

Válasz Prof. Dr. Láng István megjegyzéseire és kérdéseire

Tisztelt Professor Úr!

Mindenekelőtt nagyon köszönöm bírálatát, megtisztelő elismerő szavait és kérdéseit, amelyekre az alábbiakban válaszolok.

Sajnálom, hogy a többszöri ellenőrzés ellenére is maradtak értelemzavaró hibák a disszertációban (CDK1 helyett CDC2 rövidítés és a „fejlett ország” szóhasználat pontosabb és körültekintőbb megfogalmazás helyett). Ide tartozik a 4.4.3. alfejezet hiányos első mondata, amely helyesen így hangzana: „A nyilvános adatbázisokból származó tréning csoportban CLDN és CDH-1 mRNS expressziós adatokat gyűjtöttünk ki.” A disszertáció szövegében már nincs mód ezeket javítani, de nagyon köszönöm, hogy felhívta a figyelmemet ezekre a pontatlanságokra.

A 30. oldalon említett, 2016-ban benyújtott kézirat, amely primer tumorok és metasztázisaik filogenezise elemzésének eredményeit ismerteti, a Nature Communications-ben jelent meg az idén áprilisban, a cikk másolatát a válaszaimhoz mellékelem.

A 33. oldalon és a 61. oldalon található eltérő definíció a Luminalis A tumorok meghatározására abból adódott, hogy a tanulmányaink eltérő években készültek. A 2011-es St. Galleni Konszenzus Konferencia <14% Ki67 pozitivitás arányt, a 2013-as St. Galleni Konszenzus Konferencia <20% Ki67 pozitivitás arányt javasolt a Luminalis A tumorként történő besoroláshoz. (A tanulmányainkban használt 15%-os küszöbérték a 14% kerekítése, mivel a gyakorlatban a Ki67 pozitivitás arányát leggyakrabban 5-re vagy 0-ra végződő számokra kerekítve adjuk meg. Ennek létjogosultságáról 2014-ben az Európai Emlőszűrő Patológus Munkacsoport közölt egy cikket: Cserni G és mtsai, Breast 2014;23:259-63.) Retrospektív tanulmányainkban az elemzésekben az aktuálisan, a vizsgálatunk idején érvényes ajánlásokat vettük figyelembe.

A 45. oldal első bekezdésében az Affimetrix génexpressziós adatbázisból nyert adatok megbízhatóságával kapcsolatban az alábbi módon jártunk el: első lépésben 13 nyilvános adatbázis microarray adatait vettük alapul, és ezekből képeztünk egy finomított, és a tanulmányhoz használt adatbázist, amelyben kizártuk azokat a próbákat, amelyek átlagos MAS-5 (microarray suite-5) expressziója 100-nál kisebb, maximális expressziója 500-nál kisebb volt. (A MAS-5 egy szelektív és szenzitív algoritmus génexpressziós adatok elemzéséhez, amely a hibridizáció során kialakuló „perfect match” (specifikus kötődés) és „mismatch” (nem specifikus kötődés) különbségek logaritmusának súlyozott átlagaival számol.) Ezek után a CLDN1, -3-11, -14-18, és az E-cadherin expressziós adatok átlagából képeztük az összetett junctionális mintázatot (Complex Junctional Signature - CJS). Az adatbázisokból nyert adatokat PAM alkalmazásával elemeztük, ami lehetővé teszi „zsugorított” centroidok létrehozását, és ez alapján kiválaszthatóak azok a gének, amelyek magas prediktív és/vagy prognosztikus

potenciállal rendelkeznek. Így tudtuk létrehozni az egyszerűsített (simplified) junctionalis mintázatot (signature) – SJS-t.

A hormonreceptor státusz meghatározásakor az Allred- (quick) score-t használtuk, ahol az 1-10% közötti immunhisztokémiai pozitivitás arány pontszáma 2 (az 5 lehetségesből), így akár csak gyenge intenzitású reakció (1 pont a lehetséges 3-ból) esetén is az Allred score 3-nak adódik. Az ajánlások szerint ilyen kismértékű pozitivitás esetén is hormonreceptor pozitívnak kell tekinteni a tumort. Professzor Úr ezzel kapcsolatos kérdésére tehát a válasz röviden: vizsgálatainkban a hormonreceptor pozitivitás határértéke 1% volt.

