

Válasz Prof. Dr. Méhes Gábor kérdéseire

Tisztelt Professzor Úr!

Köszönöm megtisztelő pozitív véleményét és a kérdéseit, amelyekre az alábbiakban igyekszem válaszolni. A kérdések szerteágazó problémafelvetése a szokásosnál hosszabb válaszokat eredményezett, kérem, hogy ezt nézze el nekem – igyekeztem a felvetett kérdéseket legjobb tudásom szerint megválaszolni.

1. Ismertek-e a PR reguláció genetikai/epigenetikai aspektusai és ezek mennyiben függenek össze az ER expresszióival? Mennyire lehet dinamikus az esetleges szétkapcsolódás és miért javíthatja ez a tumorsejtek túlélését? Mit jelent biológiai értelemben a 20%-os küszöb?

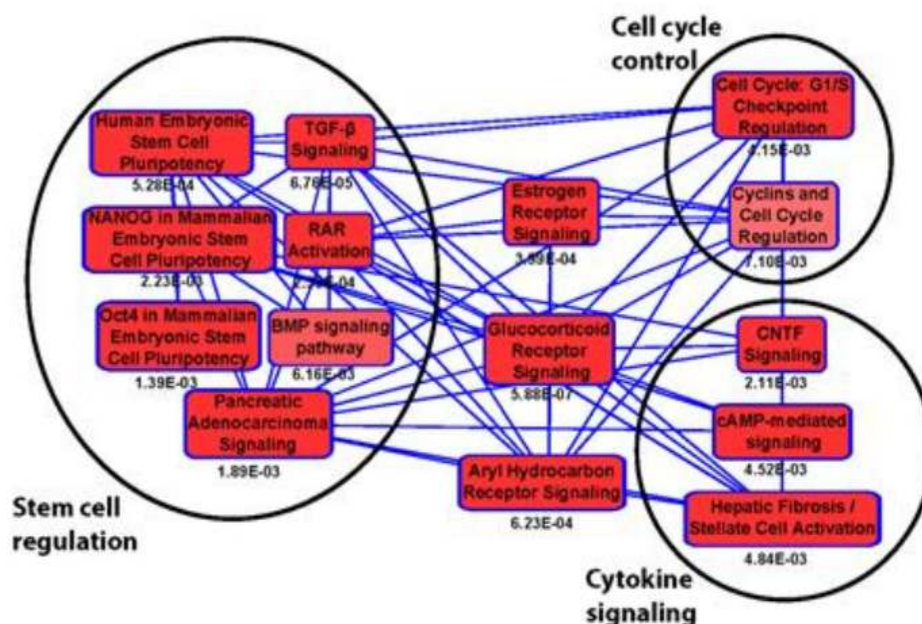
A progeszteron receptor és az ösztrogén receptor expresszió a legrégebben ismert biológiai prognosztikai és prediktív faktor emlőrákban. Ko-expressziójuk a hormon receptor pozitív emlőrák esetek kb. 2/3-ában észlelhető. Korábban a progeszteron receptornak nem tulajdonítottak nagy jelentőséget a betegség prognózisára gyakorolt hatást illetően, azonban mára teljesen egyértelmű adatok igazolják, hogy a PR negativitás vagy alacsony expresszió rosszabb prognózist és mérsékeltőbb 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 nagyon kevés olyan sejt található, amelyekben mindkét receptor egyidejűleg jelen van. Az ER és PR funkciója is eltér – az emlőállomány fejlődése során az ER a ductusok növekedéséért, megnyúlásáért, míg a PR a terminális ductalis-lobuláris egységek (TDLU-k) fejlődéséért felelős. A felnőtt emlőben a ciklustól függően az emlőállomány ösztrogén (E) vagy progeszteron (P) hatása alatt áll.

Kísérletes körülmények között igazolták, hogy a normál emlőben az ER a luminális hámsejtekre jellemző, a PR a bazális ill. progenitor sejtekben található főleg. Az ösztrogén a kemokin- és extracelluláris jelátviteli-, extracelluláris metabolikus- és hormonválasz funkciókat szabályozza, a progeszteron az RNS processzálas, makromolekulák összeszerelése, mitokondrium szerveződés, sejtciklus szabályozás, szerin peptidáz gátlás, 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. Hálózat elemzéssel 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. Hálózatelemzés eredményeként kitűnt, hogy 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 co-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 szorosan korreláló gént. Legtöbbjük egyelőre ismeretlen funkciójú, de szinte mindegyik tartalmaz ER és PR kötőhelyet. A 18 gén expresszió mértéke alapján létrehozható egy olyan score rendszer, amelyben az értékek szorosan 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 alkalmazott szerrel szembeni rezisztencia kialakulásakor az endokrin terápia váltás a progresszió lassulását eredményezi. Kísérletes eredményekből azt is tudni lehet, hogy endokrin terápiára rezisztens tumorokban is van ER-hoz kapcsolható transzkripciós aktivitás; 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 az ER működését függetlenítik az ösztrogéntől.

Összességében *a kutatások eredményei azt sugallják, hogy a PR hiánya nem a következménye, hanem az oka az ER működés megváltozásának és a tumor progressziójának.*

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

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

A 20%-os expressziós küszöb, amelyet a Perou munkacsoport (Prat A. és munkatársai, J Clin Oncol. 2013;31:203-9) javasolt a gyakorlati patológia számára, tapasztalati úton jött létre: a betegek túlélési adatait elemezve alakult ki ez az arányszám, ami alatt a PR expresszió mértéke szignifikánsan kedvezőtlenebb prognózissal társul. Ha a fent részletezett kutatási eredményekkel vetjük össze ezt az adatot, az állhat a tapasztalati úton nyert adat mögött, hogy az alacsony mennyiségben jelenlévő PR nem képes kellően ellensúlyozni/gátolni az ER sejtproliferációt fokozó funkcióját.

2. Vajon hogy lehetne a Ki67 meghatározás hibaforrásait a napi rutin vizsgálatok során kiküszöbölni? Milyen lehetőséget lát a sejtproliferáció egzakt vizsgálatára és annak minőségbiztosítására?

2015-ben publikálták az eddigi legnagyobb számú beteg (64 196 beteg) adatait magában foglaló meta-analízist, amelyben a Ki67 pozitivitás cut-off pontot 25%-nak találták – itt adódott a legnagyobb különbség a teljes túlélés tekintetében. (Petrelli F. et al. BreastCancer Res Treat 2015;153:477–491) Azonban ebben a cikkben is hangsúlyozzák mindazokat a fenntartásokat, amelyek a Ki67 meghatározás helyét, értékét, klinikai hasznosságát övezik. Denkert és munkatársai (The Breast 2015;24:S67-S72) a számos körvizsgálat eredményei alapján úgy vélik, hogy az „alacsony” és a „magas” Ki67 pozitivitás arány jól használható a klinikai gyakorlatban, míg az intermedier értékek esetében kiegészítő validált diagnosztikus tesztek (multigén teszt) szükségesek a terápiás döntéshez.

