziratok ellenőrzésében, a lektorálásban nyújtott hasznos tanácsokért és segítségért.

Köszönöm a **II. sz. Patológiai Intézet valamennyi munkatárásnak** a felém irányuló segítőkészségüket és támogatásukat, valamint mindazoknak, akiket nem soroltam fel, de értékes tanácsaikkal segítették munkám elkészültét.

Ezúton is köszönöm **családomnak**, kifejezetten **szüleimnek** valamint **barátaimnak**, hogy munkám során nemcsak, hogy elviseltek, de türelemmel és állandó szeretettel támogattak mindenben.

Budapest, 2013.05.10.-én

A disszertáció az ETT-089/2009 az OTKA T 75468 és a TÁMOP4.2.1.B-09/1 KMR-2010-0001 alapok támogatásával készült el.

A.M.D.G

12.FÜGGELÉK

1.MELLÉKLET

RNS IZOLÁLÁS LÉPÉSEI **QIAGEN RNeasy[®] FFPE Kit** (Cat.No73504, QIAGEN, Hilden, Germany) használatával

Deparaffinálás:

A paraffinba ágyazott blokkról lemetszett 3-10 μm vastagságú metszetekről a nagyobb

paraffinrészeket pengével eltávolítjuk és a maradék metszetet 2 ml-es műanyag microcentrifugacsőbe tesszük.

- (2) 160 µl- 320 µl xylollal 10s –ig vortex-el elkeverjük.
- (3) Inkubáljuk az elegyet 3 percig szobahőmérsékleten (ismételhető, amennyiben a paraffin nem oldódott ki megfelelően)
- (4) Centrifugáljuk max sebességen 2 percig, majd eltávolitjuk a felülúszót.
- (5) A pelletre a xylollal megegyező mennyiségű 100% ethanolt teszünk, vortexeljük, majd ismételjük a (4) lépést.
- (6) A pelletről nyitott centrifuga cső mellett elpárologtatjuk a maradék ethanolt.

Emésztés:

- (7) 150 µl- 240 µl Buffer PKD-t és 10 µl proteinase K-t adunk hozzá, vortex-el alaposan megkeverjük.
- (8) Inkubáljuk 55°C-on 15 percig, majd 80°C-on 15 percig. (A 80 fokos inkubálással a formaldehid rmiatt módosult nukleinsavak visszaalakítását érjük el hosszabb, ill. nagyobb hőfokon a nukleinsavak jobban széttöredeznek.)

DNase kezelés/RNS kicsapása/megkötése RNeasy MinElute spin eluáló oszlopra,:

- (9) DNase Booster Buffer equivalenst használva DNase I stock oldatot készítünk és10 ul-t adunk az oldathoz, majd a pipettázással összekeverjük.
- (10) Inkubálás 15 percig szobahőn.
- (11) 320 µ-500 µl Buffer RBC-t adunk hozzá, összepipettázzuk, majd
- (12) 720 µl- 1200 µl ethanolt (100%) adunk a mintához.

- (13) 700 µl térfogatonként a mintát átvisszük 2 ml-es gyűjtőcsőben elhelyezett RNeasy MinElute spin eluáló oszlopra. Majd centrifugáljuk 15 sec-ig ≥8000 x g (≥10,000 rpm) fordulatszámon. (a gyűjtőcsőből a folyadékot kiöntjük)
- (14) A fenti lépést addig ismételjük, míg a teljes mintamennyiséget felvittük az oszlopra.

Mosás:

- (15) 500 µl Buffer RPE oldatot viszünk fel az RNeasy MinElute spin eluáló oszlopra. Centrifugáljuk 15 sec-ig ≥8000 x g (≥10,000 rpm) fordulaton. (a gyűjtőcsőből a folyadékot eltávolítjuk)
- (16) Előző lépést ismételjük, centrifugálás 2 percig ≥8000 x g (≥10,000 rpm)
 Fordulaton, majd teljes fordulaton 5 percig centrifugáljuk nyitott fedéllel (a megmaradt ethanoltartalom elpárologtatása miatt).

<u>Eluálás:</u>

(17) RNeasy MinElute spin eluáló oszlopot új 1.5 ml-es gyűjtőcsőbe helyezzük és 14-30 µl RNase-mentes vizet helyezünk a membránra, majd teljes fordulaton 1
(5) percig centrifugáljuk zárt fedővel. Az RNS-t -80 C°-on tároljuk.

