

## Válasz Dr. Szentirmay Zoltán kérdéseire

Tisztelt Tanár Úr!

Mindenekelőtt nagyon köszönöm, hogy elvállalta a disszertációm bírálatát. Kedvező véleménye, dicsérő szavai különösen megtisztelőek számomra.

A feltett kérdésekre az alábbiakban válaszolok.

### **1. Tudna-e a jelölt olyan általánosan használható optimalizált protokollt ajánlani, ami erősen lecsökkenti az emlőrákok fenotípusos osztályozásának különböző laboratóriumokban észlelhető eltéréseit?**

A magam részéről alapvető problémának látom, hogy a hazai patológiai gyakorlatban a *kötelező* külső minőségbiztosítás (technikai és interpretációs) hiányzik. A Magyar Patológus Társaság résztulajdonában lévő QualiCont Kht. által magas szinten szolgáltatott külső minőségbiztosítási program, önkéntes jellege miatt, sajnos nem elegendő a megoldáshoz. Saját tapasztalatom (részben konzultációs, részben az onkoteam patológus tagjaként, mint másodvéleményező) alapján számos ponton látok szinte konstans hibákat, amelyeket röviden itt felsorolok: 1) külső kontrollok nélkül végzett immunhisztokémiai reakciók, 2) szuboptimális minőségű, kézzel végzett, hátteres immunhisztokémiai reakciók, 3) túlértékelt pozitivitás: a) a Ki67 reakciók értékelésekor előfordul, hogy a „hot spot”-ban becsülhető pozitívítási arány szerepel a leletben, b) „hot spot” hiányában is előfordul a pozitív sejtek arányának túlbecsülése, c) a HER2 reakcióban a score2+ viszonylag gyakori túlértékelése score 3+ -ként, 4) HER2 score 2+ esetekben nem minden esetben küldik tovább a kollégák automatikusan ISH vizsgálatra a mintát (ez a kezelés tervezésében súlyos késedelmet okozhat), 5) álnegatív hormonreceptor meghatározás. A felsorolt hibák számos forrásból erednek, de nagy részük egy jól működő, jól kontrollált rendszerben külső minőségbiztosítással kiküszöbölhető lenne.

Az a véleményem, hogy hiába vannak egyértelmű protokollok (magyar nyelven is hozzáférhetően), ha alapvető technikai és interpretációs problémák miatt fals eredmények születnek. Sajnos a fals eredmények egy része későn kerül napvilágra (neoadjuváns terápiával kezelt esetekben mindenképp), így a betegek egy része túl- vagy alulkezelt, vagy eredménytelen kezelésben részesül. Azt gondolom, hogy emlőrákos betegeket kezelő onkológusok számára (is) abszolút nélkülözhetetlenek vagyunk, de ez egyben olyan felelősséget ró ránk, aminek maximálisan meg kell felelnünk. Mindannyiunknak, akik az onkológiai kezeléseket (gyógyszer indikációkat!) alapvetően meghatározó leleteket adunk, ezzel a felelősséggel minden egyes esetben tisztában kell lennünk, maximálisan teljesítve a technikai követelményeket és az interpretáció szabályait.

**2. A TOPFOX-nak nevezett génexpressziós mintázat lehetőséget teremt arra, hogy grade 2 stádiumú (és esetenként II. stádiumú) emlőrákban szenvedő betegek széles körénél a diagnózis pillanatában meghatározható lesz az esetleg szükséges (pl. neoadjuváns) terápia. Bevezették-e, vagy tervezik bevezetni ezen alapuló teszt rutinszerű használatát?**

Egy diagnosztikus (és még inkább prediktív és/vagy prognosztikus) teszt bevezetése nagyszámú mintán elvégzett validációs vizsgálatot és masszív finansziális háttérrel igényel. A validáció egyelőre csak in silico történt meg (az MKI67-tel kiegészítve, Székely B és munkatársai, Breast Cancer Res Treat. 2013;138(3):691-8), a paraffinos mintákon elvégzett validációs vizsgálathoz azonban a finansziális háttérrel eddig nem tudtuk biztosítani. Folyamatosan keressük a lehetőségeket, ebben Szász Marcell tanítványom és kollégám élenjáró aktivitást fejt ki. Reményünk van arra, hogy a közeljövőben lehetővé válik a validációs vizsgálat elvégzése és azt követően (amennyiben az eredményeink a vártaknak megfelelően alakulnak) a teszt napi gyakorlatba történő átültetése, esetleg klinikai vizsgálat keretén belül.

