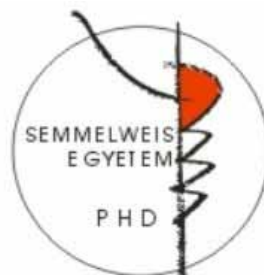


Claudinok szerepe az emlőrák prognózisának meghatározásában

Doktori értekezés

Dr. Szász A. Marcell

Semmelweis Egyetem
Patológiai Doktori Iskola



Témavezető:

Dr. Kulka Janina, egyetemi tanár, Ph.D.

Hivatalos bírálók:

Dr. Boér Katalin, osztályvezető főorvos, Ph.D.

Dr. Molnár Béla, az orvostudományok doktora, Ph.D., D.Sc.

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Bodoky György, egyetemi magántanár, Ph.D.

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Lászik András, egyetemi adjunktus, Ph.D.

Dr. Nagy Péter, egyetemi tanár, Ph.D., D.Sc.

Budapest
2011

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
1. BEVEZETÉS	5
1.1. EMLŐDAGANATOK	5
1.1.1. EPIDEMIOLÓGIA	5
1.1.2. DIAGNOSZTIKA	5
1.1.2.1. Mindennapi gyakorlatban használt prognosztikai és prediktív tényezők	6
1.1.3. KEZELÉS	9
1.1.3.1. Sebészi ellátás	9
1.1.3.2. Sugárterápia	9
1.1.3.3. Gyógyszeres kezelés	9
1.2. AZ EMLŐDAGANATOS BETEGSÉG VÁRHATÓ LEFOLYÁSA ÉS ENNEK ELŐREJELZÉSE	11
1.3. SEJTKAPCSOLÓ MOLEKULÁK, CLAUDINOK, CADHERINEK	13
1.3.1.1. A CLAUDIN MOLEKULACSALÁD	14
1.3.1.2. Claudinok kifejeződése az emlő daganataiban	17
1.3.1.3. Claudinok szerepe az emlődaganatok viselkedésében	18
1.3.2.1. CADHERINEK	18
1.3.2.2. E-cadherin	18
2. KÉRDÉSEK, CÉLKITŰZÉSEK	20
3. MÓDSZEREK	21
3.1. BETEGEK ÉS ADATBÁZISOK	21
3.2. SZÖVETI MULTIBLOKKOK KÉSZÍTÉSE	23
3.3. IMMUNHISZTOKÉMIA	24
3.4. FLUORESZCENS IN SITU HIBRIDIZÁCIÓ (FISH)	25
3.5. A METSZETEK DIGITALIZÁLÁSA ÉS ÉRTÉKELÉSE	25
3.6. RNS-KINYERÉS ÉS CDNS-RE ÁTÍRÁS	27
3.7. VALÓS-IDEJŰ POLYMERASE LÁNCREAKCIÓ (PCR)	27
3.8. ADATBÁZISOK ELEMZÉSE, STATISZTIKAI ÉRTÉKELÉS	27

<u>4. EREDMÉNYEK</u>	<u>30</u>
<i>4.1. A SZÖVETI MINTÁK ELEMZÉSÉVEL NYERHETŐ PROGNOSZTIKUS INFORMÁCIÓ A PATOLÓGIAI PARAMÉTEREK ALAPJÁN A “TRÉNING” CSOPORTBAN</i>	30
<i>4.2. CLAUDIN- ÉS E-CADHERIN KIFEJEZŐDÉS A „TRÉNING” CSOPORTBAN, KÜLÖNÖS TEKINTETTEL A SZÖVETTANI, DIFFERENCIÁLTSÁGI ÉS IMMUNFENOTÍPUS ALCSOPORTOKRA</i>	33
<i>4.3. ADATBÁZISOK ELEMZÉSÉVEL NYERT PROGNOSZTIKUS INFORMÁCIÓ A CLAUDIN-KIFEJEZŐDÉS ALAPJÁN</i>	40
<i>4.4. A SZÖVETMINTÁK ELEMZÉSÉVEL NYERHETŐ PROGNOSZTIKUS INFORMÁCIÓ A CLAUDIN- ÉS E-CADHERIN KIFEJEZŐDÉS ALAPJÁN A “TRÉNING” CSOPORTBAN</i>	52
<i>4.5. NYIROKCSOMÓ ÁTTÉTEK CLAUDIN-KIFEJEZŐDÉSE ÉS AZ ÁLTALUK HORDOZOTT PROGNOSZTIKUS INFORMÁCIÓ</i>	58
<i>4.6. A RUTIN DIAGNOSZTIKUS MUNKA SORÁN FIGYELEMBE VETT PARAMÉTEREK ELŐREJELZŐ KÉPESSÉGE A „VALIDÁCIÓS” KOHORTBAN</i>	61
<i>4.7. A „CC INDEX” PROGNOSZTIKUS ELŐREJELZŐ KÉPESSÉGE A VALIDÁCIÓS CSOPORTBAN</i>	66
<i>4.8. A CC INDEX PROGNOSZTIKUS SZEREPE A KÜLÖNBÖZŐ TERÁPIÁS CSOPORTOKBAN</i>	74
<u>5. MEGBESZÉLÉS</u>	<u>75</u>
<u>6. MEGÁLLAPÍTÁSOK</u>	<u>83</u>
<u>7. KÖVETKEZTETÉSEK</u>	<u>85</u>
<u>ÖSSZEFOGLALÁS</u>	<u>87</u>
<u>ABSTRACT</u>	<u>88</u>
<u>A JELÖLT HÁROM LEGFONTOSABBNAK ÍTÉLT PUBLIKÁCIÓJÁNAK BIBLIOGRÁFIAI ADATAI</u>	<u>90</u>
<u>SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE (A DISSZERTÁCIÓHOZ KAPCSOLÓDÓ ABSZTRAKTOK)</u>	<u>111</u>
<u>SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE (A DISSZERTÁCIÓTÓL FÜGGETLEN KÖZLEMÉNYEK)</u>	<u>112</u>
<u>KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS</u>	<u>116</u>

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

BRCA, BReast CAncer (gén);
CC index (= CURIO), Cadherin-Claudin protein-index;
CE, centromer (próba)
CLDN, claudin (gén);
ER, ösztrogén receptor;
FFPE, formalinban fixált, paraffinba ágyazott;
HER2, humán epidermalis növekedési faktor receptor 2, és azonos nevű emlőrák (csoport);
HR, hazard funkció
IHC, immunhisztokémia;
KK1, Komplex sejtKapcsolati RNS-profil
KK2, Komplex sejtKapcsolati protein-index
LN, nyirokcsomó;
LumA: luminalis A emlőrák (csoport)
LumB: luminalis B emlőrák (csoport)
MRI, mágneses rezonancia vizsgálat;
MT, metasztázis-mentes túlélés
PET, pozitron emissziós tomográfia;
PgR, progeszteron receptor;
RT, relapszus-mentes túlélés
Rtg, röntgen
SE, standard hiba
SS1, Szimpla SejtKapcsolati RNS-profil
SS2, Szimpla SejtKapcsolati protein-index
TNBC, tripla negatív emlőrák (csoport)
TT, teljes betegség-specifikus túlélés
UH, ultrahang
95%CI, 95%-os konfidencia intervallum

1. BEVEZETÉS

1.1. Emlődaganatok

1.1.1. Epidemiológia

A statisztikai adatok ismeretében az emlő betegségei közül a legnagyobb figyelem az emlő rosszindulatú daganatos elváltozásaira összpontosul. Az emlőrák a leggyakrabban diagnosztizált rosszindulatú daganat a nők körében, Magyarországon csakúgy, mint az egész világon. Csaknem minden harmadik daganat emlőrák. Minden évben körülbelül egy millió nő betegszik meg emlőrákban világszerte. A megbetegedés gyakorisága 1960 óta folyamatosan nőtt, évenként körülbelül 1-2%-kal, Magyarországon 2008-ban a rákregiszternek bejelentett új emlőrákos esetek száma 7313 volt (1).

Az emlőrák miatti halálozás növekedése a 90-es években megfordult: a mortalitás csökkenni kezdett, amely a korai felismerésnek és a javuló terápiás eredményeknek tulajdonítható. Magyarországon is hasonló csökkenő halálozási tendenciát látunk. Ugyanakkor a morbiditás jelentős csökkenésre nem lehet számítani, mivel az életkor növekedésével, az obesitas és a fizikai inaktivitás rohamos terjedésével, illetve a korai menarche, kisebb gyermekvállalási kedv és későbbi életkorra tolódott első szülés együttesével párhuzamosan nő a gyakoriság és a prevalencia, ezért egyre több emlőrákos betegre kell számítani az egészségügyi ellátásnak.

1.1.2. Diagnosztika

A nem tapintható daganatok kimutatásában legspecifikusabb módszer a röntgen (Rtg) mammográfia. A nem tapintható és ultrahang (UH) vizsgálattal nem detektálható elváltozások stereotaxiás mammográfiás mintavétele, egyébként UH-vezérelt vékonytű biopszia (FNAB) vagy vastagtű biopszia (core) során nyert anyag citológiai, illetve szövettani vizsgálata utalhat a daganat szövettani típusára már a műtéti kezelést megelőzően. Amennyiben a fenti képalkotók segítségével nem jutunk diagnózishoz, szóba jön a mágneses rezonancia (MR) és pozitron emissziós tomográfia (PET) által támogatott mammográfia is (2). A szűrésen kiemelt vagy tapintható daganatok korunk szakmai elveinek megfelelően biopsziás mintavétellel diagnosztizálhatók. Ennek eredményétől függően onkológus szakorvos vezetésével, ún. onkoteam állítja fel a

legelőnyösebb terápiás sémát. Minden egyes beteg esetében külön terápiás tervet kell készíteni, meg kell állapítani a terápia célját és eredményességének esélyét. Az emlőrák terápiájának tervezése több szakember szoros együttműködését igényli, akiknek elmélyülten kell foglalkozniuk a beteg állapotával, és értelmezniük kell a patológiai és molekuláris diagnosztikai vizsgálatok eredményét.

1.1.2.1. Mindennapi gyakorlatban használt prognosztikai és prediktív tényezők

Az emlő rosszindulatú daganatai kiindulhatnak a szerv hámszöveteiből (carcinomák), illetve kötőszöveteiből (sarcomák). Kórszövettani osztályozásuk a World Health Organisation (WHO) (ICD-10) vagy az Armed Forces Institute of Pathology (AFIP) beosztása szerint lehetséges. Az emlő rosszindulatú daganatai döntő többségükben hám eredetűek. Leggyakoribbak a ductalis, majd a lobularis carcinomák in situ és invazív formái, majd ezeket követik a tubularis, Paget, inflammatoricus, micropapillaris és egyéb ritka carcinomák, és a malignus phyllodes tumor (3). A sarcomás megbetegedés igen ritka, és rossz prognózisú (4).

A tumor kialakulásának időpontja a beteg élete során ugyancsak prognosztikus jelentőséggel bír, a fiatalkori daganatos megbetegedés rosszabb prognózisú (5, 6).

A rosszindulatú emlődaganatok kimenetelét alapvető mértékben meghatározhatja a daganat nagysága az észlelés időpontjában. Nincs minden esetben egyértelmű összefüggés a rosszindulatú emlődaganat nagysága és prognózisa között, mégis elfogadott, hogy a kisebb daganat kezelése a teljes gyógyulás nagyobb reményével kecsegtet. Ugyanakkor egy vizsgálat szerint rosszabb prognózisúak azok a tumorok, amelyek bár méretben kisebbek, de korai nyirokcsomóáttétet adnak (7).