2. MELLÉKLET

RNS izolálása fagyasztott szövetből Trizollal.

Lysis

10-20 mg folyékony nitrogénben/isopentanban fagyasztott szövethez 1 ml Trizol reagnst (Invitrogen, Cat.No. 15596-026) adunk, majd homogenizáljuk a szövetet sterilizált UH szövethomogenizátor vagy dörzsmozsár segítségével. (A minták között steril DEPC v ízzel mosást végzünk)

<u>Fázis szeparálás:</u>	
Inkubálás RT-en Trizollal	15 min
CHCl3-at adni hozzá ml-ként 0,2 ml (-20°C) és összkeverni vortex-el.	1 min
(Reanal Cat.No. 16900-1-08-65)	
Ismételt inkubálás (RT)	3 min
Centrifugálás (4°C) $12x10^3 xg$ sebeséggel	15 min
Felső fázist óvatosan lepipettázni, új csőbe tenni.	
Ismételten 1:1 arányban CHCl3-at adni hozzá (-20°C) és összkeverni vortex-el.	
Ismételt centrifugálás (4°C) $12 \times 10^3 x$ g sebeséggel	2 min

RNS kicsapása

Felső vizes fázist új csőbe tenni, és 0,5 ml (-20°C) izopropil alkohollal elkeverni. (Merck Cat.No.:100995-1000) Inkubálás szobahőmérsékleten 10 min Centrifugálás (4°C) $12x10^3 xg$ sebeséggel 5 min

RNS újraoldása

A felülúszót lepipettázni és a fehér RNS csapadékot 75% -20 fokos etanollal mostam. Majd az RNS újrafeloldását 0,1 ml RNase mentes (DEPC) vízben végeztem.

A nucleinsav koncentrációt Nanodrop 1000 (Wilmington, DE) spektrofotométerrel 260/280 nm hullámhosszt alkalmazó protokollal mértem.

3. MELLÉKLET

DNS IZOLÁLÁLÁS LÉPÉSEI **QIAGEN QIAmp[®] FFPE Tissue Kit** (Cat.No73504, QIAGEN, Hilden, Germany) használatával.

Deparaffinálás:

- (1) A paraffinba ágyazott blokkról lemetszett 5-10 µm vastagságú anyagról látható paraffint pengével eltávolítjuk és 1,5-2 ml-es műanyag microcentrifugacsőbe tesszük.
- (2) 1 ml xylolt teszünk hozzá, majd 10s –ig vortex-el elkeverjük alaposan, majd centrifugáljuk az elegyet 2 percig, teljes sebességen szobahőmérsékleten
- (3) Felülúszót lepipettázzuk, pellet marad a csőben, majd 1 ml 96% ethanolt adunk hozzá és 2 percig teljes sebességen szobahőmérsékleten centrifugáljuk
- (4) Ismét lepipettázzuk a felülúszót, a nyitott csövet 37C-os termosztátban szárítjuk 10 percig.

Emésztés:

- (5) A pellethez 180 μl Buffer ATL adunk és resuspendáljuk, majd 20 μl Proteinase
 K-t adunk hozzá, alaposan összekeverjük.
- (6) Inkubáljuk 55C-on 1 h-ig (amíg teljesen feloldódik).
- (7) Centrifugáljuk a csövet (kupakból a cseppeket eltávolítjuk) ha RNS mentes
 DNS-re van szükség- még 2 μl RNaset (100mg/ml) tegyünk hozzá.
- (8) 200 µl Buffer AL-t adunk a mintához és összekeverjük alaposan, majd inkubáljuk 70C-on 10 percig. Adjunk hozzá 200 µl 96%-os ethanolt és ismét elkeverjük.
- (9) Óvatosan áttesszük a lizátumot QIAamp MinElute oszlopra, melyet 2 ml gyűjtőcsőbe helyezünk (ne érintsük a szélét), majd 6000x g (8000 rpm) fordulatszámon 1 percig,

Mosás:

- (10) Adjunk hozzá 500 µl Buffer AW1-et, majd centrifugálás 6000x g (8000 rpm) fordulatszámon 1 percig, majd áthelyezzük új csőbe.
- (11) Adjunk hozzá 500 µl Buffer AW2-et, majd centrifugálás 6000x g (8000 rpm) fordulatszámon 1 percig, majd áthelyezzük új csőbe.
(12) Centrifugálás teljes fordulaton (20x10³xg, 14x10³ rpm) 3 percig, a membran teljes száradásáig.