2017 februárjában jelent meg a European Group of Tumor Markers (EGTM) legújabb ajánlása, amely az emlőrák biomarkereinek klinikai alkalmazására vonatkozik. (Duffy MJ et al. European Journal of Cancer 2017;75:284e298) Míg az International Ki67 Study Group és az NCCN egyelőre nem javasolja a Ki67 pozitív sejtek arányának figyelembe vételét az emlőrákos betegek terápiájának tervezésekor, az EGTM – az ismert vitás és/vagy megoldatlan kérdések ellenére hasznos és megadandó paraméternek véli: ajánlásában úgy fogalmaz, hogy a >25% Ki67 pozitív tumorsejt arány olyan prognosztikus faktor, amelyet IB szintű evidencia támaszt alá. A meghatározás módjára az International Ki67 Study Group ajánlását tartja mérvadónak. További kutatási területként jelölik meg a laboratóriumok eredményei közötti eltérések okainak feltárását és a standardizáció javítását; az optimális cut-off pont megállapítását, vagy annak vizsgálatát, hogy megfelelőbb lenne-e a Ki67-nek folyamatos változóként való alkalmazása; annak vizsgálatát, hogy a Ki67 cut-off pontok vajon azonosak-e a prognózis és a terápia eredményességének előrejelzésében; automatizált képelemző programok alkalmazhatóságában rejlő potenciál vizsgálatát.

Ebben minden lényeges pont szerepel, amit ma a Ki67 meghatározás egyértelműbbé tételével, javításával kapcsolatban gondolni lehet.

Ha a magyarországi helyzetre gondolunk, akkor azonban van néhány további szempont, ami bizonyosan csökkenthetné legalább a hazai laboratóriumok Ki67 meghatározásai közötti eltéréseket. Legelsősorban a kötelező technikai és interpretációs minőségbiztosítás bevezetése, legalább azoknak a biomarkereknek az esetében, amelyekre a betegek kezelési tervét alapozzák – és helyes vagy nem - ezek között Magyarországon a legtöbb onkológus kolléga a Ki67 arányt is figyelembe veszi. A standard módszerek és IVD jelzéssel ellátott antitestek, a megfelelő kontrollok használata elengedhetetlen. Saját tapasztalat, és más munkacsoportok is rámutattak arra, hogy a Ki67 az ER-hoz hasonlóan érzékeny a preanalitikai fázis tökéletlenségeire: a túlfixálás a Ki67 pozitív sejtek arányának csökkenéséhez vezet. Magyarországon a preanalitikai fázisra a kelletténél sokkal kevesebb figyelmet fordítunk, nagyon sok sebészeti osztályon régi (rossz) beidegződések működnek a műtéti specimenek kezelésével kapcsolatban. A preanalitika kérdéseivel a patológiai szakmai ajánlások foglalkoznak – holott ennek a sebészeti szakmai ajánlásokban (is) lenne a helye. A műtő és a patológiai osztály között a Senki Földje helyezkedik el, és ez sok esetben rányomja a bélyegét a patológiai prediktív és prognosztikai diagnosztika minőségére.

Ismertek azok a közlemények, amelyek a pontos számolás, a képelemző szoftverekkel történő elemzés eredményeit vetik össze a rutin diagnosztikában legelterjedtebben használt becslés módszerével: a becslés minden esetben ugyanolyan jónak bizonyult, mint a bonyolultabb és időigényesebb módszerek. Meg kell jegyezni, hogy ezek a cikkek olyan munkacsoportoktól származnak, ahol működik a minőségbiztosítás, és feltételezhető, hogy a preanalitikai problémák sem számottevő nagyságrendűek.

Idén áprilisban jelent meg egy tanulmányunk (Pathol Oncol Res. 2017 Apr 11. doi: 10.1007/s12253-017-0220-8.), amelyben azt a következtetést vontuk le, hogy a digitális metszeteken képanalízis szoftverek segítségével pontosítani lehet a Ki67 pozitív sejtek arányának meghatározását, de csak akkor, ha ez nem teljesen automatikus, hanem a patológus által ellenőrzött módon történik. Összevetettük a digitális és hagyományos szemikvantitatív Ki67 meghatározás prognosztikai képességét, és nem mutattunk ki lényeges különbséget korai emlőcarcinoma eseteink vizsgálatakor.

Ami a Ki67 meghatározás standardizálását illeti, meggyőződésem, hogy a preanalitikai fázis standardizálásával nagyot lehetne előre lépni. A minőségbiztosításnak ki kellene terjednie a preanalitikai folyamatok kontrolljára is. Az interpretációs minőségbiztosítás bevezetése a Ki67 immunhisztokémia tekintetében véleményem szerint a prediktív diagnosztika színvonalának javulásához vezethetne, mert elősegíthetné, hogy az ilyen diagnosztikát művelő szakemberek korszerű és egységes irányelvek mentén végezzék a munkájukat amit pl. rendszeres és kötelező továbbképzések biztosíthatnak számukra. Az ilyen diagnosztikát végző laboratóriumok számára kötelezővé kellene tenni a külső minőségbiztosítási programokban való részvételt. Nem megfelelőség eseteire a technika vagy az interpretáció javítását célzó

intézkedések rendszerét (továbbképzések, szakirodalom biztosítása, laboratóriumi technika javítása, stb.) is ki kellene dolgozni.

Végül, azt is elképzelhetőnek tartom, hogy a Ki67 meghatározást a jövőben egy bonyolultabb „sejtciklus fehérje expressziós profil” helyettesítheti, ami feltehetően sokkal pontosabban tükrözi egy adott tumor proliferációs kapacitását és egyértelműbb információt adhat a prognózis vonatkozásában vagy a neoadjuváns kezelésre várható tumorválasz tekintetében.

1. Lehet-e külön prognosztikai szerepe a kromoszomális instabilitás (CIN) fenotípusnak a HER2 poliszómiásként értékelt esetekben? Vajon mennyi lehetett a HER2 génamplifikáció kíséretében egyidejűleg fennálló poli/aneuszómiás esetek aránya? Észleltek-e saját anyagukon a HER2 poli/aneuszómia csoportban CIN-re utaló, vagy más agresszív irányú génexpressziós eltéréseket?

A HER2 poliszómia kérdéséről úgy gondolom, hogy nagyon jó példája annak, amikor túlságosan leegyszerűsítve próbálunk megközelíteni egy jelenséget, ami a gének és kromoszómák szintjén zajlik. A rutin ISH vizsgálatokból (amelyek kezdetben csak HER2 próbával, az utóbbi években a 17. kromoszóma centromert is tartalmazó kettős jelölésű próbákkal történnek) a talált génkópia- és kromoszóma számbeli eltérésekre valóban kézzelfogható magyarázat lehetne a 17-es poliszómia. Ma már – ha rajtam múlna – ezt a kifejezést a HER2 és a 17. kromoszóma vonatkozásában csak idézőjelben használnám, hiszen évek óta tudjuk, hogy körültekintő molekuláris genetikai vizsgálatok azt igazolták, hogy a 17-es kromoszóma poliszómiája az emlőrák genomában nagyon ritka jelenség, és valószínűleg a 17-es kromoszóma centromer régió amplifikációja okozza a 17CEN jelek számának növekedését. (Marchio és munkatársai, J Pathol. 2009;219:16-24.)