**3. Sokszor probléma – főleg core-biopsziás mintában –, hogy a látott differenciált mirigy proliferáció még jóindulatú elváltozás-e, vagy már differenciált carcinoma. Adott esetben a myoepithel sejtek jelenlétének vizsgálata sem ad megfelelő eredményt. Jelölt véleménye szerint ezekben az esetekben a claudin 1 immunhisztokémia segíthet?**

A claudin-1 komplex szerepet tölt be különböző szervek daganataiban, emellett vírusok (HCV, Dengue) „receptora”-ként is működik. Emlőcarcinómában sok közlemény számolt be az expresszió csökkenéséről, azonban bizonyos típusú daganatokban éppen ellenkezőleg, overexpresszió észlelhető. Blanchard és munkatársai (Virchows Arch. 2009; 454:647-569) ER+ emlőcarcinoma eseteikben szinte kivétel nélkül claudin-1 expresszió vesztést észleltek, azonban ER- daganatokban épp ellenkezőleg, e fehérje overexpresszióját írták le. Ezen adatok, és részben a saját tapasztalataink alapján is, a feltett kérdés vonatkozásában a claudin-1 expresszió vizsgálata hasznos lehet, azonban hozzá kell tenni, hogy pl. in situ carcinomákban nagyon korlátozott adatok állnak rendelkezésünkre a claudin-1 expresszióval kapcsolatban. Intézetünkben végzett vizsgálatok alapján portio in situ laphám carcinomákban a claudin-1 konzekvens és egyértelmű expressziója lehetőséget teremt diagnosztikus eszközként való használatára (Sobel és munkatársai, Hum Pathol. 2005;36:162-9), olyannyira, hogy egy diagnosztikus teszt fejlesztése is megtörtént. Emlőcarcinomák esetében nem tapasztaltunk ennyire konzekvens expresszió változást minden esetünkben. Véleményem szerint a claudin-1 expresszió hiányának immunhisztokémiai kimutatásánál megbízhatóbb olyan diagnosztikus célra forgalmazott antitestek használata, amelyek a myoepithel sejtek detektálására szolgálnak (p63, p40, magas molekulású cytotokeratinok, S100, simaizom-actin, CD10). Az ezekkel végzett immunhisztokémiai reakciók egyértelmű állásfoglalást tesznek lehetővé. A claudin 1 fehérje hiánya kiegészítő vizsgálatként hasznos lehet, de semmiképpen sem kizárólagos diagnosztikus eszközként. Kivételesen ritkán fordul elő, hogy microglanduláris adenosis (MGA) vs jól differenciált invazív carcinoma kérdésében kell döntenet, ilyen esetekben

az S100 pozitívitas és ER negativitas segíthet a MGA felismerésében. Nincs arról tudomásom, hogy claudin-1 (vagy más claudin fehérjék) expressziójának vizsgálatát végezték-e ebben a ritkán előforduló emlőelváltozásban, de mindenképpen érdekes lenne egy ilyen tanulmány.

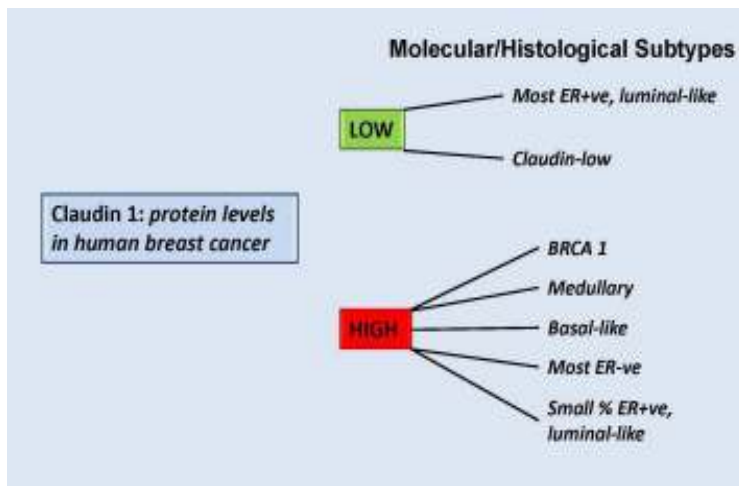
**4. Az opponens úgy képzelte el, hogy minél kevesebb a daganatsejteket összetartó adhéziós molekulák száma, a tumor sejtek annál könnyebben kiszabadulnak a szöveti kötelékekből és könnyebben adnak áttéteket. A claudin prognosztikus vizsgálatoknál láttuk, hogy ez esetleg csak a Luminális B tumor csoportba tartozó daganatoknál lehet így, más tumor típusoknál biztosan nem ez a helyzet. Kaphatnánk-e a jelenségre valamiféle magyarázatot? Szerepet játszhat-e itt az epitheliális-mesenchymalis transitio (EMT) jelensége?**