<u>Eluálás:</u>

 (13) Helyezzük a QIAamp MinElute oszlopot tiszta 1,5 ml műanyagcsőbe, tegyünk a membrán közepére 20-100 µl Buffer ATE-t.

4. MELLÉKLET

ExperionTM DNA 1K Analysis Kit (BioRad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) DNS chip (1-11 minta vizsgálatához)



ExperionTM DNS chip

L → DNS létra bemérési hely GS → gélfestékoldat bemérési hely 1-11 → minták bemérési helyei

BioRad ExperionTM DNA 1K Analysis Kit használata:

A gyártó által ajánlott leírást követve a következő folyamatot végeztük el Experion elektroforézis készülék és software indítása után: A kitben található DNS festéket (ST), DNS loading puffert (B), 1 K DNA ladder-t (L) és a gélet (G) fénytől védve 15-20 percig szobahőn equilibráltuk, majd a vizsgálathoz szükséges gelfesték oldatot (GS) készítettük el. (12,5 µL DNS festék (ST) + 250 µL gel (G) \rightarrow 10 sec vortex keverés és filter csövön történő szűrés, centrifugálás után kapjuk a GS oldatot. Ellenőriztük, hogy a GS átpasszálódott a szűrőn \rightarrow kék szín normal, majd alufóliába csomagolva, fénytől védve tároltuk.) Ezt követően a DNA 1K létrát a DNS mintával a felhasználásig jégen tároltuk (0,1-50 µg/µl koncentráció között nincs szükség higításra, efelett 10mM Tris-EDTA (TE) pufferrel hígítottuk vissza.

A chip előtöltéséhez 9 ul GS oldatot pipettáztunk a zölddel jelzett GS wellbe. A C3 gomb megnyomását követően a chipet a készülékbe helyezzük, majd a Start gombbal elindítjuk az előtöltést (a művelet végén ellenőrizzük, hogy buborékmentesen, és teljesen sikerült a csatornák előtöltése). Ezután a további 3db GS jelzésű wellbe is 9-9 µl GS oldatot adunk. Ezt követően 5 µl DNS loading buffert adunk az L, valamint az 1-11 számmal jelzett wellekhez (egy wellt sem szabad üresen hagyni!). Ezután1 µl DNS

létrát az L, majd 1-1 μl DNS mintát töltük be az 1-11 wellekbe (a nem használt wellekbe TE puffert kell tenni) (lásd előző oldalon **Experion**TM DNS chip ábra).

A különböző chip futtatások, mérések között a kithez mellékelt tisztító chipet használtunk, melyet 800 µl DNase mentes vízzel töltöttünk fel.

A vad típusú (wt) minták alapján amennyiben a vizsgált minta több, mint 5% alternatív sávot tartalmazott, – az érzékenységi küszöböt figyelembe véve - mutációnak véleményeztük.

5. MELLÉKLET

DNS izolálás **MasterpureTM DNA Purification Kit** (Catalog No. MCD85201, Epicentre Biotechnologies, Madison, Wisconsin, USA) használatával.

- A paraffinba ágyazott blokkról lemetszett 10-50 mg mennyiségű, 10-35 μm vastagságra metszett szeletekről a paraffin nagyját eltávolítjuk.
- (2) Hozzáadunk 1-5 ml xylolt a paraffin kivonására és inkubáljuk szobahőmérsékleten 10 percig. Centrifugáljuk, majd az oldatot eltávolítjuk a pelletről.
- (3) Megismételjük a 2. lépést.
- (4) Hozzáadunk 1-5 ml of 100% -os ethanolt és inkubáljuk szobahőmérsékleten 10 percig. Centrifugáljuk, majd az oldatot eltávolítjuk.
- (5) Megismételjük a 4. lépést, majd elpárologtatjuk a maradék ethanolt is, szárítjuk.
- Proteinase K-t oldunk fel 300 μl Tissue and Cell Lysis Solution-ban és mindegyik mintához 2 ul-t aduk hozzá, majd jól elkeverjük.
- (7) Inkubáljuk 65°C-on 15 percig majd 10 sec-ig keverjük vortex-el.
- Hűtsük le a mintát jégen és adjunk hozzá 1 μl of RNase A –t, majd jól keverjük el.
- (9) Inkubáljuk 37°C-on 30 percig, majd helyezzük jégre a mintát 3-5 percre.