A nyirokcsomóáttét hiánya vagy jelenléte régóta ismert, nagyon erős előrejelző képességgel rendelkező tényező (8).

A szövettani megjelenés alapján meghatározható szövettani grade (tubulus formálás, magi grade és mitotikus aktivitás), nyirokér- és érbetörés, axillaris nyirokcsomó status, Nottingham Prognostic Index ($NPI = /0.2 \times \text{tumorméret cm-ben/} + \text{nyirokcsomó stage} + \text{tumor grade}$) a mindennapokban jól alkalmazható, azonban korlátozott prognosztikus információval bíró faktorok (9-11).

A diagnózis időpontjában felállított klinikai és patológiai stage (TNM = tumorméret, nyirokcsomó status, metasztázis jelenléte) ma is elfogadott kezelési útmutató (12, 13).

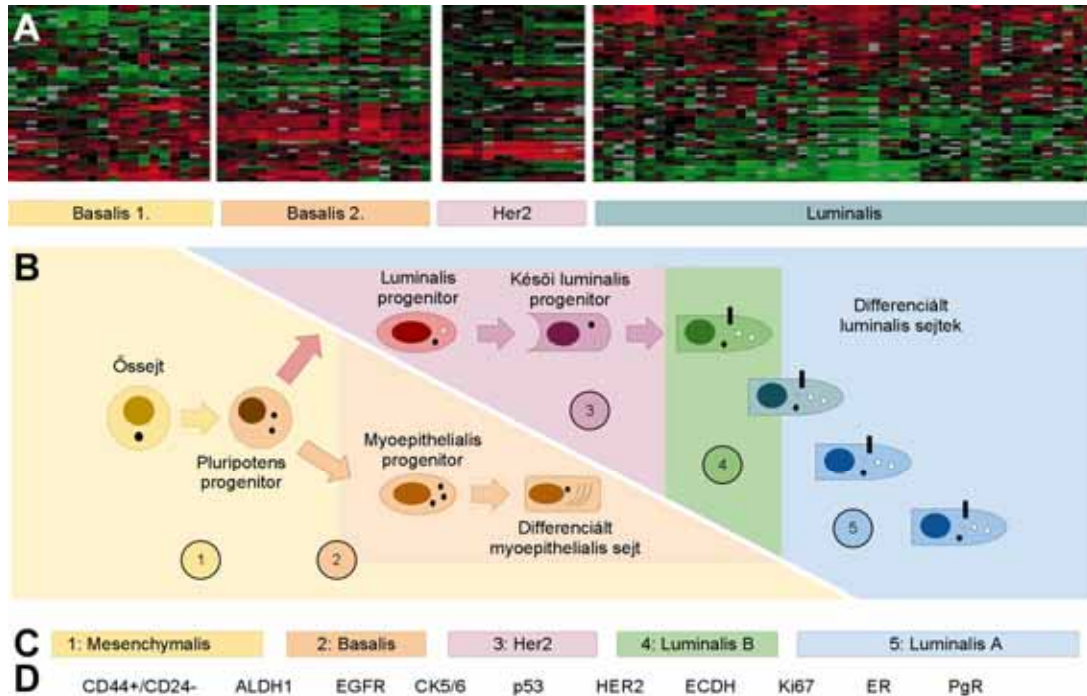
Immunhisztokémiai vizsgálatokkal az emlődaganatok alapvető csoportjai hozzávetőlegesen elkülöníthetők. Az E-cadherin a ductalis és lobularis formák rutinszerű elkülönítésére használatos, a lobularis daganatok 46-100 százalékában nincs expresszió (14-18). Az ösztrogén- és progesteron-receptor, valamint a Her2 kifejeződése az altípusok meghatározásában lehet segítségünkre, a p63 és a nagy molekulású citokeratinok (CK5/6, CK14) pedig a myoepithelialis/basalis eredet megállapításában alkalmazhatóak (19-21). A p53 mutáció immunhisztokémiai kimutatása is lehetséges, amelynek jelenléte rossz prognózisa utal (22, 23).

A betegség lefolyásának minél pontosabb megítélése nemcsak magukat a betegeket, hanem a daganatos betegeket kezelő szakembereket is régóta foglalkoztatja. Proliferációs index, S-fázis frakció, és Ki-67 kifejeződés ugyancsak további információt szolgáltat. Minél jobban osztódik egy daganat, prognózisa általában annál rosszabb (24, 25).

A hormonreceptor-kifejeződés terápiás prediktív értéke a tumorok ösztrogén-receptor pozitív (ER+) és negatív (ER-) csoportjait képes elkülöníteni. Ezen altípusok biológiai viselkedése igen különböző lehet, amelyet az elmúlt évtizedben genetikai vizsgálatokkal is alátámasztottak (26, 27). Perou munkacsoportja cDNS-microarray profil alapján különböztette meg az egyes altípusokat, amelyek a mai kezelési csoportok meghatározásának alapját képezték (1. ábra). Az ER+ daganatokon belül a proliferációs aktivitás mérésével elkülöníthetők ún. luminalis A és B csoportok. A hormonreceptor-kifejeződés az esetek egy részében progesteron receptor (PgR) expressziót is jelent. Az ER- tumorok többfélék lehetnek: Her2 gén amplifikációt és fokozott receptorfehérje-kifejeződést mutathatnak, ezek a Her2+ tumorok vagy napjainkban "HER2-enriched" csoportként emlegetett daganatok (HER2); vagy lehetnek receptor negatívak: ún. tripla negatív tumorok (TNBC: ER-, PgR- és HER2-). Utóbbiak között találjuk a basalis típusú daganatokat és a nemrégiben leírt ún. claudin-low tumorokat (28), amelyek terápiára fokozottan rezisztens sejtekből épülnek fel (29). A HER2 gén amplifikációja vagy fokozott fehérje expressziója rossz prognosztikus jel és a kezelésre prediktív tényező,

azonban ennek hiánya, vagy a fehérje alacsony kifejeződése nem jelez egyértelműen jó prognózist. Az ER expresszió értelmezése hasonló korlátokkal lehetséges: ER- daganatok nagyrészt rossz prognózisúak, azonban nem minden ER+ tumor kedvező kimenetelű.

Egyes génmutációk (p53, BRCA1/2, CHEK2, KIP) oki szerepe is felmerült a daganatok kialakulásában és biológiai viselkedésének előrejelzésében (30, 31), azonban az egyénre szabott terápia és a genomika térhódításával ma már elérhetőek további genetikai alapú eszközök is, amelyek a döntéshozásban nyújthatnak támpontot: Agendia Mammaprint (32), Genomic Health Oncotype DX (33), Ipsogen Mapquant DX (34). Hátrányuk, hogy némelyikük fagyasztott tumorszövetet igényel, sokgénés eljárások, így csak igen drágán elérhetőek.



1. ábra: A fiziológiás emlőfejlődés során kialakuló sejtalakok (B), és az egyes stádiumoknak megfeleltethető expressziós mintázatok a daganatokban (A), amelyek a tumorok altípusára (C) engednek következtetni /az array Perou közleményéből módosítva (35)/. Az immunhisztokémiai markerek segítségével az esetek többségében tükrözhető a molekuláris beosztás (D).

1.1.3. Kezelés

1.1.3.1. Sebészi ellátás

A korai emlőrák elsődleges terápiája legtöbbször sebészi, a primer tumor eltávolítása az őrszem (sentinel) nyirokcsomó egyidejű kivételével. Az azonos oldali hónalji nyirokcsomók eltávolítására mikro- vagy makrometasztázist tartalmazó sentinel nyirokcsomó mellett kerülhet sor, de az áttétmentes regionális nyirokcsomók eltávolítása terápiás szempontból felesleges (36). Az őrszem nyirokcsomó a daganatos nyirokelvezetés első állomása, amelynek eltávolítása és műtét utáni igen részletes szövettani vizsgálata nagy pontossággal jelzi a daganatos regionális státuszt. Az esetek többségében törekedni lehet az emlőmegtartó műtét elvégzésére, ezért a mastectomiára manapság egyre ritkábban kerül sor. A sebészi kezelés során eltávolított primer vagy metasztatikus daganat a prognosztikus és prediktív vizsgálatok alapjául szolgál.

1.1.3.2. Sugárterápia

Emlőmegtartó műtétet követően minden beteg sugárkezelésre szorul, mely 7-26%-kal képes csökkenteni a helyi kiújulást. A sugárterápiát általában 5 héten át adják, de a gyorsított (akcelerált) hipofrakcionált sugárkezeléssel ugyancsak hasonló eredmények érhetők el, kevesebb mellékhatás árán. Hónalji nyirokcsomó áttéttel rendelkező emlőrákos betegek esetében a mastectomia után végzett sugárterápia javítja a betegek túlélését, ezért általánosan elfogadott, hogy négy vagy több azonos oldali hónalji nyirokcsomó-áttét esetén mastectomia után is sugárkezelés is javasolt (37).

1.1.3.3. Gyógyszeres kezelés

Az emlőrák gyógyszeres terápiájának – amely magában foglalja az endokrin anyagcserére ható vegyületeket a kemoterápia mellett, valamint a biológiai válaszmódosítók alkalmazását is – három formája különíthető el: 1) a műtétet megelőző neoadjuváns, vagy más néven primer szisztémás terápia; 2) a műtétet követő adjuváns, valamint 3) az előrehaladott áttétes emlőrák első- és többedvonalbeli kezelése. Ez utóbbi esetekben a kezelés célja már nem lehet a betegség végleges meggyógyítása, csupán az élettartam meghosszabbítása és az életminőség fenntartása (palliatív kezelés).

Az emlőrák modern kemoterápiájának kezdete 1972-re tehető, amikor a klasszikus Bonadonna-féle CMF- (cyclophosphamid, methotrexat, 5-fluorouracil) kezelés

megjelent (38). Az 1980-as évek az anthracyclinek (39), az 1990-es évek pedig a taxánok korszakának nevezhetőek (40). Ma már a HER2-pozitív daganatok kezelésében monoclonalis ellenanyag (trastuzumab) és tirozin-kináz inhibitor (lapatinib) is rendelkezésre áll (41-43). Az utóbbi évek gyógyszerfejlesztésének köszönhetően a daganatok éréjdonképződését gátló újabb monoclonalis ellenanyag (bevacizumab) került a figyelem előterébe, mely áttétes betegségben taxánokkal kombinálva ígéretes szernek tűnik (44, 45).

A metasztatikus emlőrák esetében csaknem kizárólagosan, korai emlőrák esetében pedig kiegészítő jelleggel gyógyszeres kezelés is ajánlott. A korai emlőrákos esetek többségében a jelenlévő mikrometasztázisok miatt szisztémás gyógyszeres kezelés bevezetése szükséges a locoregionalis ellátás után, mivel e nélkül a betegek felében halálloki tényezőként még mindig az emlőrák szerepelne. Ez teszi szükségessé a komplex onkoterápiás elvek érvényesítését, amely a klinikai onkológiában talán az emlő ellátásában tartható a legsikeresebbnek (46). Az emlőrák sebészi eltávolítását követő sugárterápia és a kombinált gyógyszeres terápia együttesen képviseli az onkoterápia három oszlopát. Az endokrin terápia minden olyan endokrin válaszkésztséget mutató daganatnál javasolt, ahol az ösztrogén receptor (ER) jelenléte igazolható. HER2-gátló kezelést kemoterápiával kombinálva minden HER2+ daganat esetében adni kell. Ezen kívül azokban az esetekben indikált a kemoterápia, amikor a tumor az úgynevezett tripla negatív kategóriába tartozik, kivéve, ha jobb prognózisú szövettani típussal van dolgunk (pl. adenoid cysticus emlőrák), és nincs axillaris nyirokcsomó érintettség. A legnehezebb a döntés az ER-pozitív, HER2-negatív tumorok esetében. Itt ugyanis, mérlegelni kell a kemoterápia hozzáadását az endokrin terápiához, ha nagy kockázatú a beteg (pl. nyirokcsomó érintettség áll fenn, a tumorméret nagyobb, mint 5 cm, magas proliferációs aktivitás detektálható, stb.) és alacsony ER és PgR expresszió mutatható ki.