Jelenleg egy olyan hármast jelölésű FISH próba van nálunk kipróbálásra, amelyet arra a célra fejlesztett ki a gyártó cég, hogy azokban az esetekben, amelyek a kettős jelölésű próbával poliszómiásnak tűnnek, tisztábban lehessen látni, hogy valóban a 17-es kromoszóma számbeli eltérése okozza-e a centromer jelek számbeli növekedését.

Saját anyagunkban (egy korábbi, nem publikált vizsgálatunkban), amelyben számos klinikopatológiai paramétert vettünk figyelembe, azt találtuk, hogy a HER2 gén poli- és aneuszómiásként értelmezett emlőcarcinomák több szempontból köztes csoportot képviselnek a biztosan HER2 negatív és biztosan HER2 amplifikált daganatok között: az ER és PR státusz-, az átlagos proliferációs ráta- és a p53 pozitív tumorok aránya szempontjából köztes csoport, ugyanakkor a grade megoszlás, nyirokcsomó státusz szempontjából közelebb állnak a HER2 negatív daganatokhoz, de a pT2 tumorok (>2cm) előfordulási gyakorisága szempontjából inkább a HER2 amplifikált daganatokhoz hasonlók.

Intézetünkben az elmúlt évek rutin eseteit áttekintve, a kettős jelölést tartalmazó próbával végzett FISH vizsgálatok során a HER2 amplifikált esetek között a 17-es kromoszóma „poliszómiás” esetek aránya 30-35% között változott.

A CIN (kromoszomális instabilitás) a sejtosztódás során létrejövő nagy kromoszóma szakaszok vagy egész kromoszómák szerzését vagy elvesztését jelenti, szolid tumorokban ez a leggyakoribb formája a genom instabilitásnak. Globális aneuploidia, amplifikációk, deléciók, heterozigótaság elvesztése (LOH), transzlokációk, inverziók fordulnak elő. Az intra- és intertumorális heterogenitás hátterében nagyrészt ez a jelenség áll. Számos gén hibája idézhet elő CIN-t, pl. a STAG2, ami a kromoszómák kondenzációjában és szétválásában játszik szerepet, TRF1, aminek hibája telomer diszfunkciót okoz, a DNS hibajavító ATM, vagy a BUB1 és Mad2, az osztódási orsó ellenőrző pontjainak működésében kulcsszerepet játszó gének hibái. A CIN molekuláris hátterének magyarázatára eddig három elmélet született: a mutátor hipotézis, az onkogének okozta DNS károsodás és a telomer erózió elmélet. (Pikor L et al, Cancer Metastasis Rev 2013; 32:341–352).

Jelenleg a CIN-t célzó gyógyszerek is fejlesztés alatt állnak, amelyek célja lehet a DNS károsodás megelőzése, a DNS repair mechanizmusok támogatása/felerősítése, centrosoma clusterek kialakulásának megakadályozása, telomeráz aktivitás csökkentése. (Ferguson LR et al. Seminars in Cancer Biology 2015;35: S5–S24)

A CIN státuszt egy kollaborációs tanulmányban volt alkalmunk tanulmányozni, 185 emlőrák esetünkben (Szász AM és mtsai, PLOS ONE 2013;2:e56707). In silico adatbázisok elemzése után a „CIN4” expressziós mintázatot hoztuk létre, amely az AURKA, FOXM1, TOP2A, TPX2 géneket foglalta magában. A CIN4 grade-del és prognózissal mutatott összefüggését az adatbázisokban igazolni tudtuk. Szövetmintáinkban a CIN4 expressziós mintázatot elsősorban a grade 2 daganatok prognózisában betöltött szerepére fókuszálva vizsgáltuk, és kimutattuk, hogy ezt a klinikai szempontból (is) köztes tumorcsoportot a négy gén expressziója alapján egy jó és egy rossz prognózisú csoportra lehet szétbontani (14 hónapos túlélési különbséget tapasztaltunk). Retrospektív betegcsoportunkban az ER+/HER2- daganatok voltak többségben, ezekben az esetekben a CIN4 expressziós mintázatot külön is vizsgáltuk: az eredményeink igazolták, hogy ebben a homogénebb betegcsoportban is szignifikáns prognosztikus információt hordozott. Mivel viszonylag kevés HER2+ (és tripla negatív) tumoros beteg mintája állt rendelkezésünkre ebben a vizsgálatban, a CIN4 prognosztikus szerepét ezekben az alcsoportokban nem tudtuk vizsgálni.

A FACS analízissel végzett ploiditás vizsgálatban a CIN4 expresszió szignifikáns összefüggést mutatott a DNS index-szel. A CIN4 expresszió a hormonreceptor pozitivitással szignifikáns inverz korrelációt-, a HER2 expresszióval és a HER2/CEN17 FISH eredményével szignifikáns korrelációt mutatott, vagyis a CIN4 expressziója viszonylag gyakoribb volt az ER-/HER2 pozitív daganatokban. HER2 poliszómiás eseteket ebben a tanulmányban külön csoportként nem vizsgáltunk, de úgy gondolom, érdekes lenne ebből a szempontból megvizsgálni ezt a tumorcsoportot. Feltételezem, hogy a CIN4 mintázat a HER2 poliszómiásként értékelt tumorokban is jellemző.

2. Kiterjedtebb mRNS expressziós vizsgálataik eredményeként elsősorban a grade 2-es emlőkarcinómák prognosztikai elkülönítésére és az anti-ösztrogén terápia predikciójára

vonatkozó 3 génes expressziós panelt állítottak fel. A génexpressziós profilok interpretációját megkönnyítendő, bioinformatikai vagy matematikai formulákat alkalmaztak, amit complex (CJS) és simplifiedjunctionalsignature (SJS) értékekkel jellemeztek. Szerencsés lett volna a metodika kifejtése kapcsán az értékek tartalmára, a módszer validálására vonatkozó információkat is közölni...