A 79. oldalon az alacsony PR expresszió határértékét irodalmi adat alapján választottuk: a 20%-os expressziós küszöb, amelyet a Perou munkacsoport (Prat és munkatársai, J Clin Oncol 2013;31:203-9.) javasolt a gyakorlati patológia számára, tapasztalati úton jött létre: a betegek túlélési adatait elemezve 20%-nál alacsonyabb PR expresszió esetén szignifikánsan kedvezőtlenebb prognózist észleltek.

Az őrszem nyirokcsomók lokalizálása a Semmelweis Egyetem I. Sebészeti Klinikáján, ahonnan eseteink döntő többsége származott, két módszerrel történt az évek során: kezdetben festékjelöléssel, majd izotóppal és vitális festékkel, az utóbbi években sajnátatos technikai okok miatt újra csak festékjelöléssel történik.

1. Hogyan értékeli a daganatos őssejtek szerepét az emlőrákos áttétek képződésében?

Az emlőrák őssejtek a daganatokban változó arányban jelenlévő agresszív fenotípusú sejtek, amelyek önmegújításra, differenciálódásra képesek, kemo- és radioterápia rezisztensek. Ezek a sejtek felelősek részben az intratumorális heterogenitásért és jelentős szerepük van a tumor-host interakciókban is. Az emlőrák őssejtek nagyon sok hasonlóságot mutatnak az emlőhám őssejttel. Az emlőrák őssejtek szerepét a metasztázisok kialakulásában az irodalomban számos szerző leírta, kísérletes modellekben igazolta – egy 2014-ben megjelent review cikk nagyon jó összefoglalást ad erről a kérdésről (Geng és mtsai Cancer Lett. 2014;349: 1–7). A tumor mikro környezetének is fontos szerepe van a daganat őssejtek (CSC, cancer stem cell) önmegújulásában: olyan gyulladáscsökkentő citokineket termelnek, amelyek ezt a folyamatot stimulálják. Legfontosabbnak a Wnt és a Hedgehog jelátviteli útvonal szerepét tartják ebben a folyamatban, emellett a Notch jelátviteli út szerepét is igazolták colon carcinoma sejtvonalon.

Emlőcarcinomában a keringő tumorsejtek mintegy 35%-a emlőrák őssejt fenotípusú: CD44^{high}/CD24^{low} és feltételezik, hogy a metasztázis iniciáló sejtek nagyfokú átfedést mutatnak az emlőrák őssejtekkel. Az emlőrák metasztázisok leggyakoribb lokalizációi (csont, tüdő, agy, máj) osteopontinban és hyaluronanban gazdagok, mindkét fehérje a CD44 specifikus ligandja. Az emlőrák őssejtek számos olyan tulajdonsággal rendelkeznek, amelyek ellenállóvá teszik őket a különböző káros hatásokkal (hypoxia, reaktív oxigén gyökök, irradiáció, toxikus szerek) szemben. Ezeknek a mechanizmusoknak egy részét ma már

ismerjük, röviden az alábbiak: ABC transzporterek fokozott expressziója, amelyek közé pl. a MDR 1 (multidrug rezisztencia protein) is tartozik; ALDH (aldehid-dehydrogenáz) aktivitás, amelyről ismert, hogy radiorezisztenciát okoz részben a reaktív oxigéngyökök eliminálása, részben antioxidáns molekula termelésének indirekt serkentése révén; az ALDH-ról továbbá kimutatták, hogy cyclofosfamid, epirubicin- és taxán rezisztenciában is szerepe van; fokozott DNS repair és reaktív oxigéngyök elimináció; autophagia – a sejtek homeosztázisának fontos mechanizmusa – nyugvó emlőrák őssejtekben fokozottan aktív. A sejtkárosító hatásokat kivédő mechanizmusok révén túlélnek, recidívák, áttétek forrásaivá válnak. Emellett ismert, hogy általánosságban az emlőrák őssejtek a DNS hypometilált állapota jellemzi, valamint fokozott onko-miR expressziójukat is igazolták. (Bozorgi A és mtsai, J Breast Cancer 2015;18:303-312)