Az emlődaganatok prognózisának és kezelésre adott válaszána előrejelzése igen komoly hatással lehet a beteg életminőségére és a biztosítási finanszírozásra, mert pontos predikcióval a gyógyszeres kezelés kiadásai mellett a rehabilitációs költségek is optimalizálhatóak, és elkerülhetőek lehetnek bizonyos betegek esetében.

1.2. Az emlődaganatos betegség várható lefolyása és ennek előrejelzése

A malignus folyamatot jellemző alapvető funkciók (önálló növekedés, apoptózisra való csökkent vagy hiányzó hajlam, végtelen osztódási képesség, növekedésgátló jelekre való érzéketlenség, genomikai instabilitás, lokálisan invazív növekedés, érújdonsképzést serkentő tulajdonság, érbetörés és életbenmaradás az érpályában, megtapadás és áttétképzés) önmagukban hordozzák közeli és távoli metasztatizáció kialakításának lehetőségét (47).

A tumor felfedezése és esetleges gyógyszeres kezelése a daganat alapvető biológiai tulajdonságait módosítja. Egy beteg tumora a sebészi kezelés következtében eltávolításra kerülhet, a lokális besugárzás és az adjuváns kezelés pedig a visszamaradó tumorsejteket csaknem teljesen kiírhatja. Egy az előbbivel azonos korú betegben, a rendelkezésünkre álló és használt, leírható tulajdonságokban ennek teljesen megfelelő daganat ugyanilyen kezelésre gyors kiújulást és rapid progressziót mutathat. Az egyes, napjainkban már főként genetikai alapú, prognosztikus (kísérleti és kereskedelemben kapható) tesztek a tumorok minél pontosabb karakterizálására törekcsenek.

Az Agendia által forgalmazott Mammaprint fagyasztott emlőtumor minta elérhetőségét tételezi fel, egyénileg tervezett cDNA microarray-eket alkalmaz 70 gén mRNS-szintű kifejeződésének méréséhez (32).

A Genomic Health, Inc. kaliforniai főhadiszállása paraffinos anyagokra specializálódott: az Oncotype DX teszt keretein belül 21 gén kifejeződését méri valós idejű PCR reakcióval, rutin patológiai blokkok felhasználásával (33).

Az Ipsogen cég Mapquant DX tesztje grade 2 differenciáltsági fokú emlőtumorok kimenetelét jósolja meg 97 gén kifejeződésének vizsgálatával, ugyancsak fagyasztott tumorszövetre és microarray mérésre alapozva (34).

Ezek a tesztek és a legtöbb eljárás RNS-szintű vizsgálatokra támaszkodnak (1. táblázat), és a proliferáció pontosabb mérésén keresztül működnek (proliferációs kifejeződési mintázat, chromosomal instabilitás mintázat), ami a malignus folyamat több alapvető funkciójával is kapcsolatban van (33, 34). A sejtek egymáshoz való viszonyát, meg(nem)tapadási képességét, környezetéhez való kapcsolódását jelző paramétereket kevesebb expressziós profil (pl. invazivitási, metasztatizáció, "wound-response", stromalis) alkalmazta napjainkig (48-50). Utóbbi elemzésére kézenfekvőnek tűnik a sejt felszíni kapcsolatok, sejt-kapcsoló struktúrák jellemzése.

1. táblázat. Prognosztikus és prediktív tesztek az emlődagantos betegség lefolyásának és kezelésre adott válaszánaak megítélésére

Technika	Eljárás	Irodalom
Szekvenálás (DNS)	BRCA1/2	(30)
FISH (DNS)	HER2	(51)
	3-génes(CYP24, PDCD6IP, and BIRC5)	(52)
Expressziós Array (RNS)	70-génes Amsterdam	(27)
	76-génes Rotterdam	(53)
	97-génes “Genomic Grade Index”	(34)
	163-génes “Stroma-derived Prognostic Predictor”	(50)
	459-génes “Wound-response signature“	(54)
qPCR (RNS)	21-génes “Recurrence Score”	(33)
	4-génes (MYBL2, KPNA2, CDC2, CDC20)	(55)
	5-génes (HOXB13, IL17BR, CHDH, MIB1, MKI67)	(56)
	8-génes (TOPFOX)	(57)
	14-génes (Metastasis Teszt)	(58)
Nanostring (RNS)	50-génes (PAM50)	(59)
IHC (Protein)	HER2	(60)
	Ki67	(61)
	IHC4 (ER, PgR, HER2, Ki67)	(35, 62-64)
	5-marker (p53, NDRG1, CEACAM5, SLC7A5, HTF9C)	(65)

1.3. Sejtkapcsoló molekulák, claudinok, cadherineek

A sejtkapcsoló struktúrák fontosságát hangsúlyozza, hogy a genetikai állomány 10%-a (2000-2500 gén) ún. adhesiós molekulákat kódol (66). A sejt-extracelluláris mátrix és a sejt-sejt kapcsolatok alapvető fontosságúak a szöveti szerveződés kialakulásában és fenntartásában.

A sejtek közötti kapcsolatokért felelős struktúrák 3 csoportra (2. Táblázat) oszthatók (67):

1. Kommunikáló kapcsolatok
2. Horgonyzó kapcsolatok
3. Lezáró kapcsolatok

2. Táblázat. Sejt-sejt kapcsolatok. Claudinok helye a sejtkapcsoló struktúrákban.

Típusok	Kommunikáló kapcsolatok	Horgonyzó kapcsolatok	Lezáró kapcsolatok
Példák	„gap junction”	desmosoma hemidesmosoma adherens junctio (zonula adherens) focalis adhesio	„tight junction” zonula occludens
Alkotó fehérjék	Connexin Cadherineek és catenineek közreműködnek a formációban, de a gap junction felépítésében nem vesznek részt.	E-, P-, N-cadherin integrin, desmoglein, desmocollin, laminin, placoglobin <i>Actinhoz köt:</i> α -actinin, β -catenin, vinculin, ZO-1, -2, - 3, nectin, AF-6, ponsin	<i>Integráns:</i> claudinok , occludin, JAM-1, - 2, -3, tricellulin <i>Perifériás:</i> MAGUK, ZO-1, -2, -3, AF-6, cingulin, symplekin

Az epithelialis sejtekben a szoros kapcsolati struktúra molekulái a sejtek apicalis/basolateralis részén helyezkednek el; elsődleges szerepet játszanak az intercellularis rések lezárásában, és a paracellularis szelektív diffúzió irányításában („gate function”). Fenntartják az apicalis és basolateralis membrán közötti fehérjék és lipidek eltérő összetételét („fence function”). Továbbá szerepük van a sejtek növekedésének és differenciációjának szabályozásában (68).

Az adhesióban játszott szerepük jelenleg intenzív kutatás tárgya, mivel feltételezeten közreműködnek a daganatok invazivitási és áttétképzési jellemzőinek kialakításában.

A bonyolult „tight junction” struktúrának több összetevője van, melyeket két nagyobb családra oszt az irodalom (69):

- *integráns* - teljes - membránfehérjék mint pl. a claudinok, az occludinok, a tricellulin és a JAM-ok
- *perifériás* membránfehérjék mint pl. a ZO-1, -2, -3, a cingulin, a symplekin és az AF-6, melyek segítségével az integráns junctionalis fehérjék kapcsolódnak a citosceletalis, valamint adhézios fehérjékhez.

A junctionalis fehérjék előfordulásáról, valamint a junctionalis fehérjék és adhesios fehérjék közötti kapcsolatról kevés irodalmi adat áll rendelkezésünkre. Továbbá kevésbé ismert a junctionalis fehérjék expressziója sem a tumorok regionális (nyirokcsomó), sem a távoli metasztázisaiban.

1.3.1.1. A claudin molekulacsalád

A claudin család első tagjainak leírására 1998-ban került sor (68). Napjainkig a GenBank adatbázisban 23 különböző humán claudint találunk, amelyek egymással 12,5-től 69,7%-ig terjedő szekvencia-homológiát mutatnak. Ez a tény a claudin családon belül lehetséges alcsoportokra, és egyben a funkcióik közötti átfedésre utalhat.

A claudinok 20-27 kDa tömegű fehérjék, amelyek 4 transzmembrán domént tartalmaznak, egy kisebb és egy nagyobb extracellularis “loop”-pal (2. ábra). Egymáshoz kötődnek homodimereket alkotva, de képesek heterotipikus kötésre is. Az actin vázhoz kötődnek ZO-1 segítségével, és intracellularisan a bonyolult jelátviteli rendszer alkotói (70). Funkciójuk csak részben ismert, a legjobban vizsgált claudinok az 1-es, 2-es, 3-as, 4-es, 5-ös és 7-es. Egyes claudinok eltérő szöveti expressziót (ún. mintázatot) mutatnak (71, 72), míg mások kizárólag egy adott sejt- / szövettípusra jellemzőek (3. táblázat).

3. Táblázat. Egyes claudinok előfordulása emberi szervekben.

Típus	Előfordulási hely
Claudin-1	bőr, emlő , máj, szaruhártya, vese, mellékhere, prosztata
Claudin-2	bél, emlő , máj, szaruhártya, vese, pancreas
Claudin-3	bél, emlő , máj, tüdő, szaruhártya, vese, here, pancreas, prosztata
Claudin-4	bél, emlő , máj, vese, bél, pancreas, prosztata
Claudin-5	bél, endothel sejtek, pancreas
Claudin-6	embrió
Claudin-7	emlő , cornea, máj, vese, pancreas, prosztata
Claudin-8	tüdő, vese
Claudin-9	cornea, pancreas
Claudin-10	vese, pancreas
Claudin-11	vese
Claudin-14	hallójárat
Claudin-15	vese
Claudin-16	vese, Sertoli-sejtek, oligodendrociták
Claudin-17	bőr
Claudin-18	tüdő, gyomor
Claudin-23	bél

Claudin-1: génje a 3. kromoszómán található. A CLDN1 gén által kódolt integráns membránfehérjét írták le elsőként, amely alapvető fontosságú a szoros kapcsolat szerkezetében (69). A claudin-1 immunhisztokémiai módszerrel, és immunfluoreszcens eljárással a sejtmembránon, lineáris elrendezésben tűnik fel (68). Általában a magas rezisztenciájú hámokban jelenik meg; nélkülözhetetlen alkotója pl. a bőr barrierjének (67). A papillaris pajzsmirigy carcinoma és annak nyirokcsomó metasztázisa magas claudin-1 expressziót mutat (73). A nyelőcső laphám eredetű daganatokban magasabb kifejeződését találták a nem daganatos laphámhoz képest. A colon premalignus gyulladással megbetegedéseiben a claudin-1 (és claudin-2) fokozott kifejeződése észlelhető (74). Primer colorectalis carcinoma sejteket vizsgálva expressziója ugyancsak emelkedett volt (75). A claudin-1 molekulának a Hepatitis C vírus sejtbe való bejutásában is kulcsszerepet tulajdonítanak (76). A normál hámhoz képest a claudin-1 (és claudin-7) expresszió emelkedik a cervix dysplasticus elváltozásaiban (CIN) és csökken az invazív rákban a dysplasticus elváltozásokhoz képest (77).