A grade 2-es emlőrák esetek heterogén csoportot képviselnek, szemben a viszonylag homogénebb grade 1 és grade 3 emlőrákokkal. Ezt a tényt egy néhány évvel ezelőtt megjelent cikk (Sotiriou C. és munkatársai, J Natl Cancer Inst. 2006;98:262-72.) kétséget kizáróan azzal is alátámasztotta, hogy génexpressziós vizsgálatokkal bebizonyosodott, hogy molekuláris genetikai értelemben csak grade 1 és grade 3 emlőrák létezik, vagyis a hisztológiai grade 2 emlőrákok egy jobb és egy kedvezőtlenebb prognózisú csoportot is magukban foglalnak. A GGI (Genomikai Grade Index) azóta kereskedelmi forgalomban kapható multigénes diagnosztikus tesztként (MapQuant Dx) is elérhető – azonban a többi ilyen típusú diagnosztikus teszthez hasonlóan nagyon drága. A mi vizsgálataink in silico analízisre alapultak, majd egy „tréning” vizsgálatot is elvégeztünk. Az in silico elemzés során a CIN70 génexpressziós mintázatból a tumor grade-del összefüggést mutató géneket hagytuk meg, így kaptuk a CIN61 génexpressziós mintázatot. A centroidot (a legerősebb összefüggést mutató gének) 10 differenciáltsággal legerősebben összefüggő gén képezte, amelyek közül 8 (AURKA, CCNB2, CDC2, FOXM1, KIF11, MSH6, TOP2A, TPX2) azonos volt mind az öt elemzett adatbázisban. A CLDN4 gén expressziós adatait hozzátéve a 8 fenti génhez, a grade-del való összefüggés szempontjából állítottunk fel újra rangsort. Az elemzés eredményeként 3 gén (TOP2A, FOXM1, CLDN4) képes volt a grade 2 tumorok eltérő prognózisú csoportjainak elkülönítésére. A 9 gén expresszióját mértük meg formalinos szövetmintáinkon (3 kontroll gén mellett) qPCR módszerrel. A duplikátumban végzett mérések során a relatív expressziós arányt a $\Delta\Delta C_t$ módszerrel számoltuk ki. Az eredményeket Prediction Analysis for Microarrays (PAM) módszerrel értékeltük. A magas előrejelzési potenciállal bíró gének kiválasztása során a PAM folyamatosan emeli a gének expressziójából levont küszöböt, amelynek hatására a korrigált génexpresszió folyamatosan csökken. Ezen „shrunken centroid”-nak nevezett csökkentett génexpresszió szignifikánsan eltérő génjei adták az előre jelző génlistát.

Anyagi források hiányában sajnos nem volt lehetőségünk tumormintákon validációs vizsgálatokat elvégezni (1000 esetben terveztük validálni az eredményeinket). In silico validálásról azonban vannak adataink, bár itt a TOP2A és a FOXM1 mellett a harmadik gén a MKI67 volt (Székely B és munkatársai: A 3-gene proliferation score (TOP-FOX-67) can re-classify histological grade-2, ER-positive breast cancers into low- and high-risk prognostic categories. Breast Cancer Res Treat. 2013;138:691-8.), amelyek a kereskedelmi forgalomban kapható multigénes prognosztikai tesztekkel összemérhető értékűnek mutatták az eredményeket.

Ami a tight junction fehérjék mintázatának prognosztikai értékével foglalkozó tanulmányokat illeti, a kiindulást itt is in silico elemzések jelentették. A bioinformatikai elemzést biológiai tudományokban jártas matematikus (Micsinai Mariann, akkoriban a Yale University School of Medicine kutatója, jelenleg Principal Data Scientist, Pivotal Software, Inc.) végezte. Itt 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 logaritmusan súlyozott átlagaival számol.) Ezek után a CLDN1, -3-11, -14-18, és az E-cadherin expressziós adatok átlagából képeztük a Complex Junctionalis Signature (CJS) -t. 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.

3. Van-e a Claudin expresszió változás irodalomból idézett poszttranszlációs mechanizmusainak/fokozott eliminációjának meglétét alátámasztó újabb adat?

2016-ban jelent meg az az áttekintő közlemény (Liu és munkatársai, J Proteome Res. 2016;15:339-59) amely az addig megismert post-transzlációs mechanizmusokat összegzi, amelyek a CLDN fehérjék expresszióját és funkcióit befolyásolhatják. A foszforiláció (bizonyos claudinok esetében ismertek a specifikus foszforilációs lókuszek, és ezek hatása a működésükre), palmitoiláció, ubiquitinizáció, sumoiláció (az utóbbi két mechanizmusról egyelőre állati sejteken végzett kísérletekből vannak adatok), glikolizáció (a claudin fehérjék esetében ritkán figyelték meg) és proteolízis (amely kóros állapotokban –pl. a bél hámjának fokozott permeabilitásával járó betegségekben-, de a fiziológiás turnoverben is szerepet játszik) a claudin fehérjék funkciójának csökkenéséhez, a tight junction struktúrák teljes vagy részleges felbomlásához, a claudinok lokalizációjának megváltozásához vezethetnek.

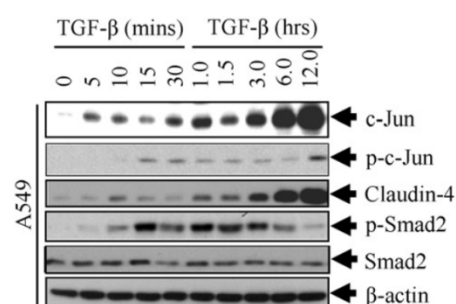
Saját vizsgálatokat nem végeztünk a claudin fehérjék expressziójának csökkenése (változása) hátterében álló poszttranszlációs mechanizmusok tisztázására.

A transzkripció szabályozás szintjén leírták, hogy a miR155 overexpressziója a claudin-1 mRNS, és claudin-1 fehérje expresszió csökkenését okozza. Ez utóbbi mechanizmust ovarium carcinomákban észlelték, de ugyanakkor vannak adatok arra vonatkozóan, hogy emlőtumoros betegek szérumában a magas miR155 szint kedvezőtlen prognózissal társult. (Qin és munkatársai FEBS Lett. 2013;587:1434-9., Roth és munkatársai Breast Cancer Res. 2010; 12:R90.)

4. A tight junction complex egyes alkotóinak megjelenése milyen módon járulhat hozzá a tumorsejtek agresszív viselkedéséhez? Kapcsolódási struktúrákról lévén szó, a csökkenést még csak értenénk, de mi a helyzet a fokozott expresszióval? Vannak-e saját megfigyelések, esetleg irodalmi adatok arra vonatkozóan, hogy egy neopláziában az egyes claudinok milyen hatással lehetnek a sejtek túlélésére, adhéziójára, migrációjára, stb.?

Saját kísérleteket, amelyek a claudin expresszióban bekövetkező változások mechanizmusának tisztázását célozta volna, nem végeztünk. Az alábbiakban irodalmi adatokra támaszkodva igyekszem a kérdést megválaszolni.

Nem-kissejtes tüdőcarcinoma sejtekben a közelmúltban igazolták, hogy a Claudin-4 expresszió fokozódását TGF- β idézi elő a c-Jun útvonal közvetítésével (Rachakonda G. és munkatársai Cellular Signalling 2016;28:1537–1544): a kutatások szerint a TGF- β transzkripció szinten felül-regulálja a Claudin-4 expressziót, ezt a hatást a c-Jun mediálja. Az idézett munkacsoport kimutatta, hogy a TGF- β a sejtmigrációt és a kolónia-képződést stimuláló hatását a Claudin-4 molekulán keresztül fejti ki.