Vizsgálatunkban, amelyet 10 metasztatizáló emlőrák következtében elhunyt beteg autopsziás mintáin végeztünk, a szomatikus mutációk klón-frekvencia analízise azt támasztotta alá, hogy az áttétek monoklonális eredetűek: egy közös metasztatizis prekursorból származtathatóak. Ebben a vizsgálatban a metasztatikus progresszió filogenezisének megismerése volt az egyik fő cél. A metasztatizis prekursor sejtek a primer tumorban és a metasztatizisokban is megtalálhatóak, ez utóbbiak további tumorszóródás forrásai lehetnek és további genom szintű változások is kialakulhatnak bennük. A keringésbe jutva egy másik szervi metasztatizisba is eljuthatnak („cross-seeding”), tovább fokozva az adott tumorgóc heterogenitását, és egyben alátámasztva a „self-seeding” elméletet is (Desmedt C és mtsai, Nature Communications 2017;8:14944)

2. Milyenek ítéli a progeszteron receptor expresszió jelentőségét az endokrin szenzitív emlőrákok prognózisában?

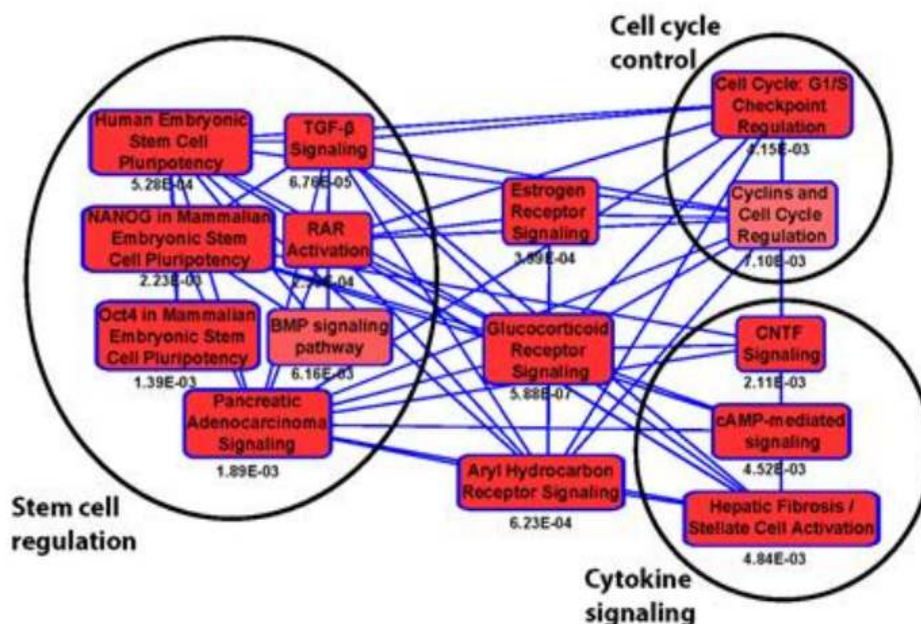
A progeszteron receptor és az ösztrogén receptor expresszió a legrégebben ismert biológiai prognosztikai és prediktív faktor emlőrákban. Ko-expressziójuk a hormon receptor pozitív emlőrák esetek kb. 2/3-ában észlelhető. Korábban a progeszteron receptornak nem tulajdonítottak nagy jelentőséget a betegség prognózisára gyakorolt hatást illetően, azonban *mára teljesen egyértelmű adatok igazolják, hogy a PR negativitás vagy alacsony expresszió rosszabb prognózist és mérsékeltebb endokrin terápia szenzitivitást jelez.* Saját anyagunkban a Luminális emlőrák esetek között a progeszteron receptor alacsony expresszió vagy negatív státusz 25%-ban volt megfigyelhető. Ezzel kedvezőtlenebb prognózis társult, amit egy OEP-től kért halálozási adat elemzés során is meg tudtuk erősíteni.

*A normál emlőhám*ban a PR és az ER más-más sejteken fejeződik ki, és csak néhány százalék azoknak a sejteknek az aránya, amelyekben mindkét hormon receptor jelen van. Az ER és PR funkciója is eltér – az emlőállomány fejlődése során az ER a ductusok növekedéséért, megnyúlásáért, míg a PR a TDLU-k fejlődéséért felelős. A felnőtt emlőben a ciklustól függően az emlőállomány ösztrogén vagy progeszteron hatása alatt áll.