Claudin-2: génje a 10. kromoszómán helyezkedik el, szintén alapköve a szoros kapcsolatnak, de a plazmamembrán mentén nem folytonos kötegeket képez, hanem szakaszosan van jelen. Ez tükröződik a gyakran a citoplazma belső területein látott

granularis immunreakció képében. Ugyancsak homofil kapcsolatokat alkot (68). Főként a specifikusan átjárható hámokban jelenik meg, pl. a vese tubulusaiban és a plexus choroideusban (78). Expresszióját a valódi hámtumorokon túl néhány más daganatban is leírták, pl. malignus melanomában, Spitz-naevusban, és nem kiérett sarcomákban (79). Nyelőcső adenocarcinomában a claudin-2 fehérjeszintje magasabb volt, mint annak a praecancerosus (Barrett-oesophagus) elváltozásában. Utóbbiban és az abból kialakuló adenocarcinomákban emelkedett claudin-2 expressziót írtak le a normál foveolaris epithel claudin-2 expressziójához képest (80).

Claudin-3: génje a 7. kromoszómán található. Immunreakciója membranosus, lineáris. A nem hámeredetű daganatok általában nem mutatnak claudin-3 reakciót (79). Intestinalis típusú gyomordaganatokban magas expressziója jobb prognózissal társult, míg a diffúz típusú gyomordaganatokban expressziója alacsonyabb volt (81-83). Pancreasban a claudin-3 az endocrin differenciáció jelzője (84). A claudin-3 fehérjének Clostridium perfringens enterotoxin (CPE) -kötő kapacitása van, CPE hatására a sejtek lysise következik be (67, 78, 85).

Claudin-4: génje a 7. kromoszómán helyezkedik el. Membránhoz kötött immunreakciót mutat. Ugyancsak CPE-kötő tulajdonsággal bír, ezért szerepe fontos lehet a daganatellenes terápiában (85). Elsősorban a kevésbé áteresztő hámokban mutatható ki (67). Nyálmirigyekben a barrier kialakításában van szerepe (86). Expressziója számos humán daganatban megváltozik. Fokozottan expresszálódhat az emlődaganatok mellett pancreas carcinomában (84, 87, 88), cholangiocellularis carcinomában (89, 90), prosztata carcinomában (91) és ovarium carcinomában (92).

Claudin-5: génje ugyancsak a 22-es kromoszómán található. Elsősorban az endothelsejtekben elhelyezkedő szoros kapcsolatok formálásában vesz rész (67). A gén deletiója kimutatható velo-cardio-facialis szindrómában (78). A normál erek endothelje mellett jelenlétét pancreas adenocarcinomában is kimutatták (78). A vesének csupán az artériás ereiben mutatható ki, míg a kapillárisokban és a vénákban nem (69, 93). A vér-agy gát és a plexus choroideus sejteiben (epi- és endothelialis) is megjelenik (94, 95). A gyomorrákok közül a diffúz típusban alacsonyabb claudin-5 expressziót találtak az intestinalis típusúhoz képest (83). A vascularis daganatok claudin-5 pozitívak (79, 93).

Claudin-7: génje a 17. kromoszómán található. Erőteljesen expresszálódik szinte valamennyi hámeredetű tumorban (79). Expressziója csökkent cervixcarcinomában (96, 97); fej-nyak tumorokban (67, 78) és az uterus hámdaganataiban (78).

További megfigyelések a claudinokról: A claudin-11 jelen van oligodendrocitákban, Sertoli-sejtekben, vesében; hiánya egerekben sterilitáshoz vezet, valamint az ingervezetés csökkenését okozza a központi idegrendszerben (98). A claudin-14 hiánya veleszületett sükettséghez vezet (71). A claudin-16 génben fellépő mutációk felelősek a renalis hypomagnesiaemia kialakulásáért, mely megnövekedett calcium-ürítéssel és vesekövességgel jár, a claudin-16 a magnézium-szelektív csatornák kialakulását teszi lehetővé (85).

1.3.1.2. Claudinok kifejeződése az emlő daganataiban

A claudinok vizsgálata emlődaganatokban röviddel leírásuk után megkezdődött. Az első eredményeket Kramer és munkacsoportja közölte 2000-ben (99). 96 továbbiakban nem részletezett emlőmintát vizsgáltak, és a claudin-1 fehérje csökkent kifejeződését találták carcinomában. Kominsky 86 emlőmintát (38 DCIS, 31 IDC, 17 LCIS) elemzése során a claudin-7 csökkent kifejeződését látta (100). Ez a munkacsoport egy évvel később, 2004-ben, 21 emlőtumor vizsgálata után a claudin-3 és -4 fokozott kifejeződését írta le, egyidejűleg a CPE terápiás alkalmazásának lehetőségére is rámutattak (85).

Soini 20 Paget-kór és emlő carcinoma claudin-2, -3, -4, -5 mintázatát közölte (101). Tőkés 56 emlőmintát RNS- és fehérje-expressziós vizsgálatai alapján claudin-1, -3 és -4 összefüggését látta a szövettani grade-del (102). Majd TNM szerinti korai emlődaganatok összehasonlításában, 30-30 pT1pN0 és pT1pN1 invazív ductalis tumort elemezve nem találtak különbséget ezen daganatok claudin-1, -2, -3, -4, -7 kifejeződését tekintve (103). Az emlő ductalis carcinomája nagyobb mennyiségben fejez ki claudin-5-öt, mint a lobularis típus (79, 101).

2006-ban Hewitt számos agy, tüdő, emlő, colon, vese, máj, hasnyálmirigy, prosztata, gyomor, petefészek, csont, ér endothel, őssejtek, méhlepény és 47 emlőmintát elemzése során (igen vegyes tulajdonságú minták vizsgálata mellett: normál emlőszövet, benignus daganatok, változatos hormon- és kemoterápiás kezelés utáni daganatok,

metasztázisok) claudinok kifejeződését írta le, és ugyancsak a claudin-3 és -4 fokozott, valamint a claudin-7 enyhén emelkedett kifejeződését találta (81).

1.3.1.3. Claudinok szerepe az emlődaganatok viselkedésében

A pusztán leíró jellegű elemzések mellett megjelennek a claudinok oki szerepét, illetve kifejeződésükben a következményes eltéréseket strukturáltan vizsgáló közlemények. A claudin-2 megemelkedett kifejeződése elősegíti a májmetasztázisok kialakulását (104). Herschkowitz alkalmazta első ízben a “claudin-low” típus megjelölést 2007-ben az emlődaganatok egy új csoportjának azonosítására (28), amelyet további vizsgálatok során ontogenetikailag összejt tulajdonságokkal rendelkező, majd adjuváns terápia alkalmazása során rezisztens, a többi túlönvő, felszaporodó populációként azonosítottak (29, 105).

A prognosztikus információ kinyerésére törekvő elemzések eddig kis esetszámúak voltak, és előzetes megállapításokat tettek. A claudin-1 molekula kifejeződésének csökkenése rossz prognosztikus jel, és alacsony expressziója összefügg a nyirokcsomó-metasztázisok jelenlétével (106). A claudin-16 kifejeződése az agresszív tulajdonság ellen hat (107). Claudin-4 alacsonyabb expressziója pedig a jobban differenciált tumorokban észlelhető (102, 108).

1.3.2.1. Cadherineek

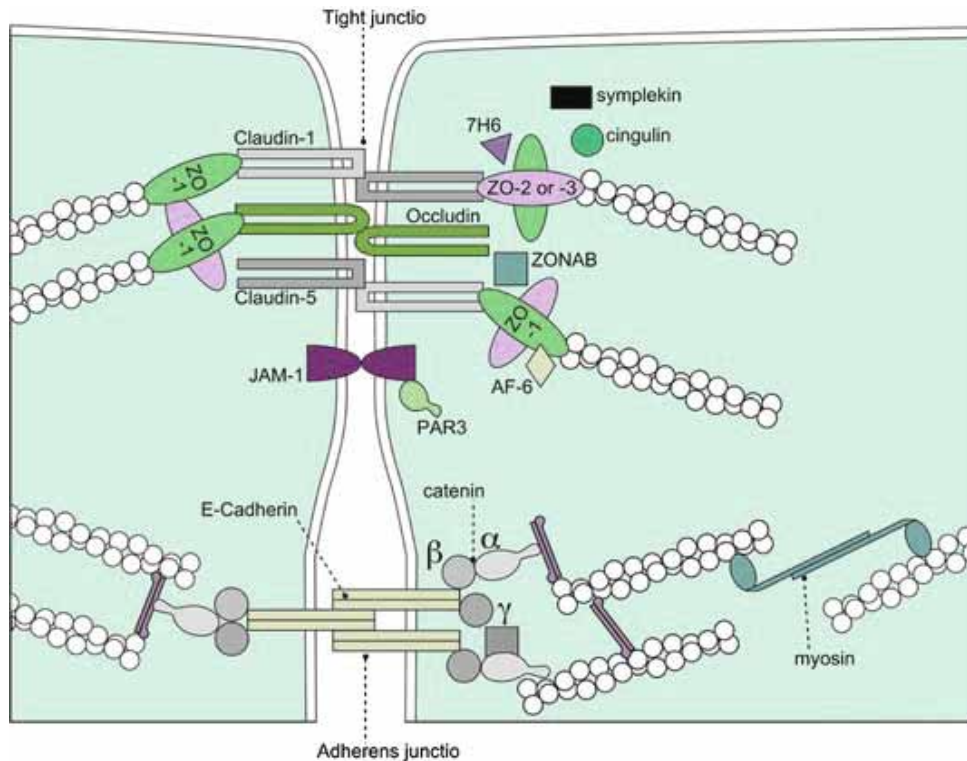
A cadherineek az adherens kapcsolatok felépítésében résztvevő, ugyancsak sok tagot számláló molekulacsalád, amelyek mindegyike Ca-ion-dependens módon működik (innen származik elnevezésük is). Ebbe a családba tartoznak a cadherineek, protocadherineek, desmogleineek és desmocollinok is más molekulák mellett (109). Közös molekuláris régió az extracelluláris Ca-kötő régió (110). Az egyes cadherineek előtagjaik szerint csoportosíthatóak, attól függően, hogy milyen sejtekben és szervben fordulnak elő. Így a teljesség igénye nélkül megkülönböztethetünk P-cadherint (placenta), N-cadherint (neuralis), és E-cadherint (epithelialis).

1.3.2.2. E-cadherin

Az emlőben és daganataiban az E-cadherin (más néven 1-es típusú cadherin) fordul elő, amelynek génje a 16-os kromoszómán található. Egy transzmembran részből, 5

extracellularis cadherin szakaszból és egy magasan konzervált intracellularis részből áll (2. ábra). Az E-cadherin génjében vagy funkciójában bekövetkező károsodást a carcinogenesisben és a tumorprogresszióban is leírták (111). Aktív kapcsolatban van az actinnal, amihez a β -catenin keresztül kapcsolódik, utóbbival együtt a „Wingless/Wnt” jelátviteli útvonalban töltenek be szerepet (112).