A szerzők ezen az ábrán mutatták be az A549 sejtvonalon kapott eredményeket: Látható, hogy a Claudin-4 és a c-Jun fehérjék mennyisége a TGF- β hatására a TGF- β kezelés időtartamával arányosan növekszik. Ezzel, valamint a c-Jun gátlás esetén elmaradó Claudin-4 expresszió fokozódás elmaradásával látták igazolva, hogy a TGF- β a c-Jun-onkeresztül fokozza a Claudin-4 expresszióját.

2015-ben jelent meg egy közlemény a CLDN4 sejtproliferációt, apoptosist, migrációt befolyásoló hatásairól, amelyeket MCF-7 emlőrák sejtvonalon igazoltak. A CLDN4 overexpresszió növeli a sejtproliferációt és fokozza a migrációs képességet, és csökkenti az apoptosist. A CLDN4 gén hypometilációját alapvető mechanizmusként írták le a gén fokozott működésében. (Xiaotang MA OncologyReports 2015;34:681-690)

Liu és munkatársai (a fent már idézett, J Proteome Res. 2016; 15:339–359.) nagy review cikkében a claudinok működésével és szerepével, a szabályozási mechanizmusokkal kapcsolatban áttekintik a kutatások eddigi eredményeit. Ebben a közleményben a kérdéssel kapcsolatban az alábbi megfigyelésekről számolnak be:

CLDN1 overexpresszáló transzgén egér modellben az intesztinális epiteliális differenciáció fő regulátorát, a Notch útvonalat, a MMP9-cel és p-ERK jelátviteli útvonallal együtt, a CLDN1 overexpresszió felülregulálja.

SW480 humán colon carcinoma sejtvonalban a CLDN1-et a Wnt/ β catenin downstream targetjeként azonosították, és a CLDN1 fehérje overexpresszióját vastagbél carcinomák sebészi mintáiban is kimutatták.

MDA-MB-231 sejtvonalban a CLDN5 overexpresszió növeli a sejtmotilitást, és a kísérletekben az N-WASP és a ROCK1 fehérjékkel észleltek co-immunprecipitácót. Ezek alapján az is felmerült, hogy a CLDN5 a metasztázis képzésben játszhat szerepet.

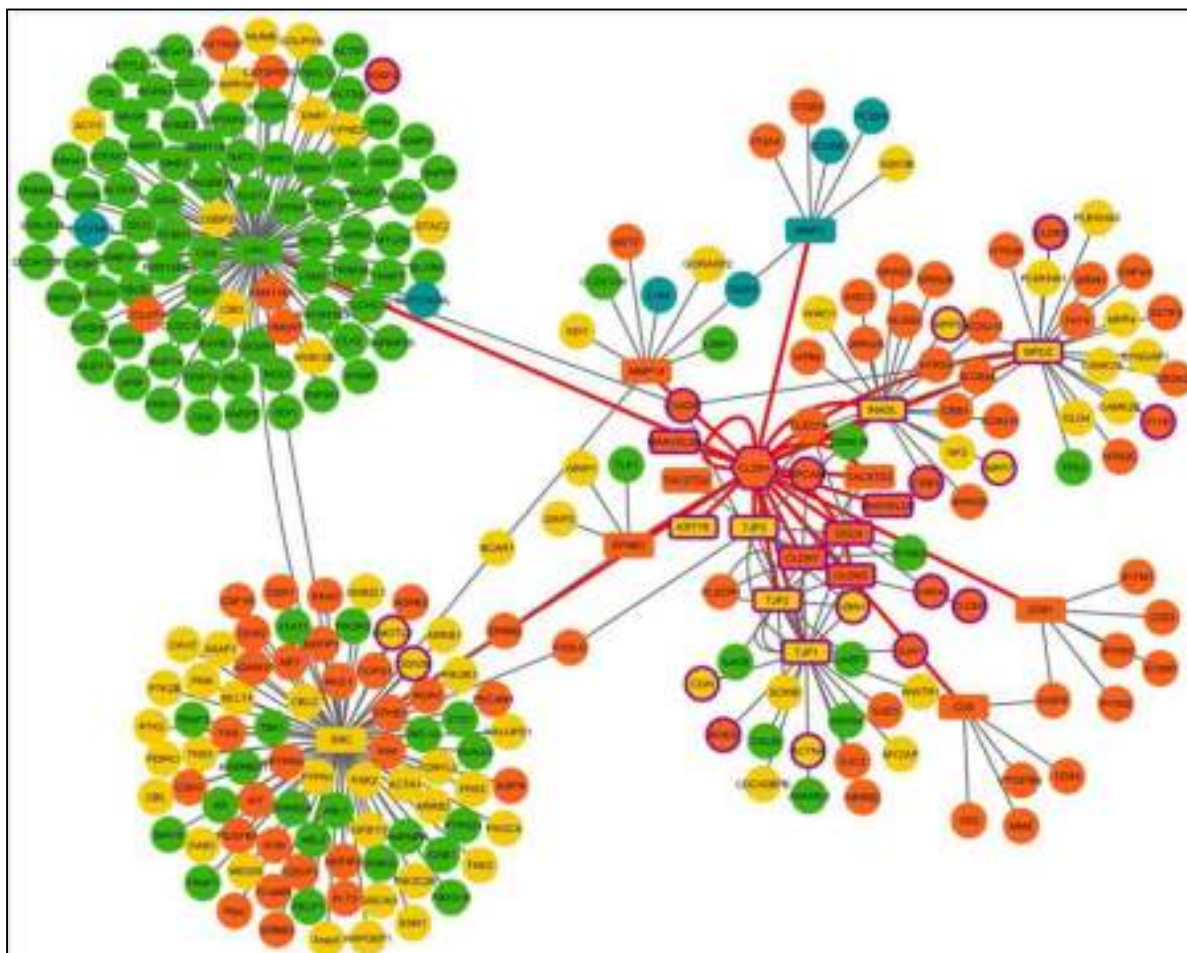
A CLDN7 és EpCAM komplexeket alkotnak, amit co-immunprecipitációs kísérletekben igazoltak HEK293 sejtvonalban. (Ez a sejtvonal vese embrionális sejtekből származik.) Ezen sejtek proliferációjához a CLDN7-EpCAM komplexek jelenléte szükséges – ezek hiányában a mitogénszignalizáció inaktív. Egerekbe oltott HEK–EpCAM–CLDN7 sejtekből daganatok alakultak ki, míg az EpCAM-CLDN7 komplexek nélküli HEK sejtek egerekbe oltva nem indukáltak tumorokat.