Kísérletes körülmények között igazolták, hogy a normál emlőben az ER a luminális hámsejtekre jellemző, a PR a bazalis ill. progenitor sejtekben található főleg. Az ösztrogén a kemokin-és extracelluláris jelátviteli-, extracelluláris metabolikus- és hormonválasz funkciókat

szabályozza, a progeszteron az RNS processzálás, makromolekulák összeszerelése, mitokondrium szerveződés, sejtciklus szabályozás, szerin peptidáz gátlás, extracelluláris mátrix (ECM) kötődés funkciók irányításában vesz részt. Közös funkcióikat a sebgyógyulás, sejtadhézió és hormonválasz folyamatainak szabályozásában írták le.

Emlőrákban (transzkriptom analízis alapján) az ER és PR nagyfokú korrelációt mutat. Hálózatelemzéssel igazolták, hogy a PR 22 olyan nukleáris receptor- és ko-regulátor gén expressziójával korrelál, amelyekkel normál emlőben nem mutatható ki kapcsolat, és amelyek egyidejűleg ER-ral is korrelációt mutatnak. Ezek egy olyan hálózat részei, aminek centrumában az ESR1 gén található. A hálózatelemzés alapján ezek a nukleáris receptor- és ko-regulátor gének lényegében három funkcionális csoportba sorolhatóak: sejtciklus szabályozás-, citokin jelátvitel- és a pluripotens állapot megőrzéséért felelős gének (ábra).



Ábramagyarázat: Emlőrák mintákból kapott eredmények alapján az Ingenuity pathway analízis segítségével az ER-ral és PR-ral egyidejűleg korreláló nukleáris receptor- és ko-regulátor gének a daganatok működésében már ismert három fő funkcionális csoportba sorolhatóak.

Forrás: Hilton HN et al. *Oncotarget* 2014;5:8651-8664

További elemzéssel (upstream regulátoros analízis) kimutatható volt, hogy az ösztrogén a PR-ral korreláló gének leggyakoribb upstream szabályozója, vagyis emlőrákban a PR-ral korreláló gének ösztrogén szabályozás alá kerülnek.

Megfigyelték, hogy már DCIS-ben egyre több olyan sejt jelenik meg, amely ko-expresszálja az ER-t és PR-t.

Ami a normál emlőhámtól eltérő szabályozás klinikai jelentőségét illeti, a fent idézett szerzők a METABRIC emlőcarcinoma microarray adatbázis elemzése alapján azonosítottak 18, mind ER-ral, mind PR-ral szorosán korreláló gént. Legtöbbjük egyelőre ismeretlen funkciójú, de

szinte mindegyik tartalmaz ER és PR kötőhelyet. A 18 gén expressziójának mértéke alapján létrehozható egy olyan score rendszer, amelyben az értékek szorosán korrelálnak a metasztázis-mentes túléléssel. Érdekes, hogy a score értéke független prognosztikai faktornak bizonyult (ER- és PR expressziótól függetlenül, a magas score érték rosszabb prognózissal társult).

Egy 2016-ban megjelent rövid összefoglaló közleményben (Baird RD és Carroll JS, Current Oncology 2016;28:1-3) a PR-ral kapcsolatos legújabb elméleteket és eredményeket ismertetik a szerzők. Egészen a közelmúltig az volt az általános vélekedés, hogy a PR pozitivitás a működő ER passzív markere. Úgy tűnik, ez a nézet túlhaladottá vált, és az egyre tökéletesebb molekuláris technikáknak köszönhetően született újabb kutatási eredmények ismeretében a PR funkciójáról, működéséről alkotott elképzelést revideálni kell. Eszerint *a PR aktivitása megváltozik azokon a DNS szakaszokon, ahol az ER kötődik, így direkt módon modulálja az ER funkcióját, potenciálisan javítja az ER antagonisták hatékonyságát.* Új megfigyelés az is, hogy az ER által regulált transzkripció nem feltétlenül a DNS-nek azon a szakaszán vagy annak közelében jön létre, ahol az ER kötődik, hanem a legtöbb esetben távolabbi target gének transzkripcióját szabályozza. Az ER és ko-faktorai az ER kötő helyekhez kapcsolódva DNS hurok képződését okozzák, ami lehetővé teszi az ER komplex áthelyeződését távolabbi target gének szomszédságába. ER+/PR- daganatokban az ER kötőhelyei a DNS-ben különböznek az ER+/PR+ tumoroktól, nem meglepő, hogy ennek következtében más-más gének transzkripciója változik.