Az E-cadherin a mindennapi patológiai diagnosztikában a ductalis és lobularis emlődaganat szövettani csoportok rutinszerű elkülönítésére használatos, a lobularis daganatok túlnyomó hányadában nincs kifejeződés (14-18). Szerepét leírták több szervben az epithelialis-mesenchymalis transitio (EMT) folyamatában, amikor a feltételezések szerint (többek között) az E-cadherin kifejeződése is csökken, így fokozódik a sejtek mobilitása és metasztázáló képessége (86, 111, 113-118). Nem világos azonban, hogy ez a jelenség ok, vagy következmény-e folyamatban (113, 119). Az EMT alakulásában számos jelátviteli útvonal aktivációja is szerephez jut, és ezeket sejt kultúrák és szöveti vizsgálatokban is megerősítették (120).



2. ábra. Claudin és E-cadherin elhelyezkedése a plazmamembránban /Föster közleményéből módosítva (121)/.

2. KÉRDÉSEK, CÉLKITŰZÉSEK

1. A claudinok és E-cadherin protein szintű kifejeződése eltér-e a különböző szövettani típusú emlődaganatokban?
2. Az emlődaganatok dedifferenciálódása során protein szinten eltérnek-e a különböző grádusú tumorokban kifejeződő claudinok?
3. A claudinok és E-cadherin fehérjék kifejeződése változik-e a rutin gyakorlatban alkalmazható immunhisztokémiai profil által tükrözött emlődaganat altípusokban?
4. A nyirokcsomó-áttétek immunhisztokémiai módszerrel detektálható claudin kifejeződése eltér-e a primer emlődaganatokétól?
5. Nyilvános genomikai adatbázisok vizsgálata során a claudinok és E-cadherin mRNS-szinten önmagukban vagy együttes mintázatként nyújtanak-e prognosztikus információt?
6. Rejt-e a claudinok és E-cadherin fehérjeszintű kifejeződése prognosztikus információt primer emlőtumorokban?
7. A nyirokcsomó-áttétek claudin fehérje kifejeződése hordoz-e prognosztikus információt emlődaganatos megbetegedésben?
8. A genomikai adatbázisok vizsgálatából, mRNS kifejeződési adatokból származó eredmény validálható-e független betegcsoporton a mindennapi gyakorlatban alkalmazható immunhisztokémiai technikával?
9. Ad-e a claudin- és E-cadherin expresszió további prognosztikus információt a rutinszerűen alkalmazható faktorok mellett?

3. MÓDSZEREK

3.1. Betegek és adatbázisok

A szöveti vizsgálatokhoz két különböző, átfedés nélküli beteganyag - összesen 636 beteg tumormintája - került bevonásra (4. táblázat):

4. táblázat. A vizsgálathoz felhasznált emlődaganatos betegek és minták klinikopatológiai jellemzői.

Betegszám		636
Életkor (átlag, tartomány)		55.3 (23-98)
Szövettani típus (n, %)	IDC	392 (61.6%)
	IDC kevert	68 (10.6 %)
	ILC	81 (12.7%)
	ILC kevert	42 (6.6%)
	mucinosus	13 (2.0%)
	medullaris	2 (0.003%)
	metaplasticus	14 (2.2%)
	egyéb	24 (3.7%)
Grade (n, %)	1	165 (25.9%)
	2	258 (40.5%)
	3	213 (33.5%)
Tumorméret (átlag ± SE, mm)		25.83 ± 15.42
Nyirokcsomó státusz (n, %)	N0	48 (7.5%)
	N1	178 (27.9%)
	N2	161 (25.3%)
	N3	38 (5.9%)
	NX	211 (33.1%)
Necrosis	nincs	480 (75.5%)
	van	156 (24.5%)
NPI (átlag ± SE)		4.32 ± 1.33
Lymphocytás beszűrődés (n, %)	nincs	247 (38.8%)
	enyhe	237 (37.2%)
	közepes	98 (15.4%)
	erős	54 (8.4%)
Érbetörés (n, %)	nincs	204 (32.1%)
	van	432 (67.9%)
Rekurrencia (n, %) (n, %)	helyi relapsus	39 (6.1%)
	távoli metasztázis	136 (21.3%)

1) 249 emlődaganatos beteg mintája a II. sz. Patológiai Intézet archívumából (1981-2008), átlagosan 111 hónapos követési adatokkal. Utóbbiak között 39 tripla negatív emlődaganatos (köztük 31 egyidejűleg CK5/6 expressziót mutató ún. basalis phenotipusú daganattal kezelt) beteg is található. Egyes esetekben (97 beteg) elérhető volt normál szövet és nyirokcsomó-áttét is, amelyeket a primer tumor műtétje időpontjában távolítottak el. Ebben a csoportban további 52 távoli áttétes beteg és 61 relapszus-mentes beteg tumorát is vizsgáltuk. 2) 387 beteg a Budai MÁV kórház anyagából (1999-2002), átlagosan 102 hónapos követési adatokkal. A betegek kezelési adatai rendelkezésre álltak a sebészi eltávolítást követő sugár- és kemoterápia vonatkozásában. Összesen 148 (38.2%) beteg részesült anthracyclin- vagy taxán-alapú kemoterápiás kezelésben, 101 (26.1%) ezek közül besugárzást is kapott. A maradék 239 (61.7%) betegből, akik szisztémás kezelésben nem részesültek a daganat eltávolítását követően 112 (28.9%) részesült radioterápiában.

A kohortok felállításakor szempont volt, hogy reprezentálni tudjuk a leggyakoribb szövettani típusokat és mindhárom differenciáltsági fokot, emellett a ritkább, tripla negatív daganatokat, nyirokcsomó- és távoli áttéteket külön „dúsítottuk”, hogy viselkedésüket megvizsgálhassuk. A betegek túlélési adatainak elemzésekor a legrövidebb időt vettük számításba, amikor relapsus kialakult: akár helyi recidíva, akár távoli áttét került diagnosztizálásra (relapszus-mentes túlélés). A vizsgálatot a Semmelweis Egyetem Tudományos Kutatási és Etikai Bizottság hagyta jóvá (#85/2007, #185/2007 és #7/2008).

Bioinformatikai elemzéseinkhez tizenhárom nyilvánosan elérhető internetes adatbázisban található (5. táblázat), összesen 1809 emlődaganatos beteg tumoráról és túléléséről megadott információt használtuk (34, 53, 122-132). Az egyes adatbázisok Affymetrix HGU133A vagy HGU133Aplus2 microarray-k alapján készültek, amelyek próbaszettjei jelentős átfedést mutatnak. Az adatbázis létrehozása során egy online elérhető, szabadon használható eszköz jött létre (133), melynek további módosításával egyszerre több gén együttes kifejeződésének hatását tudtuk vizsgálni.

5. táblázat. A vizsgálatban felhasznált adatbázisok betegeinek klinikopatológiai paramétereit (Győrffy közleményéből módosítva (133)).

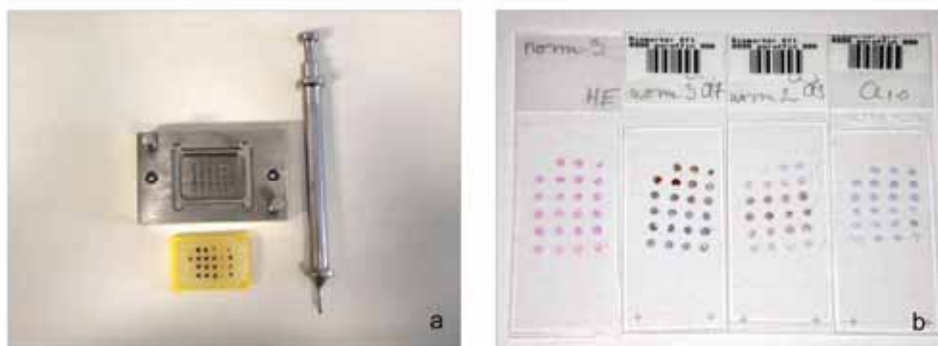
Platform	Betegek száma	Életkor	Grade (1/2/3)	ER+	Relapsus	Irodalom
HGU133A	102	58±12	27/20/36	73 (72%)	40 (39%)	(34)
HGU133+2	204	NA	NA	NA	204(100%)	(122)
HGU133+2	55	61±9	2/35/18	55(100%)	55(100%)	(123)
HGU133A	198	46±7	30/83/83	134 (68%)	91 (46%)	(124)
HGU133A	1	69	1	1	0	(125)
HGU133A	82	64±10	0/54/1	70 (86%)	19 (23%)	(126)
HGU133+2	77	64±9	14/20/24	77(100%)	13(17%)	(127)
HGU133A	251	62±14	67/128/54	213 (85%)	NA	(128)
HGU133A	58	NA	NA	0(0%)	11(19%)	(129)
HGU133A	159	NA	28/58/61	NA	40 (25%)	(130)
HGU133A	200	NA	58/136/35	NA	46(23%)	(131)
HGU133A	286	NA	NA	209 (73%)	107 (37%)	(53)
HGU133A	136	NA	NA	136(100%)	20(15%)	(132)
Összesen	1809	57 ± 13	198/534/312	968 (78%)	689 (43%)	

3.2. Szöveti multiblokkok készítése

A daganatokat tartalmazó, formalinban fixált és paraffinba ágyazott (FFPE) blokkokat a megfelelő HE-festett metszetek fénymikroszkópos ellenőrzése után válogattuk ki, és kijelöltük azokat a reprezentatív területeket, amelyek az adott daganatra jellemzőek. A tumoros szövethengereket egy erre a célra fejlesztett eszköz segítségével (Histopathology Kft., Pécs, 3DHistech Kft., Budapest, Magyarország) emeltük ki, és az előkészített TMA-blokkokba helyeztük, amelyek 24, illetve 84 szövethenger befogadására képesek (3/A ábra). Ez az eljárás kezdeti munkaigénye ellenére a későbbi vizsgálatokhoz könnyű, gyors és költséghatékony lehetőséget teremtett. Az átlagos további anyagi megtakarítás 90%, így kisebb ráfordítással többszörös mennyiségű szövetminta vizsgálható (3/B ábra). Minden beteghez tartozó resectiós preparátumból 2 darab 2 mm átmérőjű szövethengert ültettünk át.

3.3. Immunhisztokémia

Az altípusok pontos meghatározásához ösztrogén-, progeszteron-receptor, HER2, Ki67 reakciókat végeztünk az 5 µm vastag, TMA-blokkokból készült metszeteken (134-136). Ezen immunhisztokémiai reakciókat Ventana Benchmark készülékben futtattuk (Roche Diagnostics, Mannheim, Németország).



3. ábra. TMA blokkok készítésére alkalmas eszközök és kész blokk, amely (a) 24 mintát foglal magában, és (b) az utóbbi blokkból elkészült immunreakciók (Dr. Jakab Csaba felvételei).