A claudin fehérjék szerepéről az irodalmi adatok is ellentmondásosak, vagy legalábbis úgy tűnik, hogy egyelőre nem tisztázott, hogy a daganatok keletkezésében, a prognózisban, a metasztázis képzésben pontosan milyen szerepet játszanak. Fokozza a bizonytalanságot, hogy a claudin-low molekuláris altípusba tartozó emlőcarcinomák nem azonosíthatóak egyértelműen a claudin fehérjék expressziójának vizsgálatával (saját ezirányú vizsgálatainkban is tapasztaltuk, és irodalmi adatokból is ismert - pl. Ricardo és munkatársai, *Histol Histopathol* 2012;27:1283-1295). Feltételezhető, hogy epigenetikai tényezők játszanak szerepet abban, hogy a génexpressziós- és fehérje-szintű vizsgálati eredmények nem mutatnak szoros korrelációt ebben a tekintetben. A claudin-1 fehérje expresszió csökkenésében két epigenetikai mechanizmusról van meggyőző adat az irodalomban: az egyik a CLDN1 gén promoter régió metilációja (Di Cello és munkatársai, *PLoSOne*. 2013; 8:e68630.), a másik a miR155 overexpressziója, amely mind a claudin-1 mRNS, mind a claudin-1 fehérje expresszió csökkenését eredményezi. Ez utóbbi mechanizmust ovarium carcinomákban írták le, 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.) Emellett poszttranszlációs mechanizmusok is jelentős változásokat eredményezhetnek a fehérje expresszióban (és funkcióban).

Egyes szerzők a claudin-1 overexpresszió és az EMT közötti egyenes összefüggést igazolták, míg mások (jelentős többségben) a „claudin-low” emlőrák altípusban észlelték az EMT-ban szerepet játszó egyéb gének/fehérjék overexpresszióját. A „claudin-low” génexpressziós mintázatú emlőrák csoportot az ER negatív nagy csoport tagjaként azonosították először (Herschkowitz J és munkatársai *Genome Biol.* 2007;8:R76). Prat és munkatársai (*BreastCancer Res.* 2010;12:R68) a „claudin-low” alcsoportban vimentin és keratin5 ko-expressziót mutató tumorsejtek dúsulását írták le. Ugyanez a munkacsoport az EMT-re legjellemzőbb génexpressziós mintázat és az emlőrák molekuláris altípusai között is talált összefüggést: az EMT „core” génmintázat leginkább a metaplasztikus- és a „claudin-low” alcsoporttal mutatott szoros korrelációt. (Taube és munkatársai *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107:15449–15454)

A claudin-1 emlőrák keletkezésében, progressziójában betöltött szerepe nem teljesen tisztázott. Úgy tűnik, hogy tumor szuppresszor és onkogén szerepe egyaránt lehetséges. Az egyik legvalószínűbb onkogén mechanizmus az expresszió csökkenése vagy elvesztése révén az EMT facilitálása. Egy másik igazolt mechanizmus a stromális fehérjékkel, elsősorban matrix metalloproteinázokkal (MMP) igazolt kölcsönhatása: fokozott claudin-1 expresszió a matrix degradáló MMP-k fokozott funkcióját eredményezi, direkt kölcsönhatás révén.

A claudin-1 expresszió az emlőrák molekuláris altípusaiban nem egységes, ahogy ezt az alábbi összefoglaló ábrán látjuk.



