

A sejtkapcsolatok fellazulása a daganatok kialakulásának és a tumoros progresszióknak alapvető történése. A sejt-sejt és a sejt-extracelluláris matrix (ECM) kapcsolat megbomlása számos daganatban, kiemelten a hámeredetűekben különösen jellemző és nyomkövethető. A daganatokban megváltozik a sejtkapcsolatokért elsődlegesen felelős struktúrák így a tight junction (TJ) (zonula occludens), a gap junction, a desmosomák és az adherens junctio morfológiája, protein összetétele, ami a funkció változásával együttjár. A sejtkapcsoló struktúrák összetevőinek többsége integráns membrán fehérje, más részük citoplazmatikus. A transzmembrán fehérjék szerkezete teszi lehetővé, hogy az egyes fehérjealkotók részben egymással, részben az ECM összetevőivel és a sejten belül a jelátviteli rendszer egyes elemeivel is kapcsolódjanak. Ennek megfelelően a TJ fehérjék funkciója összetett, egyrészt a sejtek polaritását biztosítják, a paracelluláris folyadék és ion diffúzióban szemipermeabilis barrierként szolgálnak és részei a jelátviteli rendszernek.

A TJ fehérjék közül először az occludint (1994), majd a claudint (1998) izolálta egy japán munkacsoport (Furuse et al. 1994, 1998). Magunk igen korán, 2000-ben kapcsolódtunk be az egyes sejtkapcsoló fehérjék változásainak kutatásába. Kiemelten tanulmányoztuk az emberben 24 tagot számláló claudin-családot, mely a TJ gerincét alkotja.

A vizsgálataink célja az egyes claudinok expressziójának meghatározása volt a normál emberi szövetekben és daganatokban. A következő célkitűzéseket kívántuk megvalósítani:

1. A claudin (CLDN) expresszió vizsgálata, jellegzetes mintázata normális és kóros szövetekben, különös tekintettel az emésztőrendszerre.
2. A CLDN expresszió változásának tanulmányozása a tumorok progressziója során, különösen az invázió kezdeti szakaszára.
3. A CLDN4, mely a Clostridium perfringens enterotoxin receptora (CPE, potenciális terápiás target) fokozott expressziójának vizsgálata elsősorban az emésztőrendszer daganataiban
4. A CLDN típusok szerepének vizsgálata a differenciációban, különösen a máj-epeútrrendszer daganataira, és ezek összevetése a differenciáció egyéb markereivel a progenitor sejtekben.
5. Az eredeti tervek mellett vizsgálatainkat kiterjesztettük egyéb TJ fehérjék, így az occludin és ZO1 vizsgálatára.
6. Egyes ECM komponensek, kiemelten a basalis membrán összetevőinek, így az agrinnak és matrilin2-nek a vizsgálata normális májban és májeredetű daganatokban.

A vizsgálati anyagot a következők alkották;

1. **Diagnosztikus** célból eltávolított emberi tumorszövet és az ezzel együtt, szükségszerűen eltávolításra került környező nem daganatos szövetminták. A vizsgálatokra minden esetben a diagnózis megállapítása után került sor. Vizsgálatainkat etikai engedéllyel végeztük (TÜKEB 172/2003, 2/2004).
2. **Kísérletes májproliferációs** vizsgálatokhoz a már korábban kialakított patkánymodellt használtuk.

A **vizsgálati módszerek** a következők voltak;
Hisztológia, immunhisztokémia,
Molekuláris biológiai módszerek (RNS-, DNS-izolálás, Western blot, RT-PCR)

Új eredmények és értékelésük

1. **CLDN expresszió a Barrett oesophagusban (BO) és adenocarcinómában (ACC)**

A Barrett oesophagus, mint praecancerosus elváltozás kapcsolata az ACC-val ismert. Ennek ellenére viszonylag kevés egyértelmű vizsgálat igazolja az összefüggést, bár az „klinikai” igazoltnak tekinthető. Vizsgálataink során kapcsolatot kerestünk a két elváltozás között, a sejtkapcsoló struktúrák változásainak elemzésére alapozva.

1.1. Megállapítottuk, hogy a CLDN7 a domináló típus a nyelőcső normális szöveteiben és daganataiban, azonban a normális és kóros szövet között nem észlelhető eltérés.

1.2. A CLDN1 expresszió jelentősen megnövekedett laphám carcinómában, összehasonlítva a normális hámmal.

1.3. A CLDN3 és 4 szignifikánsan emelkedett BO-ban és ACC-ban, összehasonlítva a normális foveoláris hámmal. A CLDN2 expresszió szignifikánsan magasabb volt ACC-ban, mint a BO-ban.

Fenti vizsgálatokkal elsőként igazoltuk az irodalomban a BO és ACC-ra jellemző CLDN eltéréseket. Korábbi, a cervicalis praemalignus elváltozásokkal kapcsolatos megfigyeléseinkhez hasonlóan, a BO-ban, mint rákelőtti elváltozásban, a várttal ellentétben, növekedett egyes CLDN-k expressziója. A CLDN fehérjék típusainak összetétele BO-ban viszont alapvetően megegyezett az ACC-ban észlelttel, attól csak mennyiségi eltérés volt észlelhető. Vizsgálataink adatai tovább erősítik a kapcsolatot a BO és a ACC között, jelezve a sejtkapcsolatok progresszív változásait a praemalignus szakasztól a carcinoma kialakulásáig és annak progresszióját követve.