6. Táblázat. Antitestek és pozitív kontrollszövetük.

Antitest	Gyártó	Gyári szám	Hígítás	Pozitív kontroll
ER	Novocastra	NCL-ER-6F11	1: 200	Emlő
PgR	Novocastra	NCL-PGR-312	1:600	Emlő
Ki67	DAKO	M7240	1:100	Tonsilla
HER2	Novocastra	NCL-CB11	1:400	Her2+ emlőtumor
Claudin-1	Zymed Labs.	18-7362	1:80	Bőr
Claudin-2	Zymed Labs.	18-7363	1:80	vastagbél
Claudin-3	Zymed Labs.	34-1700	1:80	Vastagbél
Claudin-4	Zymed Labs.	18-7341	1:100	Vastagbél
Claudin-5	Zymed Labs.	18-7364	1:120	Vastagbél
Claudin-7	Zymed Labs.	34-9100	1:100	Emlő
Claudin-8	Zymed Labs.	40-2600	1:80	Vastagbél
Claudin-10	Zymed Labs.	38-8400	1:60	Vese
E-cadherin	DAKO	M 3613	1:120	Emlő

A sejtkapcsoló struktúrák immunhisztokémiai vizsgálatához 5 µm vastagságú metszeteket készítettünk a paraffinos TMA-blokkokból. A deparaffináló lépések után mikrohullámú sütőben 30 perces feltárást végeztünk Target Retrieval Solution segítségével (DAKO, Glostrup, Dánia). Az immunhisztokémiai reakciókat Ventana ES immunfestő automatában végeztük (Ventana Medical Systems Inc., Tucson, AZ, USA) a gyártó által előírt reagensek segítségével a 6. táblázatban látható antitestek felhasználásával (Zymed Laboratories Inc., South San Francisco, CA, USA). Chromogénként DAB-ot alkalmaztunk (CellMarque, Rocklin, CA, USA). Minden egyes vizsgált antitest esetében pozitív és negatív kontrollmetszeteket használtunk. A metszeteken a háttérfestést Mayer's hemalaun (Zymed Laboratories Inc., South San Francisco, CA, USA) segítségével végeztük.

3.4. Fluoreszcens in situ hibridizáció (FISH)

A FISH-t HER2 és CE17 próbákat tartalmazó Poseidon kit felhasználásával végeztük (Kreatech Diagnostics, Amsterdam, Hollandia). Deparaffinálás után a feltárást VECTOR antigén feltáróban, mikrohullámú sütőben végeztük 10 percig. A pepszines emésztést 37 °C-on 15 percig alkalmaztuk (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Németország). Dehidratálás és szárítás után 75 °C-on 10 percig, majd 37 °C-on egész éjszakán át hibridizáltuk a próbát (Kreatech Poseidon #KBI-10735). A lefedést DAPI-s lefedővel, üveg fedőlemezekkel végeztük (Vectashield H-1200, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA).

3.5. A metszetek digitalizálása és értékelése

Az elkészült metszeteket metszetskennerrel digitalizáltuk (Mirax MIDI, 3DHistech Kft., Budapest, Magyarország). A tumorokat két vizsgáló értékelt (SzAM, KJ) konszenzus eléréséig. Az ER, PgR, és Ki67 reakciókat a magokban látható pozitív reakciók alapján, százalékos skálán értékeltük. A HER2 kifejeződését 0-3 kategóriákba soroltuk. 3+ értékelés: komplett, erős membránfestődés sejtek >30%-ában; 2+ értékelés: komplett közepes intenzitású membránfestődés sejtek >10%-ában, illetve komplett erős membránfestődés a sejtek >10, de <30%-ában; 1+ értékelés: inkomplett gyenge membránfestődés sejtek >10%-ában. 0 értékelés: <10%-ban észlelt pozitívitás, festődés hiánya.

A FISH esetében a tumorokból 50 sejtet értékeltünk Leica DM RXA mikroszkóp segítségével (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Németország), a génamplifikáció megállapításánál a HER2 és CE17 arányát tekintettük referenciapontnak (pozitív, amplifikált: 2.2 feletti HER2/CE17 arány; bizonytalan: 1,8–2,2 közötti HER2/CE17 arány; negatív: 1,8 alatti HER2/CE17 arány).

Az ER és PgR kifejező daganatokat, amelyek Ki67 expressziója kisebb volt, mint 20%, a luminalis A (LUMA) kategóriába soroltuk. Az ER vagy PgR és Her2 kifejező daganatok, és az ER és PgR expresszázó tumorok, amelyek Ki67 indexe 20% feletti volt, a luminalis B altípusba (LUMB) kerültek. A tripla-negatív daganatok csoportját (TNBC) azok a tumorok képezték, amelyek egyik receptort sem expresszázták, és nem mutattak Her2 génamplifikációt sem. Her2 erősen kifejezők (+3) vagy Her2 génamplifikációt mutató daganatok, amelyek ER és PgR negatív tumorok voltak, kerültek a HER2 alcsoportba.

A sejtkapcsoló struktúrák vizsgált molekuláinak értékeléshez a TMA-modul szoftvert használtuk (Mirax Viewer v.1.11.49, 3DHistech Kft., Budapest, Magyarország), és 2 dimenzióban (eloszlás és intenzitás) értékeltük az egyes reakciókat, amelyek összege képezte a végső score-t (0-11), az ábrán látható séma szerint (4. ábra). A claudinok esetében a membránreakciót tekintettük pozitívnak. A claudin-2 esetében előfordult citoplasmaticus granularis reakció, primeren a membrán alatti lokalizációban.

Eloszlás		Intenzitás	
Értékelhetetlen (-1)			
Nincs reakció (0)			
0-1% (1)		+1 (1)	
1-5% (2)		+2 (2)	
5-10% (3)		+3 (3)	
10-33% (4)			
33-50% (5)			
50-66% (6)			
66-80% (7)			
80-100% (8)			

4. ábra. A TMA-modul szoftverben alkalmazott beállítások a tumorok immunhisztokémiai reakcióinak értékelésére: 0-8 skálán az eloszlás, 0-3 skálán az intenzitás került rögzítésre. Az értékelhetetlen reakciókat külön osztályoztuk.

3.6. RNS-kinyerés és cDNS-re átírás

Az RNS-eket Qiagen RNeasy FFPE kit felhasználásával izoláltuk a gyári protokollnak megfelelően (Qiagen, Venlo, Hollandia). Röviden: 5 db 5 µm vastag paraffinos metszetet helyeztünk az egyes tumorok reprezentatív blokkjaiból (amelyekben a tumorsejtek aránya a többi alkotóhoz képest legalább 60% volt) az eppendorf csövekbe, majd deparaffinálást követően proteinase K segítségével emésztettük a szöveteket. A membránra kötött nucleinsavakat alkoholos lemosást követően leoldottuk, és Nanodrop ND-1000 készülékkel mértük koncentrációjukat (NanoDrop products, Wilmington, DE, USA). Az átíráshoz 1 µg RNS-t használtunk fel, a reakciót High Capacity RNA-to-cDNA Transcription kit segítségével végeztük (Applied Biosystems - ABI, Foster City, CA, USA) gyári protokoll szerint.

3.7. Valós-idejű polymerase láncreakció (PCR)

A PCR reakciókat 25 µl-es térfogatban ABI Power SYBR® Green PCR Master Mix felhasználásával ABI 7000 rendszerben futtattuk az alábbi séma szerint: 95°C-on 1 perc, 95°C-on 15 másodperc, 60°C-on 1 perc, majd 72°C-on 1 perc. A CLDN4 génexpresszióját vizsgáltuk, kontrollként pedig GAPDH97-et alkalmaztunk a 7. táblázatban ismertetett primer párokkal.

7. táblázat. A valós idejű PCR vizsgálat során alkalmazott primerek tulajdonságai.

Név	Szekvencia (5' → 3')	Hosszúság
CLDN4 F	CTG CTT TGC TGC AAC TGT CCA C	22
CLDN4 R	ACA CGT AGT TGC TGG CAG CAG	21
GAPDH97F	TCC TCT GAC TTC AAC AGC GAC A	22
GAPDH97R	CAT ACC AGG AAA TGA GCT TGA CAA	24

3.8. Adatbázisok elemzése, statisztikai értékelés

Az adatbázisok értékelését R statisztikai környezetben (R 2.10.1) Prediction Analysis of Microarrays (PAM v.2.19) segítségével végeztük (137). A microarray adatok alapján korábban publikált eredmények felhasználásával tudtunk elemezni a 8. táblázatban szereplő 10 gén (CLDN1, CLDN3, CLDN4, CLDN5, CLDN7, CLDN8, CLDN10, CLDN15, CLDN18, CDH1) kifejeződését és azok prognosztikus képességét. A

legjobban működő próbaszetteket alkalmaztuk. Azokat, amelyek nem voltak megbízhatóak a különböző adatbázisok közötti elemzésben (átlagos expresszió < 100 ÉS maximális expresszió < 500), kihagytuk (CLDN6, CLDN9, CLDN11, CLDN14, CLDN16, CLDN17). A CLDN2, CLDN12, CLDN13 és a továbbiak CLDN19-től nem vizsgálhatóak. Az E-cadherinnek megfelelő próbákat belevettük az elemzésbe az emlődaganatokban ismert marker szerepe miatt (CDH1). A mintákat két csoportra osztottuk a gének median expressziója alapján (felső és alsó quartilis).

8. táblázat. A vizsgált gének és megfelelő azonosítójuk az Affymetrix cDNS-chip-eken. A színek a próbák minőségét jelzik: zöld megbízható, sárga megfelelő, piros kérdéses.

Gene Symbol	Affymetrix ID1	Affymetrix ID2	Affymetrix ID3
CLDN1	218182_s_at		
CLDN2	nincs		
CLDN3	203953_s_at	203954_x_at	
CLDN4	201428_at		
CLDN5	204482_at		
CLDN6	208474_at		
CLDN7	202790_at		
CLDN8	214598_at		
CLDN9	214635_at		
CLDN10	205328_at		
CLDN11	206908_s_at		
CLDN12	nincs		
CLDN13	nincs		
CLDN14	210689_at		
CLDN15	219640_at		
CLDN16	220332_at		
CLDN17	221328_at		
CLDN18	214135_at	221132_at	221133_s_at
CLDN19	nincs		
CLDN20	nincs		
CLDN21	nincs		
CLDN22	nincs		
CLDN23	nincs		
CDH1	201131_s_at	201130_s_at	209414_at

A magas előrejelzési potenciállal bíró gének kiválasztása úgy történt, hogy a PAM segítségével folyamatosan emeltük a gének expressziójából levont küszöböt, amelynek hatására a korrigált génexpresszió folyamatosan csökkent. Ezen "shrunken centroid"-nak nevezett csökkentett génexpresszió szignifikánsan eltérő génjei adták az előrejelző génlistát.

A nyers immunhisztokémiai és PCR adatokat SPSS 15.0 statisztikai programmal értékeltük. A kategorikus változók esetében Mann-Whitney U-tesztet alkalmaztunk. Kaplan-Meier metodikát használtunk az előrejelzés és a túlélés ábrázolására (locregionalis relapsusig vagy távoli metasztázis megjelenéséig eltelt idő, illetve teljes túlélés), melyek statisztikai erejét log-rank teszttel támasztottuk alá. A csoportok elválasztására a median érték mentén került sor. Több változó túlélési predikciójának összehasonlításához Cox regressziós modellt alkalmaztunk, a multivariáns analízis számolásához 95%-os konfidencia intervallummal. „Unsupervised” metodikát használtunk a hierarchikus clustering vizsgálathoz „Hamming distance” számítással. Statisztikailag jelentősnek a $p < 0.05$ értéket tekintettük.