Emlőcarcinomákban a CLDN1, -3, -4, -7 szerepével kapcsolatban ismert a legtöbb adat az irodalomban, és saját vizsgálatainkban is főleg ezekre fektettünk hangsúlyt. A vizsgálataink kezdetekor, a normál emlőhám claudin mintázatának feltérképezését követően, emlődaganatokat vizsgáltunk különböző szempontok szerint. A várakozásunkkal ellentétben a tanulmányozott claudin fehérjék expresszióját nem egyöntetűen csökkent mértékűnek, hanem változatos módon csökkent vagy fokozott mértékűnek találtuk a normál emlőhám sejtekhez viszonyítva. Úgy vélem, hogy a tanulmányaink óta publikált, fent idézett alapkutatási eredmények némi magyarázattal szolgálnak arra a látszólag ellentmondásos megfigyelésre, ami a tight junction fontos alkotóelemeinek, egyes claudin fehérjéknek fokozott expressziója és a daganatprogresszió és/vagy kedvezőtlen prognózis közötti egyenes arányú összefüggésre vonatkoznak.

Az általunk vizsgált emlőrák esetekben észlelt CLDN1 expresszió csökkenés összhangban van más kutatócsoportok eredményeivel.

Nem hagyható figyelmen kívül az sem, hogy a claudinok csupán az egyik típusú fehérjecsalád a komplex rendszerben, amelyben transzmembrán és plakk-fehérjék találhatók. A claudinok a transzmembrán fehérjék közé tartoznak az occludinnal, JAM-mal és CAR-ral együtt.

A claudin fehérjék bonyolult rendszerét és szabályozási-, valamint kölcsönhatás mechanizmusait a fent említett review cikk egy ábrája, amely csak a CLDN1 fehérje hálózatát mutatja be, igen jól szemlélteti:



Ábramagyarázat: narancssárgával jelölték az intrinsic membránfehérjéket, amelyek legalább egy transzmembrán doménnel rendelkeznek. Sárga színnel a perifériás membránproteineket ábrázolták. Ez a két csoport plazma membrán és endomembrán (endosoma, Golgi, endoplasmásreticulum, citoplazma vesiculumok) fehérjéket tartalmaz, mitochondriális és sejtmag membrán fehérjéket nem vettek bele ebbe a két csoportba. Zöld színnel a cytosol, mitochondrium és magi fehérjéket ábrázolták. A szekretált fehérjék (szignál fehérjék) kék körökként szerepelnek az ábrán. A lila szegély azokat a fehérjéket jelöli, amelyek a tightjunction alkotóelemei. A piros vonalak a CLDN1-gyel direkt kapcsolatban álló fehérjéket mutatják (TJP1/ZO-1, TJP2/ZO-2, TJP3/ZO-3, MPDZ, INADL, TACSTD2, SRC, KRT76, LNX1, CD81, CD9, OCLN, MARVELD2, MARVELD3, CLDN3, CLDN7, MMP14, MMP2, és EFNB1)

5. Volt-e lehetőség az AURKA gén emlőrákokban is leírt amplifikációját vizsgálni? Mekkora lehet itt a génamplifikáció szerepe, és milyen a viszonya a fehérje ill. RNS expressziós eredményekkel?

A mai napig sem teljesen tisztázott az a folyamat amely az AURKA és AURKB overexpressziójához vezet. Egyes szerzők szerint emlőtumorokban ösztrogén-receptor mediált útvonal vezet az AURKA és AURKB gének amplifikációhoz és így a fehérjék overexpressziójához (Li JJ és munkatársai, Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101:18123-8.). Egy

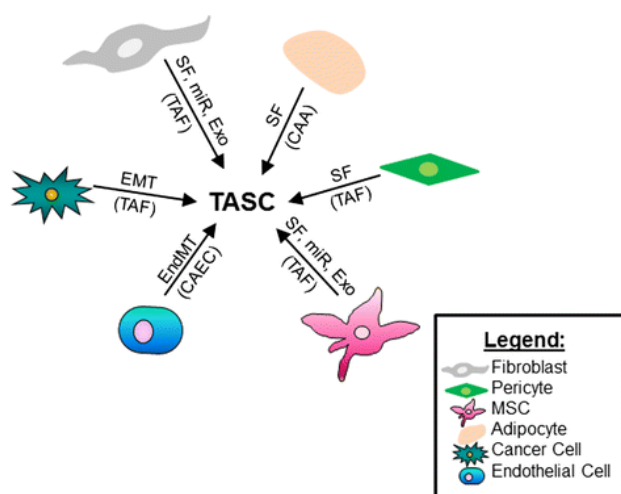
2015-ös közlemény szerint magas AURKA és AURKB expresszió volt kimutatható az aromatáz inhibitor (AI) rezisztens sejtekben, valamint az AURKA inhibitorok, mint az alisertib és danusertib az AI-rezisztens sejtekben leállították a sejtciklus progresszióját a G2/M fázisban. (Hole és munkatársai Breast Cancer Res Treat. 2015;149:715-26.)

2013-ben japán szerzők közöltek adatokat arra vonatkozóan, hogy az AURKA gén amplifikáció, -mRNS és -fehérje expresszió nem áll szoros összefüggésben, és a kliniko-patológiai jellemzőkkel való összefüggésükben is eltérnek (Yamamoto és munkatársai, BMC Cancer 2013, 13:2179.) Ők az AURKA mRNS szintje és az emlőrák relapszus mentes túlélése között találtak szignifikáns összefüggést, amelyet sem a gén-, sem a fehérje overexpressziója kapcsán nem tudtak igazolni.

Tanulmányunkban jelentősen magasabb AURKA fehérje expresszió volt kimutatható a metasztázisokban ($p=0,041$), míg nem volt számottevő különbség a primer tumor- és kontroll csoport összehasonlításban ($p=0,174$). A különböző lokalizációjú metasztázisokat összehasonlítva, a központi idegrendszerben kialakult áttétekben volt leggyakrabban kimutatható intenzív (3+) AURKA expresszió. A Ki-67 fehérjeexpresszió esetén 15%-os küszöbértéket meghatározva, szignifikáns összefüggést mutatott az AURKA expresszióval ($p=0,001$). Tanulmányunk eredményei arra utalnak, hogy a vizsgált két fehérje fokozott expressziója a távoli áttéteket alkotó tumorsejt populáció jellemző sajátossága, de a fokozott expresszió mértéke az áttét lokalizációjától (feltehetően valójában az adott lokalizációban jellemző molekuláris- ill. immunfenotípustól) is függ. Kettős jelölésű FISH reakciókat (Kreatech) végeztünk a fentebb említett mintákon az AURKA génamplifikáció kimutatásához. *A rendelkezésre álló FISH próbával azt találtuk, hogy az AURKA fehérje overexpresszió hátterében csak részben mutatható ki AURKA génamplifikáció.* Sajnos azonban a minták nem minden esetben voltak optimális minőségűek, ezért nem minden esetet tudtunk megbízhatóan értékelni. AURKA mRNS mérést a kromoszomális instabilitás prognosztikus szerepével kapcsolatos munkánkban végeztünk, itt azonban fehérje expressziót és génamplifikációt nem vizsgáltunk.