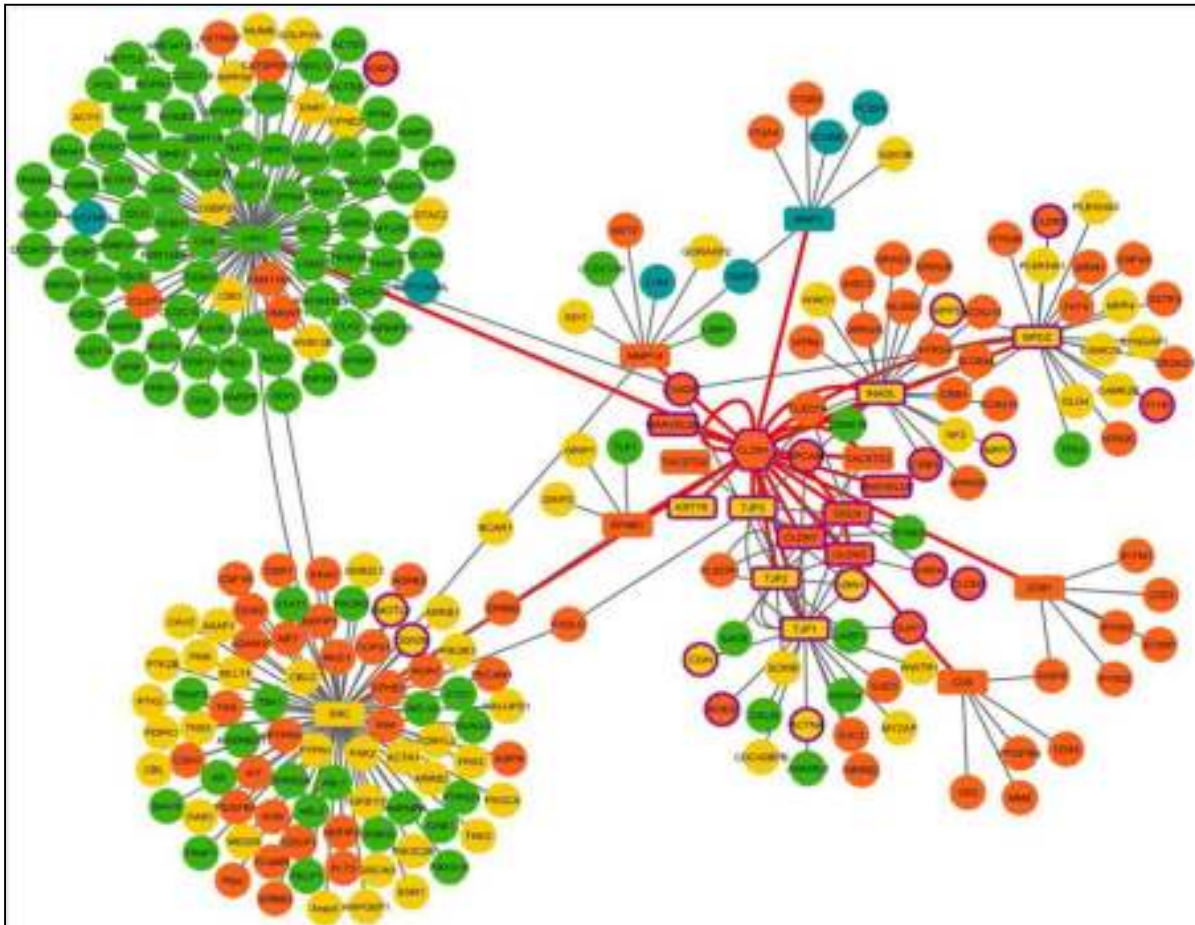
Forrás: Zhou és mtsai, J ClinMed. 2015; 4: 1960–1976

Saját vizsgálatunkban az immunhisztokémiai fenotípus alapján „Luminális B” típusba sorolt daganatokban észleltük a legalacsonyabb claudin-1 expressziót. Ebbe a csoportba soroltuk az hormonreceptor pozitív/HER2 pozitív eseteinket, és a hormonreceptor pozitív/HER2 negatív, de >20% Ki67 kötődési indexszel rendelkező daganatokat.

A claudin-1 fent részletezett onkogén mechanizmusait tekintve így valóban az látszik valószínűnek, hogy „Luminális B” daganatokban az EMT-re jellemző molekuláris genetikai meghatározottság is szerepet játszhat e tumorok kedvezőtlenebb prognózisában.