4. EREDMÉNYEK

4.1. A szöveti minták elemzésével nyerhető prognosztikus információ a patológiai paraméterek alapján a "tréning" csoportban

A bioinformatikai elemzéssel párhuzamosan immunhisztokémiai vizsgálatokat végeztünk a szöveti mintáink egyik részén (n/tréning szett/= 249). Ezek között mesterségesen „dúsítottuk” a műtét időpontjában nyirokcsomó- és későbbiekben távoli áttéttel rendelkező tumorokat a nem recidiváló kontrollokkal szemben annak érdekében, hogy a túlélési vizsgálatokhoz kellően markáns végpontokat állapíthassunk meg. A tréning szettben vizsgált daganatok 249 primer tumort foglaltak magukban, a grade és szövettani típusok eloszlása kiegyenlített volt. Az általunk elvégzett immunhisztokémiai vizsgálatok után 4/5 részben luminalis daganatok (80.7%), 19.3%-ban ER negatív tumorok alkották ezt a csoportot (9. táblázat).

9. táblázat. A tréning kohort klinikopatológiai tulajdonságai.

Betegszám		249
Szövettani típus (n, %)	IDC	118 (47.4%)
	ILC	77 (30.9%)
	egyéb	54 (21.7%)
Grade (n, %)	1	56 (22.4%)
	2	122 (48.9%)
	3	71 (28.5%)
Altípusok (n, %)	Luminalis A	164 (65.9%)
	Luminalis B	37 (14.9%)
	Her2	9 (3.7%)
	Tripla negatív	39 (15.7%)

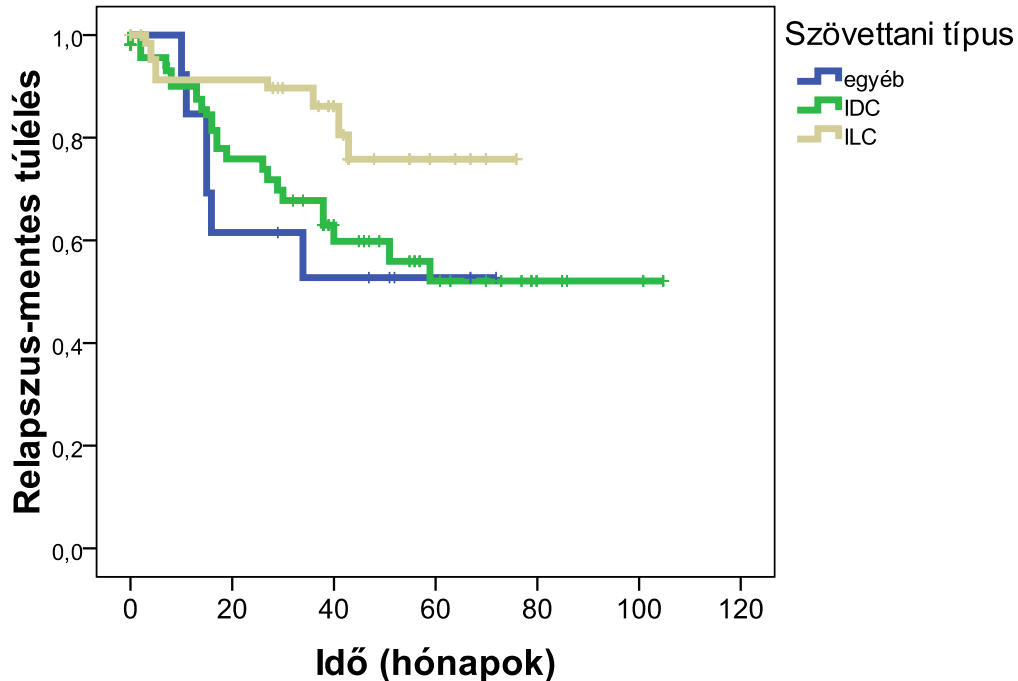
A 249 fős tréning csoportban elsőként a szövettani típus, a grade és az immunphenotipusos csoportok által hordozott prognosztikus információk elemzését végeztük el, majd ez után következett a claudinok kifejeződési mintázatának elemzése. Ennek során a relapszus-mentes túlélés előrejelzésére való képesség leírásával teszteltük az egyes faktorok erősségét.

A szövettani típus szerint a lobularis carcinomák tünetmentes túlélése volt a leghosszabb (p /ILC-IDC/ = 0.001), ezeket követték az IDC-k, majd az egyéb daganatok (5. ábra), amelyek között a tripla negatív tumorok, így túlnyomóan grade 3-as, medullaris

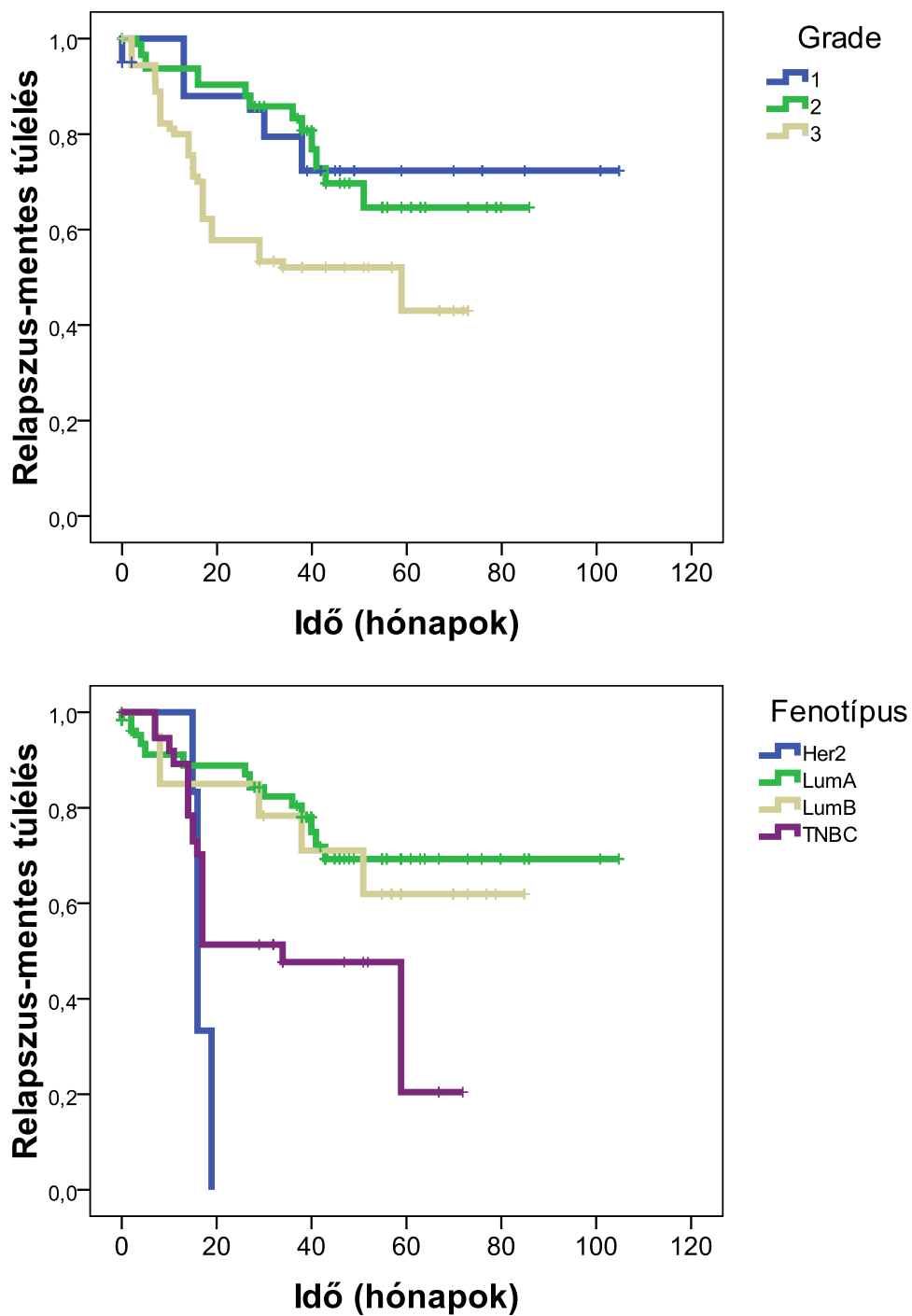
és medullaris jellegű és metaplasticus carcinomák felülreprezentáltak voltak (p /egyéb-ILC/ = 0.026).

A szövettani grade szerinti összehasonlításban a legjobban differenciált formáktól a legkevésbé differenciáltak felé fokozatosan csökkent a relapszus-mentes túlélés (p /G1-G3/ = 0.001; p /G2-G3/ = 0.001). A grade-ek szerinti relapszus-mentes túlélési görbék lefutását a 6. ábra mutatja.

Az immunfenotípus szerinti felosztásban a luminalis daganatok túlélése volt a legjobb, majd ezeket követték a Her2 és tripla negatív tumorok (7. ábra).



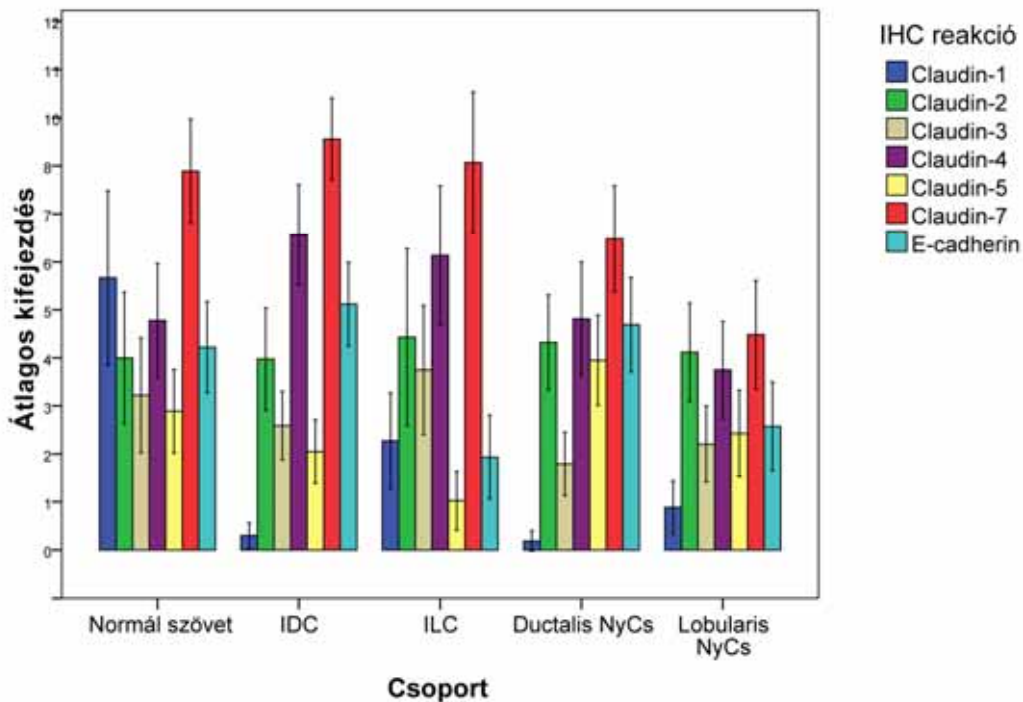
5. ábra. A tréning kohortban található esetek relapszus-mentes túlélése. Az egyéb kategóriában a medullaris jellegű- és metaplasticus tripla-negatív tumorok felülreprezentáltak ($n=249$).



6. és 7. ábra. A tréning kohortban található esetek relapszus-mentes túlélése a szövettani differenciáltság (felül) és az immunfenotípus (alul) vonatkozásában. A grade 3-as kategóriában a tripla-negatív tumorok felülreprezentáltak ($n=249$).