Nukleinsav precipitáció:

- (10) Adjunk 150 μl MPC Protein Precipitation Reagent-et 300 μl feltárt mintához és vortex –el keverjük 10 sec-ig.
- A kicsapott törmelékes mintát centrifugáljuk 4°C-on 10 percig ≥10,000
 xg -vel microcentrifugában.
- (12) A felülúszót tegyük át tiszta microcentrifuga csőbe és dobjuk el a csapadékot (pellet).
- (13) Adjunk 500 μl isopropanolt a felülúszóhoz, majd rázzzuk fel-le a csövet néhányszot (30-40).
- (14) Gyűjtsük pelletbe a DNS-t centrifugálással 4°C-on 10 percig

microcentrifugában.

- (15) Óvatosan öntsük le az isopropanolt oly módon, hogy a DNA pellet maradjon a csőben.
- (16) Öblítsük óvatosan a pelletet nem eltávolítva kétszer 70%-os ethanolal.
- (17) Pipettázzuk le a maradék ethanolt, majd resuspendáljuk a nukleinsavat
 35 μl of TE Buffer-ben.

6. MELLÉKLET

A minta előkészítése spektrum kalibráláshoz és direkt szekvenáláshoz **BigDye® Terminator v1.1 Sequencing Standard Kit** (Cat.No.Applied Biosystems, Foster City) felhasználásával ABI 3130 Genetic Analyser System készülékre.

Spektrum kalibrálás:

- Resuspendáljunk egy steril microcentrifuga csőben Sequencing Standard mintát 170 μL Hi-DiTM Formamide-ban.
- (2) Vortex-el keverjük át, majd microcentrifugában centrifugáljuk 1-2 percig.
- (3) Melegítsük fel 95°C-ra 2 percig denaturálni, majd helyezzük jégre.
- (4) Adagoljunk 10 μL denaturált Standard mintát egy 96-lyukú microtiter lemezre
 (plate) A lyukhelyezés: A1 H2 for 16 capillarisra vagy A1-D1 4 capillarisra.
- (5) Centrifugáljuk a platet.
- (6) Helyezzük az automata mintavevőre, majd a készülék ajánlás szerinti módban indítható és a kalibrálás elvégezhető a protokollnak megfelelően.

Szekvenáló PCR (ddNTP - dideoxi nukleotidok bevitele PCR során):

A szekvenálni kívánt PCR termékek megfelelő ng DNS-t tartalmazó mennyiségét a protokollnak megfelelően összemérjük. (A szekvenálandó DNS szakasz hosszúságtól függ a bemérendő DNS mennyisége pl. 500-1000 bp-nál 5-20 ng DNS). Szekvenáló PCR-hez mindig csak egy primert használunk, vagy a forward, vagy a reverz primert.

Reagens		<u>Térfogat/reakció</u>
Ready Reaction Premix	2.5x	8 µl
BigDye Sequencing Buffer	5x	4 µl
Primer (15uM)		0,5 µl
Templát		minta DNS
dH2O		max. 7,5 μl
Végső térfogat		20 µl

PCR ciklus:

Előmelegítés 96 fok 1 min,

25 ciklus: 96 fok 10 sec; 50 fok 5 sec; 60 fok 4 min

Szekvenáló PCR termékek tisztítása:

Oldatok: *SAM Solution* - használat előtt a kivált részecskéket újra fel kell oldani (ha van), ezért ilyenkor 37 fokra kell melegíteni. *XTerminator Solution* - használat előtt legalább 10 s -ig vortexelni kell, hogy homogénné váljon az oldat.

A PCR termékek 20-20 ul-hez 110 ul premixet (90 ul SAM Solution és 20 ul XTerminator Soulution) mérünk. (A premix maximum 5 napig tartható el +4 fokos hűtőben.) A mixet vortexeljük, majd a mintákhoz adjuk. A 96-os plate-et fóliával lefedjük, majd az összemért oldatokat 30 percig rázatjuk plate rázón: IKA MS3 esetén 2000 rpm-mel. Majd lefugáljuk 1000g 2 percig.

Kapilláris elektroforézis:

A felülúszóból (a "gyöngyök" ne kerüljenek át) 10 v. 20 ul-eket átpipettázva a 96-os plate-re végezzük a kapilláris elektroforézist: A platen kicseréljük a fóliát egy septára (96 wellnek megfelelően perforált gumi fedő) és a Sequencer-be tesszük a mintákat "szekvenálni".