6. Milyen kapcsolat várható a matrix összetétele és a primer tumorban fellelhető stromasejtek, esetleg gyulladásos sejtek száma között? Mennyire ismert a tumorsejtek által expresszáltfibroblast-stimuláló növekedési faktor, citokin profil prognosztikai szerepe?

Bussard és munkatársai egy tavaly megjelent nagy review cikkben foglalják össze a tumor stromával kapcsolatban ismert kutatások, megfigyelések eredményeit. A tumor stromasejtjei a környező „host” sejtekből származnak, elősegítik az extracelluláris mátrix remodelálását, a sejtmigrációt, neoangiogenezist, inváziót, a terápiával szembeni rezisztencia kialakulását, és citokinek, kemokinek és növekedési faktorok termelése révén a tumor semlegesíti az immun védekezési mechanizmusokat is.



Ábra magyarázat: A tumor stroma sejtjei (tumor associált stromális sejtek) különböző eredetűek: fibroblaszt, pericita, csontvelői őssejtek, zsírsejtek, endothél sejtek és maguk a tumorsejtek is EMT révén. Forrás: Bussard KM BreastCancer Research 2016;18:84

A tumor stromában található sejtek jellemzői röviden az alábbiak:

Tumor asszociált fibroblastok (TAF): ezek a sejtek aktivált fibroblastok, amelyek a sebgyógyulás folyamatában valamint gyulladásban szereplő fibroblastokkal mutatnak rokon vonásokat. Tumor progresszió során fokozott proliferációjuk észlelhető, és számos mechanizmus révén fokozzák a tumor növekedését és a kemoterápiával szembeni rezisztenciában is jelentős a szerepük. A tumor stroma TAF sejtjei gyulladásos citokineket termelnek és így a gyulladás fenntartásában, neoangiogenezisben, makrofág sejtek intratumorális felszaporodásában játszanak szerepet, mindezek a daganat növekedését segítik elő. Továbbá szerepüket igazolták a matrix remodelálásban is. Az angiogenezist a TAF sejtek pericitákat és endothel sejteket stimuláló faktorok termelése is segíti. Korábban a mesenchymális őssejt- és fibroblast eredetű TAF-okat bizonyos markerek segítségével azonosították: alfa-SMA, tenascin C, fibroblast-specifikus protein-1, fibroblast aktiváló protein, és neural-glial antigen.

Tumor asszociált adipocyták (cancer associated adipocytes, CAA): a matrix remodelálásban, invázióban és a daganatsejtek túlélésében szerepet játszó faktorokat termelnek, emellett EMT-t indukálnak. Inzulín-like növekedési faktor kötő protein 2-t (IGFBP-2) termelnek, ami fokozza a migrációt és humán emlő carcinomák metasztázis képzését in vitro és in vivo körülmények között is. (Wang és mtsai PLoSOne. 2015;10:e0119348) Érett zsírsejteket emlőcarcinoma sejtekkel ko-kultúrában tenyésztve kimutatható, hogy a daganatsejtekben fokozódik a MMP-11, IL-6 és IL-1 β expressziója. (Dirat és mtsai Cancer Res. 2011;71:2455–65) A kutatások eredményei azt sugallják, hogy a zsírsejtek és a daganatsejtek kölcsönhatása jelentős tényező az emlődaganatok mikrokörnyezetének kialakításban.

Tumor asszociált endothel sejtek (cancer associated endothelial cells, CAEC): a csontvelő eredetű proliferáló endothel sejtek endothelialis-mesenchymális tranzíció (EndMT) mennek át TGF- β jelenlétében – vagyis az endothel sejtek fibroblaszt-szerű sejtekké alakulnak. Ezekben a sejtekben a CD31 alul regulált, az FSP1 és az alfa-SMA fokozottan expresszálódik. (Nieman KM Nat Med. 2011;17:1498–503) Kemoterápia fokozza ezekben a sejtekben a TNF-alfa termelését, ami NF-Kappa B fokozott termelésén keresztül CXCL1/2 termelését fokozza. Ez a myeloid sejtek bevándorlását idézi elő, valamint a CAEC-k S100A8/9 termelését növeli – ezzel fokozva a daganatsejtek túlélését és kemorezisztenciáját. (Acharyya S Cell. 2011;150:165–78.) Leírták azt is, hogy a daganat által aktivált keringő endothel sejtek chaperon-ként működve a célzott terápiás szerek ellenére a daganatsejteket a távoli metasztázis helyeire segítik eljutni. (Yadav A PLoS One. 2015;10:e0141602)

Tumor asszociált immun-stroma: az immun-mediált válasz diszregulációja következik be amiatt, hogy macrophagok, dendritikus sejtek, NK sejtek, myeloid eredetű szupresszor sejtek, Treg sejtek pro-tumor környezetet teremtenek. A macrophag populáció immunszuppresszív és pro-angiogén hatású, emellett a tumorsejt migrációt és az invazivitást is fokozza. (Medrek C. BMC Cancer. 2012;12:306.) A myeloid eredetű szupresszor sejtek TAM sejtekké differenciálódnak, elősegítik a tumorsejtek immunválasz által történő eliminálásának elkerülését, részt vesznek a matrix remodellálásban és a tumorsejtek EMT folyamatában is. (Yu C. J Immunol. 2013;190:3783–97) A dendritikus sejtek abnormális érése az immuntoleranciát segíti elő. Az NK sejtek két típusát írták le: tumor infiltráló NK sejtek és tumor asszociált NK sejtek, amelyek pro-angiogén citokineket (VEGF és SDF-1) expresszálnak, ami a tumor progressziót segíti elő. (Bruno A. Neoplasia. 2013;15:133–42.) A Treg sejtek oki szerepét is tisztázták a tumor ellenes immunválasz csökkentésében, a tumor progresszió elősegítésben (Curiel TJ. Nat Med. 2004;10:942–9.)

A tumor stromában található immunsejt infiltrátum (TIL, tumor infiltráló lymphocyták) aránya fontos tényező az emlőrák neoadjuváns kezelésre adott válasza előrejelzésében. Az eddigi tanulmányok eredményei egyértelműen arra utalnak, hogy a fokozott TIL arány kedvezőbb terápiás választ jelez előre. Kétségtelen azonban, hogy számos esetben a magas TIL arány ellenére sem következik be kedvező tumorválasz. Ezért a vizsgálatok abban az irányban is folynak, hogy a TIL pontos összetételét meghatározva pontosabb prediktív információt lehessen adni. Tenascin-C (TNC) -ben gazdag stromában dominálnak a myofibroblast szerű sejtek, valamint az újdonszerű erek; a tumor stroma összetételének és a neoadjuváns kezelés eredményességének összefüggéseit vizsgáló tanulmányunkban a TIL jelenlétét, mennyiségét nem vizsgáltuk, de a fentiek tükrében érdekes lenne e két meghatározó stromális komponens összefüggéseit is elemezni.