2. **CLDN expresszió hepatoblastomában (HB)**

A HB epithelialis összetevői, a differenciáltságtól függően, lehetnek foetalis és embrionális típusúak, melyek aránya prognosztikus értékű.

2.1. Vizsgálatainkban megállapítottuk, hogy jelentősen nőtt a CLDN1 és 2 expresszió fehérje és mRNS szinten a foetalis típusú sejtekben, míg az embrionális sejtek negatívnak bizonyultak.

2.2. CLDN expresszió fordítottan korrelált a PCNA és Ki67 proliferációs markerekkel és a korábban vizsgált TGF α -val. A vizsgálatokban nem találtunk összefüggést a β -catenin expresszió és a CLDN rajzolat között.

Vizsgálataink azt igazolták, hogy az agresszívabb, rapidan proliferáló embrionális fenotípus csökkent CLDN1 és 2 expresszióval függ össze, tehát ezen CLDN

típusok differenciós markernek is tekinthetők a májban, legalábbis a hepatoblastomában.

3. CLDN expresszió endometrialis carcinomában

Az endometrialis carcinomák két, prognosztikailag jelentősen eltérő alaptípusa ismeretes, a rosszabb prognózisú sero-papillaris és a viszonylag jobb prognózisú endometrioid carcinoma.

3.1. A vizsgált CLDN-k közül (1, 2, 3, 4, 7) az endometrioid, mely p53 negatív és oestrogén/progesteron pozitív, alacsony CLDN1 és magas CLDN2 expressziót mutatott. A CLDN mintázat az endometrialis hyperplasiában hasonló jellegű, bár alacsonyabb volt, mint az endometrioid carcinomában.

3.2. A rossz prognózisú sero-papillaris carcinoma magas CLDN1 és alacsony CLDN2 expressziót mutatott.

Vizsgálataink alátámasztották az endometrialis carcinoma dualisztikus modelljét és a hyperplasia és az endometrioid carcinoma kapcsolatát. A jelentős eltérés a két típusban a patogenetikus utak eltérő mechanizmusára is utal. A jellegzetes CLDN mintázat alkalmas az egyes összetevők arányának pontosabb meghatározására a két típusú carcinomában.

4. CLDN expresszió a pancreas endocrin és exocrin tumoraiban

A pancreas exocrin és endocrin daganati eltérő sejt eredetűek és prognózisúak. Az exocrin tumorok CLDN expressziójára vonatkozóan rendelkezünk néhány adattal, azonban az endocrin daganatokra vonatkozóan nem.

4.1. Vizsgálatainkkal fehérje és mRNS szinten megállapítottuk, hogy a normális acinusok és ductusok magas CLDN1, 3, 4, 7 és gyenge CLDN2 expressziót mutatnak.

4.2. A Langerhans szigetek sejtjei csak CLDN3-t és 7-t expresszálnak.

4.3. A CLDN1, 4 és 7 erősen pozitív minden ACC-ban.

4.4. A CLDN1, 4 negatív az endocrin tumorokban, a CLDN3 és 7 erősen expresszált.

Vizsgálataink először mutatták ki a pancreas endocrin daganatainak CLDN expresszióját. A magas CLDN3 az endocrin tumorokat, a CLDN4 a ductalis ACC-t jellemzi. Mivel ezen CLDN-k a Clostridium perfringens enterotoxinjának receptorai, a fenti megfigyelés terápiás következményű is lehet.

4. CLDN expresszió tüdőtumorkban

A tüődaganatok sokfélesége, eltérő sejtes kiindulása feltételezi, hogy a sejtkapcsolatokban is jelentős eltérések vannak, mind az egyes normális komponensek, mind az azokból kiinduló daganatokkal kapcsolatban.

4.1. Megállapítottuk, hogy a normális bronchialis hám CLDN1, 2, 3, 4 és 7-t expresszál.

4.2. A kissejtek tüdőrák és carcinoid jelentősen különbözött a CLDN1, 3 és 4 expressziójában.

4.3. Az ACC és laphámrák a CLDN3, 4 és 7-ben tért el egymástól.

A vizsgálatok jelentősége, hogy először írta le és hasonlította össze a különböző sejt eredetű tüdődaganatokat és állapított meg jelentős különbségeket az egyes csoportok között. Egyes CLDN-k, elsősorban a CLDN3 és 4 fokozott expressziójának terápiás következménye is lehet.

5. **TJ fehérjék: claudinok, occludin és ZO1 expresszió a máj primer és áttéti daganataiban**

A máj parenchymalis sejtjei, a hepatocyták (HC) és a cholangiocyták (CC) közti sejtkapcsolatok és ezek károsodása jelentős számos nem daganatos és daganatos elváltozásban. Kérdés, hogy a TJ fehérjék expressziójának változása az egyes májdaganatokban mennyire jellemzi azokat, ill a daganatokban érvényesül-e a kiindulási sejtekre (HC vagy CC) jellemző rajzolat. Ugyancsak kérdéses, hogy a májmetasztázisokban a primer daganat vagy a máj CLDN patternje érvényesül?