Az ER funkciójához elengedhetetlenek az ER kötő fehérjék, amelyek a DNS-hez kapcsolódásért és az ER-DNS interakció stabilizálásáért felelősek. Ma kb. 100 ilyen fehérjét ismernek, közöttük a FOXA1-t és a GATA3-t. Ezek közül a FOXA1 jól ismert, és tudjuk, hogy elengedhetetlen az ER funkciójához: hiányában az ER+ sejtek növekedése leáll. Az ER-ral interakcióban lévő fehérjék között azonosították a PR-t is, ami arra utal, hogy a PR-nak az ER komplex működésében is van szerepe.

PR agonistákkal kezelt emlőrák sejtekben vizsgálták a fehérjekötődés változásait. A PR interakciók változásaira fókuszálva számos fehérje szintje megnő (ER, FOXA1, GATA3, stb.) Azonban ha az ER interakciók változásaira fókuszálva történik az elemzés, az egyetlen fehérje aminek a szintje megemelkedik, a PR. Progeszteron hozzáadásával az ER kötőhelyek gyors átrendeződése következik be, és sok ezer új kötőhely jön létre. A progeszteron indukált ER-DNS kötőhelyeket a PR közvetíti, azaz *a PR szekvesztrálja az ER-t az új kötőhelyekre. Az eredmény az ER gén expressziójának gátlása és a sejtnövekedés leállása.*

In vivo kísérletekben (emlőtumor xenograftokban) is igazolták ezt a megfigyelést: tamoxifen mellé progeszteront adva csökkent a proliferáció, és a tumor növekedésének gátlása a kombinált kezeléssel hatékonyabbnak bizonyult.

A „PR hiányában nem működő ER” elmélet azért sem lehet igaz, mert jól ismert, hogy progrediáló ER+/PR- emlőrák esetekben az addig adott szerrel szembeni rezisztencia kialakulásakor az endokrin terápia váltás a progresszió lassulását eredményezi. Kísérletes eredményekből azt is tudni lehet, hogy endokrin terápiára rezisztens tumorokban ER-hoz kapcsolható transzkripciós aktivitás van; ilyen esetekben a tumor növekedése a FOXA1 jelenlététől függ. A közelmúlt kutatási eredményei arra is rávilágítottak, hogy ER+ tumorok

metasztázisaiban gyakoriak az ESR1 gén mutációi, amelyek a gén meghatározott helyein jönnek létre, és amelyek az ER működését függetlenítik az ösztrogéntől.

Összeségében *a kutatások eredményei azt sugallják, hogy a PR hiánya oki tényező az ER működésének megváltozásában és a tumor progressziójában.*


Leírtak egy olyan deléciót is a PR génjében, amely kiiktatja azt a „molekuláris kéziféket” – amelynek az ER szekvesztrálása és inaktiválása a feladata.

Mindezek a kutatási eredmények új utakat nyitnak az ER+ emlőrák kezelési lehetőségeiben.

A fent részletezett kutatási eredmények egy bonyolult mechanizmus működését tárták fel, amelyet a gyakorlat számára nagyon leegyszerűsítve úgy lehetne összefoglalni, hogy emlőcarcinomában az alacsony mennyiségben jelenlévő vagy hiányzó PR nem képes ellensúlyozni/gátolni az ER sejtproliferációt fokozó funkcióját, ezért tapasztalható, hogy az ER+/PR- és az ER+/PR alacsony expressziós státuszú emlőrákok prognózisa kedvezőtlenebb.

Köszönöm Professzor Úr észrevételeit, kérdéseit, és kérem, fogadja el válaszaimat.

Tisztelettel:



Dr. Kulka Janina
egyetemi tanár

Budapest, 2017. augusztus