Érdekes megfigyelés, hogy a stroma aránya önmagában prognosztikus jelentőségű, azonban ER+ és ER- emlőrák esetekben ellentétes értelemben: a tömegesebb stromával rendelkező tripla negatív (TN) tumorok szignifikánsan kedvezőtlenebb prognózissal rendelkeznek (Dekker

TJ. és munkatársai Breast Cancer Res Treat. 2013;139:371-9.), ER+ daganatokban épp ellenkezőleg, a tömegesebb stroma a kedvezőbb prognózisú esetekre jellemző (Downey CL. és munkatársai Br J Cancer. 2014;110:1744-7)

Bussard és munkatársai a tumor asszociált stroma 5 fő típusát különítik el, melyek közül a mesenchymális őssejt-szerű a legkevésbé agresszív, míg a matrix remodellálással jellemzett a legagresszívebb. Ez utóbbiban alacsony az SMA- és magas a fibroblast aktiváló protein (FAP: serin proteáz) és a fibroblast specifikus protein 1 (FSP1) expresszió. További stroma típusok az endothelial-like, a myofibroblast-like és a pericyta-like stroma, rájuk jellemző fehérje expresszióval. A myofibroblast-like stromában írják le a TNC-t, mint jellegzetes fehérjekomponenst. Ez a stroma „aktivált” stromatípus, agresszivitás szempontjából köztes helyet foglal el (az idézett cikk 2. ábrája, ld. lent).

Stromal Cell Phenotype	Markers Expressed	Aggressiveness
MSC-like	CD105, CD90, CD73, CD44	Least Aggressive
Endothelial-like	CD31	
Myofibroblast-like	Alpha SMA, TnC	More Aggressive
Pericyte-like	NG2, PDGFr	
Matrix-remodeling	FSP1, FAP, alpha SMA-	Most Aggressive

Forrás: Bussard KM. BreastCancer

Research 2016;18:84

Jachetti és munkatársai 2015-ben közzétették transzgén egerek prostata intraepitelialis neoplasia léziókból izolált prostata daganat őssejteken (CSC) végzett kísérleteik eredményét (Cancer Res; 75(10);2095–108.), amelyek során a TNC tumorimmunitással való összefüggését is vizsgálták. A CSC-k elpusztításában *in vitro* kísérletek alapján az NK és T sejteknek van szerepe, ugyanakkor az is ismert, hogy a CSC-k gátolják a T-sejtek működését. Az idézett közlemény az első, amelyik *in vivo* körülmények között is választ keresett a CSC-T-sejt interakció megválaszolatlan kérdéseire. Eredményeik szerint a *TNC immunszuppresszív molekula*: gátolja a T-sejt receptor dependens T-sejt aktivációt, -proliferációt és -citokin termelést, azaz, gátolja a T-sejt mediálta immunsurveillance-t. Ez, és korábbi kísérletes adatok vezettek oda, hogy jelenleg már folynak klinikai vizsgálatok, amelyekben anti-TNC antitest terápiás hatékonyságát vizsgálják.

A citokinek prognózist befolyásoló szerepéről tavaly jelent meg egy figyelemreméltó közlemény (Espinoza JA, Oncoimmunology 2016;5:e1248015). Vizsgálatukban a szerzők emlőtumorból és normál emlőszövetből származó intersticiális folyadék citokin profilját hasonlították össze. 27 citokint vizsgáltak, amelyek közül 11 jelentősen nagyobb mennyiségben volt kimutatható a karcinómákból származó intersticiális folyadékban: interleukin 7, -10, -12, -13, -1 β , fibroblast növekedési faktor-2, IP-10 (IFN- γ inducible protein),

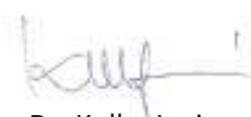
IL-1 receptor antagonista (IL-1RA), PDGF- β , chemokin ligand 5 (RANTES), VEGF. Immunhisztokémiai vizsgálatok során kimutatták, hogy az IL-1RA, IP-10, IL-10, PDGF- β , RANTES és VEGF mind a tumorsejtekben, mind a TIL-ban jelen vannak. A tumorok altípusaival való összefüggést elemezve, a tripla negatív fenotípusú daganatokat a LuminalisA tumorokkal összehasonlítva az IL-10 és a RANTES szignifikánsan magasabb szintjét észlelték. A túlélési adatok elemzése az IL-5 kedvezőtlen prognosztikai szerepét igazolta.

Ami az FGF/FGFR-t illeti, számos kutatócsoport munkája irányul arra, hogy az emlőrákok egy részében észlelhető FGFR gén amplifikációjának jelentőségét tisztázza. Egy tavalyi Cancer Science cikk DNS – mRNS - fehérje szintű vizsgálatokról számol be, amelyek azt igazolták, hogy az FGFR fehérje overexpressziója ER+/HER2- emlődaganatokban rövidebb betegségmentes túléléssel jár. (Tomiguchi M et al. Cancer Sci 2016;107: 491–498)

Idén márciusban a Nature Reviews Cancer-ben nagy áttekintő cikket közöltek az FGFR lehetséges szerepeiről, a génben bekövetkező lehetséges változásokról és ezek hatásairól, valamint a jelenleg már elérhető vagy még csak klinikai kipróbálás alatt álló FGFR gátló gyógyszerekkel szerzett eddigi tapasztalatokról solid tumorokban – ez utóbbi kapcsán részletesen tárgyalják a lehetséges rezisztencia mechanizmusokat is. (Babina IS és Turner NC Nature Reviews Cancer doi:10.1038/nrc.2017.8) A fibroblast növekedési faktor (FGF) szerepével kapcsolatban emlőrákban az FGF2-ről ismert, hogy EMT-t facilitál. Magas FGF2 szint jellemző tripla negatív fenotípusú emlőcarcinoma sejtvonalban, különösen a mesenchymális fenotípusúban. A serum emelkedett FGF2 szintjét találták számos daganatos betegben, köztük emlőrákos betegekben is, főleg progrediáló betegség esetén. Az FGFR2 IIIc izoformája az FGF2-höz magasabb affinitást mutat – a IIIc izoformát húgyhólyag-, pancreas-, colon- és prosztaták esetében fokozott invazivitással hozták összefüggésbe. Az FGF2-nek az angiogenezisben is szerepe lehet: angiogenezist gátló gyógyszerekkel szembeni rezisztencia esetén magasabb FGF2 szintet találtak, ugyanakkor kettős FGF és VEGF blokkolás egér pancreas neuroendocrin tumor modellben a tumor növekedés és az angiogenezis gátlását eredményezte.

Köszönöm Professzor Úr kérdéseit, amelyekkel további lehetőséget adott számomra ahhoz, hogy a munkacsoportom egyes klinikopatológiai tanulmányokra alapozott eredményeit a legújabb alap kutatások eredményei tükrében tekinthettem át. Kérem, hogy válaszaimat fogadja el.

Tisztelettel:



Dr. Kulka Janina
egyetemi tanár

Budapest, 2017. augusztus