5.1. A normális HC-kat CLDN1, 2, és 7 expresszió jellemzi, míg a CC-t a CLDN1 és a CLDN4. Az utóbbi a legjellemzőbb elkülönítő markere a két sejttypusnak.

5.2. Az occludin és ZO1 gyengén expresszálódott a HC-n és erősen a CC-n.

5.3. A CLDN4 erősen expresszálódott a cholangiocarcinomákban (CCC), míg negatívnak bizonyult hepatocellularis carcinomában (HCC).

5.4. A CLDN1 expresszió jelentősen növekedett HCC-ban a normál májhoz viszonyítva, kisebb mértékben a metasztázishoz hasonlítva. A CLDN3, 4, 7 expresszió csökkent HCC-ben a metasztázisokhoz képest.

5.5. Az occludin és ZO1 mRNS szignifikánsan leregulálódott a HCC-ben és a metasztázisokban.

5.6. Cirrhosisban jelentősen növekedett a CLDN1 expresszió a normális májhoz viszonyítva, mely a HCV fertőzés hatására csökkent.

Eredményeink arra utalnak, hogy a máj két parenchymális sejttypusa, a HC és a CC jelentősen eltér egymástól a TJ proteinek mintázatában. Ez a különbség alapvetően megmarad a carcinogenesis során is, azaz a különböző TJ proteinek típusa nem változik. Eltérés található azonban, a normálhoz viszonyítva az egyes összetevők mértékében. A legkifejezettebb különbséget a CLDN4 mutatta, mely erősen expresszálódott a CCC-ban, míg a HCC-ban nem volt kimutatható a CLDN4. Az eredmény alapján a CLDN4 tumormarkerként szolgálhat a két tumor elkülönítésében.

6. **Agrin és matrilin2 expresszió a májdaganatokban és a máj ős/progenitor sejtjeiben**

A sejt mikro környezetének alakulásában és a sejt-ECM kapcsolatok kialakulásában, valamint a daganatos progresszióban számos ECM komponens, kiemelten basalis membran alkotói, így az agrin és matrilin2 szerepet játszhat.

6.1. Korábbi munkánk folytatásaként megállapítottuk hogy az **agrin**, mely igen erősen expresszálódik HCC-ban és szerepet játszik a neoangiogenesisben, a CCC-ban eltérően expresszálódik. Az agrin a tumor-specifikus basalis membránban

lokalizálódik CCC-ban és megjelenése összefügg a tumor differenciáltságával és progressziójával.

6.2. A **matrilin2** megjelenését kísérletesen létrehozott patkánymáj regeneráció során vizsgáltuk. A normális májban a matrilin2 csak a portális területek ereiben és az epeutak basalis membránjában jelent meg. A patkánymodelben igazoltuk, hogy a matrilin a máj progenitor sejteinek tekintett u.n. ovalis sejtei körül jelent meg, követve azok tubularis formációját. In situ hibridizációval igazolható volt, hogy a matrilin2-t az ovalis sejtek termelték.

6.3. A matrilin2 az emberi májcirrhosisban a sinusoidokat kísérve megjelent. Ugyancsak detektálható volt a matrilin2 HCC-ben, a neovaszkularizált területeken.

A fenti adatok azt igazolják, hogy a basalis membrán egyes komponensei jelentősen megváltoznak a daganatok kialakulása során a májban. Ez nagy mértékben összefügg a daganatok neovaszkularizációjával. A cirrhosisban észlelt „capillarizáció”, mely microcirculációs zavart okozhat, jelentősen megváltoztatja a sejtek microkörnyezetét, a szerkezet átépülésének fontos lépése.

Összefoglalva eredményeinket, a számos **tumoron végzett vizsgálat, a CLDN-k és egyéb TJ proteinek, valamint az ECM egyes komponenseinek jelentős változását tárta fel.** A CLDN mintázat, az altípusok nagymértékben jellemezték az egyes daganatokat és utaltak a cellularis eredetre. Az egyes TJ fehérjék eltérései **már a praemalignus szakaszban** megfigyelhetők voltak és az expresszió mértéke változott a daganatos progresszió során. A várttal ellentétben azonban, a sejtkapcsolatok gyengülése, melyet más vizsgálatok igazoltak számos daganatban, nem járt feltétlenül az egyes TJ fehérjék mennyiségének csökkenésével, sőt számos esetben **fokozott expressziójuk** mRNA és protein szinten is megfigyelhető volt. Ez különösen jellemezte a praemalignus eltéréseket. Mindez a „statikus” TJ model át gondolását és a dinamikus, a fehérje összetételében a külső és belső hatásokra reagáló, a jelátvitelben résztvevő komplex sejtkapcsoló rendszert, semmint „statikus struktúrát” feltételez.

A **CLDN mintázat megváltozása egyes tumorok esetében nagymértékben jellemző, és diagnosztikus markerként is felhasználható.**