Az emlődaganatokban vizsgált egyéb claudinok (elsősorban a -3, -4, és -7) expressziójának változása – csökkenése vagy fokozódása – és ezeknek a változásoknak az összefüggése a prognózissal nem feltétlenül egyenes arányú, és nem mechanikusan a tight junction (TJ) sejt-kohézióra gyakorolt csökkent vagy megerősödött hatásából vezethető le, ahogy ezt már a claudin-1 esetében is láttuk. Emellett azt sem téveszthetjük szem elől, hogy a claudinok nem egyedüli alkotóelemei a szoros sejtkapcsoló struktúráknak, csupán az egyik típusú fehérjecsald a komplex rendszerben, amelyben transzmembrán és plakk-fehérjék találhatóak. A claudinok a transzmembrán fehérjék közé tartoznak az occludinnal, JAM-mal és CAR-ral együtt, a plakk fehérjék között PDZ domént tartalmazó és PDZ domént nem tartalmazó fehérjék is vannak. Előbbiek közé tartozik pl. a MAG1, az Afadin, utóbbiak közé pl. a Cingulin és a Symplekin.

A claudinok számos membrán- és citoplazmatikus rendszerrel és magi fehérjével is kapcsolatban állnak: az alábbi ábrán példaként a claudin-1 hálózata látható:

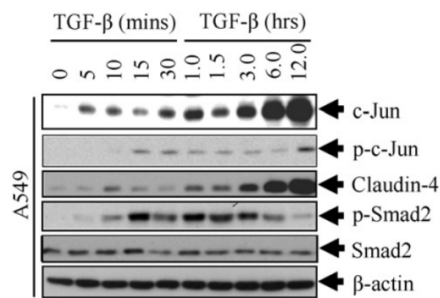


Ábramagyarázat: narancssárgával jelölték az intrinsic membránfehérjéket, amelyek legalább egy transzmembrán doménnel rendelkeznek. Sárga színnel a perifériás membránproteineket ábrázolták. Ez a két csoport plazma membrán és endomembrán (endosoma, Golgi, endoplasmásreticulum, citoplazma vesiculumok) fehérjéket 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)

Forrás: Liu és munkatársai J Proteome Res. 2016; 15:339–359.

Nem-kissejtes tüdőcarcinoma sejtekben a közelmúltban igazolták, hogy a Claudin-4 expresszió fokozódását TGF- $\beta$  idézi elő a c-Jun útvonal közvetítésével (Rachakonda G. és munkatársai Cellular Signalling 2016;28:1537–1544): a kutatások szerint a TGF- $\beta$  transzkripció szinten felül-regulálja a Claudin-4 expressziót, ezt a hatást a c-Jun mediálja. Az idézett munkacsoport

kimutatta, hogy a TGF- $\beta$  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- $\beta$  hatására a TGF- $\beta$  kezelés időtartamával arányosan növekszik. Ezzel, valamint a c-Jun gátlás esetén elmaradó Claudin-4 expresszió fokozódás elmaradásával látták igazolva, hogy a TGF- $\beta$  a c-Jun-on keresztül 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, *Oncology Reports* 2015;34:681-690)

Jiwa és munkatársai (*BMC Cancer* 2014;14:864. ) a claudin-4 expressziót primer tumorokban és párosított áttéteikben vizsgálták, és megállapították, hogy a metasztázisokban növekszik az expresszió a primer tumorokhoz viszonyítva. A metasztázisokban fokozott claudin-4 expresszió (vagy a claudin-4 re-expressziója olyan tumorokban, ahol a primer daganatban a fehérje nem expresszálódik), előnyt jelenthet a metasztázis cél szervében a tumorsejtek kolónia képzésében.

BRCA1 mutációt hordozó betegekben kialakuló emlőrák eseteket vizsgálva egy holland munkacsoport claudin-1, -3, -4, -7 fokozottabb expresszióját írták le. (van Voss és munkatársai, *Histopathology*, 2014, 65, 814–827.)

Saját vizsgálatunkban, amelyben BRCA1/2 mutációt hordozó és vad típusú BRCA1/2 génnel rendelkező betegek tumorait hasonlítottuk össze, újabb példáját láttuk annak, hogy a claudin gének és –fehérjék expressziója eltér: fehérje expresszió szintjén a claudin-3 overexpresszióját észleltük a BRCA1/2 mutációt hordozó betegek tumoraiban, míg a publikus génexpressziós adatbázisokból nyert adatok egyéb claudinok génjeinek overexpresszióját is igazolták (CLDN-1, -3, -4, -7). (Madaras és munkatársai *Pathobiology*. 2016;83(1):1-1)

## 5. Fiatal korban vagy terhesség során jelentkező triple-negatív vagy Luminalis-B típusú emlőrákok esetén indokolt lehet-e a BRCA mutációs vizsgálatok kezdeményezése?

Tekintettel arra, hogy ezek a daganatok az esetek döntő többségében 40 éves kor előtt kerülnek diagnosztizálásra, véleményem szerint indokolt a BRCA mutációs vizsgálatok elvégzése. A „fiatal” kor értelmezése az emlőrák kialakulásának tekintetében az idők során változott, jelenleg az EUSOMA a 40 éves kor alatt kialakult emlőrák eseteket sorolja ebbe a kategóriába. Eszerint az ajánlás szerint minden fiatal emlőrákos betegnek fel kell ajánlani a genetikai tanácsadást, és ezt követően az emlőrák kialakulására predisponáló BRCA mutáció meghatározást. Magyarországon is helyesnek tartanám követni az EUSOMA ajánlást, elsősorban azért, mert a mutációk felismerése terápiás következményeket is vonhat maga után, de amiatt is, hogy a mutációt hordozó családok fokozott figyelemmel történő követése, célzott szűrése lehetővé tenné korai stádiumú egyéb szervi daganatok felismerését is (ovarium, pancreas, prostata, stb.)

Az EUSOMA ajánlásban az alábbi táblázat szerepel ezzel a kérdéssel kapcsolatban:  
(Forrás: Partridge és munkatársai, Breast 2014;23(3):209-20.)

**Table 3**  
Genetic counseling and testing.

Guideline statement	LoE
6. Every young woman (under 35–40) with breast cancer should be offered genetic counseling before starting the treatment and in follow-up, if not done initially.	Expert opinion
7. Genetic testing should be conducted only following genetic counseling with a genetic counselor (or other trained health professional) who explains the implications of the results of the genetic testing. The patient must be made aware that the presence of a predisposing mutation may have an impact on patient management, follow-up and decision making, as well as for family members.	Expert opinion

## 6. Milyen típusú kemoterápiára rezisztens emlőrákokban figyelhető meg a tenascin-C overexpressiója és erre a jelenségre jelenleg milyen lehetséges magyarázat adható?

Ezt a kérdést kétféleképpen lehet értelmezni: 1) *milyen típusú kemoterápiás kezelésre rezisztens tumorokban láttunk tenascin-C (TNC) overexpressziót, ill. 2) milyen típusú emlőrákokban, amelyek kezelésre nem reagáltak, figyelhető meg a TNC overexpressziója.*

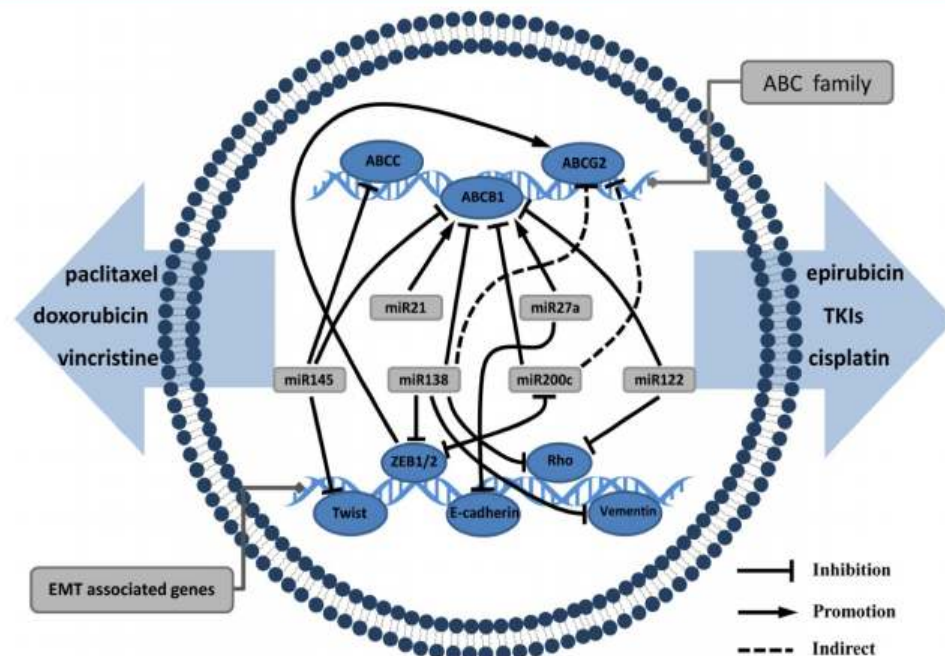
Az első megközelítésre az alábbiakat tudom válaszolni: TNC-vel kapcsolatos vizsgálatunkban eseteink neoadjuváns kezelésben részesült betegek voltak, és a kezelési protokoll nem különbözött a kezelésre reagáló és alacsony- valamint a kezelésre nem reagáló és magas stromális TNC expressziót mutató esetekben: a betegek döntő többsége valamilyen taxán származékot kapott platina származékkal kombinálva, illetve kevesebb esetben

anthracyclinnel kombinációban. A vizsgált időszakban a HER2 ellenes célzott terápia még nem volt elérhető Magyarországon.

A kérdés másik értelmezése szerint sem láttunk összefüggést a kemorezisztencia – TNC overexpresszió – tumortípus között. A kezelésre nem reagáló, stromájukban TNC overexpressziót mutató daganatok között tripla negatív és Luminalis B tumorok fordultak elő, ám az egész betegcsoportban ez a két tumortípus volt a leggyakoribb.

Egy 2008-ban megjelent tanulmány (Hellemann és munkatársai, Clin Cancer Res 2008;14:5555-64) arról számolt be, hogy a stromális TNC overexpresszió hormonreceptor pozitív emlődaganatok Tamoxifen rezisztenciáját okozza. Katoh és munkatársai (Oncogenesis 2013;2:e65) vizsgálatukban kimutatták, hogy a TNC,  $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ - és  $\alpha\text{v}\beta\text{1}$  integrinekhez kötődve a tumorsejtekben EMT-t indukál.

Az EMT szerepéről a kemorezisztenciában néhány hete jelent meg egy közlemény (Jiang és munkatársai, J Cancer. 2017; 8(12): 2319–2327.), amelyben leírják, hogy az EMT az ABC transzporterek fokozott működését indukálja. A mechanizmus lényeges elemének tartják azokat a mikroRNS-eket (miR), amelyek mind az EMT-ben szerepet játszó transzkripciós faktorok, mind az ABC transzporterek működését befolyásolják. Az alábbi ábra a cikkből származik:



**Figure 2.** miRNAs have a complex regulatory network that can regulate EMT and ABC genes: miRNAs such as miRNA122, miRNA 138, miRNA145, miRNA200 can not only inhibit mesenchymal markers, but also act as ABC transporters suppressor. miRNA21 and miRNA27a often promote EMT progression and upregulate ABC transporters expression that mediate the processes of drug distribution.

A miR 21 és miR 27a szerepét hangsúlyozzák az EMT-ra és ABC transzporterekre kifejtett serkentő hatásában és így a kemoterápiás szerekkel szembeni rezisztenciában.



Egér prostata precancerosus lézióiban (mPIN) olasz kutatók igazolták, hogy a lézióban található daganat-őssejt szerű sejtek a TNC-t használják fel arra, hogy gátolják a T-sejt receptor dependens T-sejt aktivációt, -proliferációt és -migrációt: a TNC interakcióba lép a T sejtek felszínén az  $\alpha\beta 1$  integrinnel, ami a T sejtek funkcióját gátolja, így a daganat őssejt-szerű sejtek ellen nem jön létre celluláris immunválasz (elkerülik az immun-surveillance-t). (Jachetti és munkatársai Cancer Res 2015;75:May 15,)

A fenti kutatási eredményekből egyaránt kitűnik, hogy a TNC overexpressziója gyógyszer rezisztenciát okozhat, ugyanakkor az is valószínű, hogy a tumor ellenes immunválaszt is kedvezőtlenül alterálja, ami ugyancsak kedvez a daganatsejtek túlélésének, a progresszióknak és kedvezőtlen prognózissal jár együtt.

Köszönöm Tanár Úr kérdéseit és kérem, hogy fogadja el a válaszaimat.

Tisztelettel:



Dr. Kulka Janina  
egyetemi tanár

Budapest 2017. augusztus