4.2. Claudin- és E-cadherin kifejeződés a „tréning” csoportban, különös tekintettel a szövettani, differenciáltsági és immunfenotípus alcsoportokra

A tréning csoportban immunhisztokémiai reakciókkal vizsgáltuk a claudin-1, -2, -3, -4, -5, -7 és E-cadherin kifejeződést. Az elemzést a daganatok morfológiai, grade és altípus szerinti claudin-kifejeződésének összehasonlításával kezdtük.



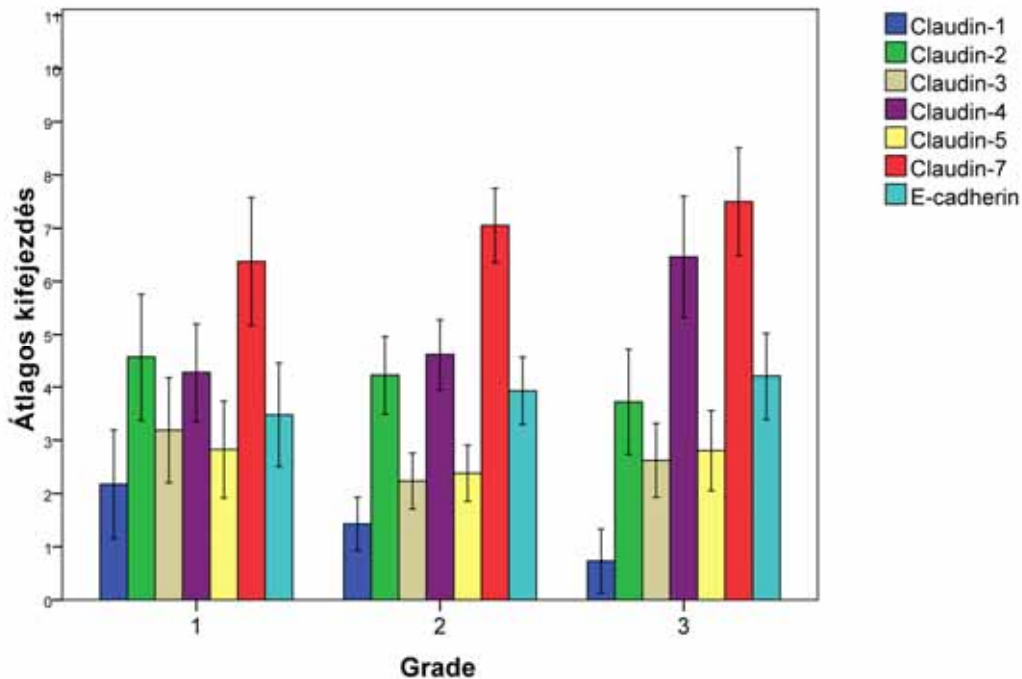
8. ábra. Claudinok és E-cadherin kifejeződése a normál szövetekben, primer tumorokban és nyirokcsomó-áttétekben. Az értékeléshez használt szemikvantitatív score-rendszerben kifejezve (0-11), az oszlopdiagramokon az átlagos kifejeződés és a standard hiba van feltüntetve.

A ductalis carcinomák jelentős eltérést mutattak a claudin-1, -4 és -7 kifejeződésében a normális szövetekhez képest ($p = 0.001$, $p = 0.002$, $p = 0.004$). A claudin-1 csökkent, a claudin-4 és -7 emelkedett. A lobularis carcinomák a claudin-1, -4, -5, -7 és E-cadherin tekintetében mutattak eltérő kifejeződést az egészséges emlőjáratokat alkotó hámhöz képest ($p = 0.001$, $p = 0.025$, $p = 0.001$, $p = 0.034$, $p = 0.001$). A claudin-1, -5 és E-cadherin csökkent, a claudin-4 és -7 emelkedett. Az immunreakciók értékelésének eredményét ebben az összehasonlításban a 8. ábra mutatja. A 37 ILC-ből 11-ben (29.7 %) volt látható igen alacsony szintű E-cadherin kifejeződés (9 eset score 2, 2 eset score 3). A ductalis carcinomák esetében 41 esetben erős kifejeződés volt látható,

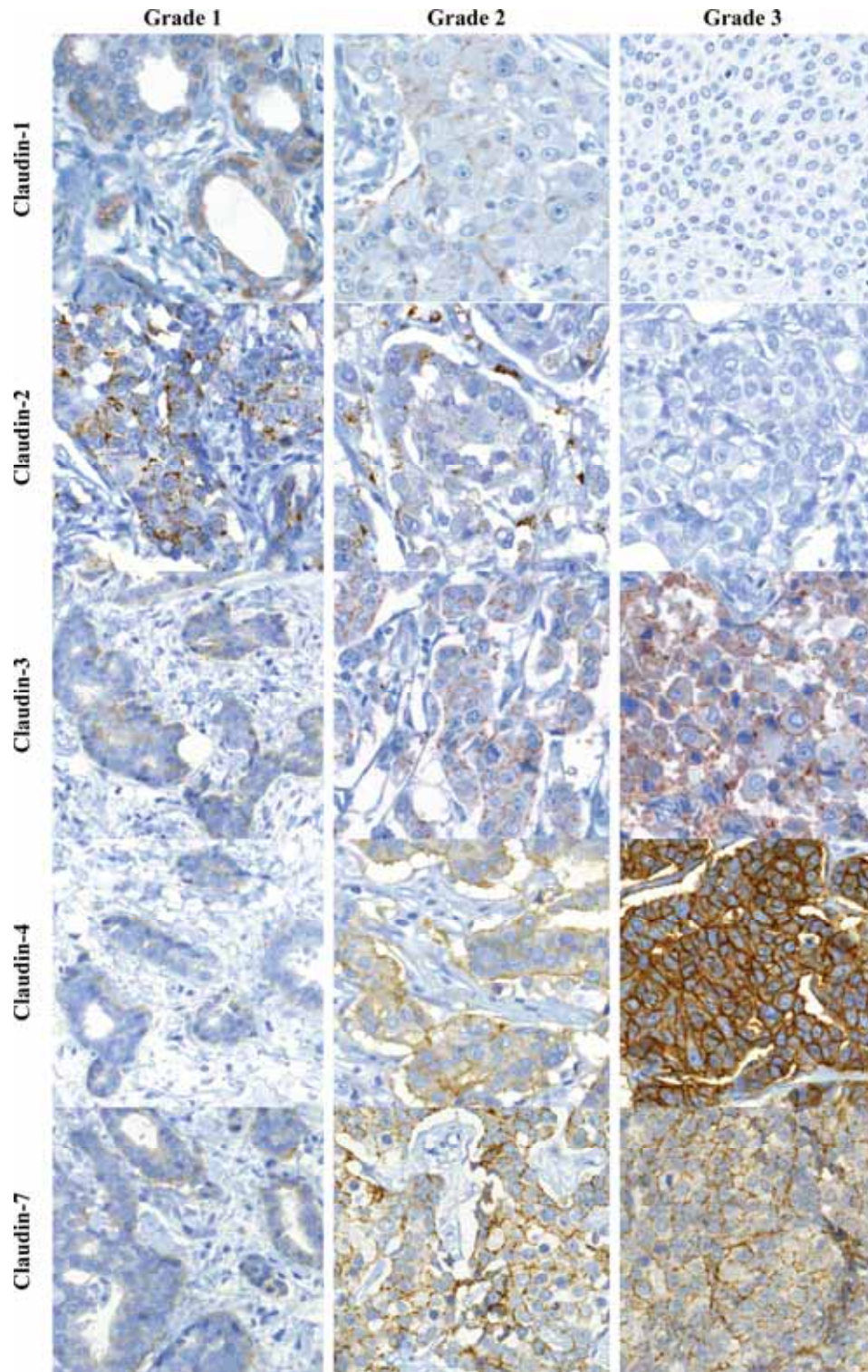
azonban 19 tumorban (31.6%) alacsonyabb E-cadherin kifejeződés tűnt fel (11 esetben score 3, 8 esetben score 2).

A ductalis carcinomák regionális nyirokcsomó áttétjeiben a claudin-3, -4 és -7 csökkent, a claudin-5 emelkedett. A lobularis carcinomák metasztázist tartalmazó regionális nyirokcsomóiban levő daganatsejtekben a primer tumorsejt populációhoz képest a claudin-1, -3, -4 és -7 csökkent, a claudin-5 fokozott expressziót mutatott (138, 139).

A szövettani grade tekintetében a grade 1 és 2 tumorok között a claudin-3 ($p = 0.001$), a grade 2 és 3 tumorok között a claudin-3, -4, -5 és -7 expresszió mutatott szignifikáns eltérést. ($p = 0.002$, $p = 0.001$, $p = 0.001$, $p = 0.012$). Megfigyelhető volt a claudin-1 és -2 csökkenése és a claudin-4 és -7 emelkedése a szöveti differenciáció csökkenésével (9. és 10. ábra) (140).

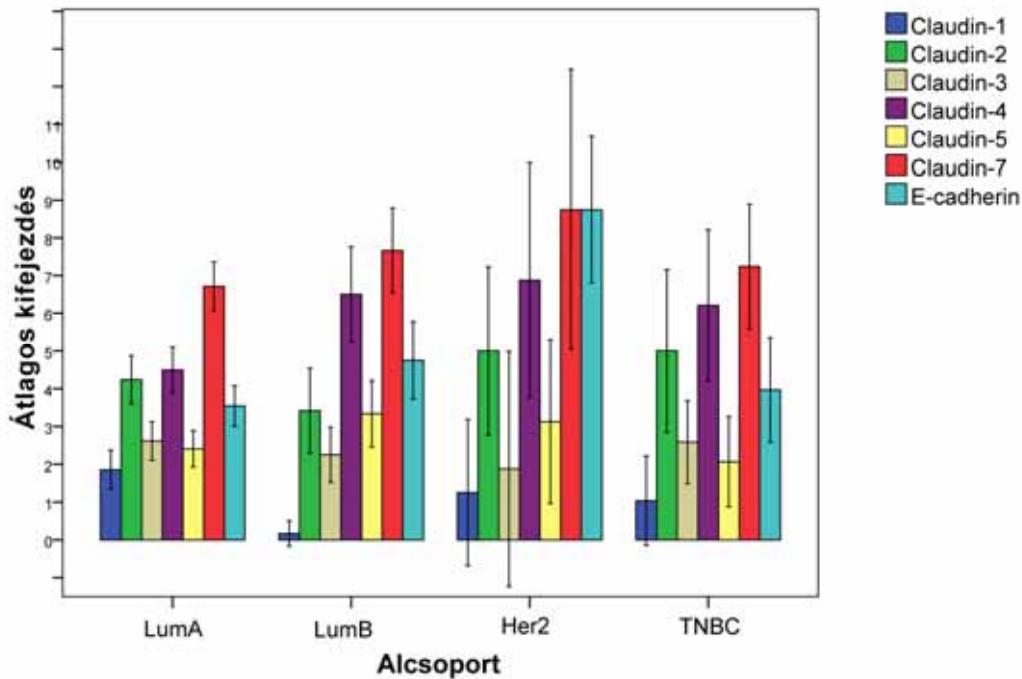


9. ábra. Claudinok és E-cadherin kifejeződése a primer tumorokban a grade szerint. Az értékeléshez használt szemikvantitatív score-rendszerben kifejezve (0-11), az oszlopdiaqramokon az átlagos kifejeződés és a standard hiba van feltüntetve.



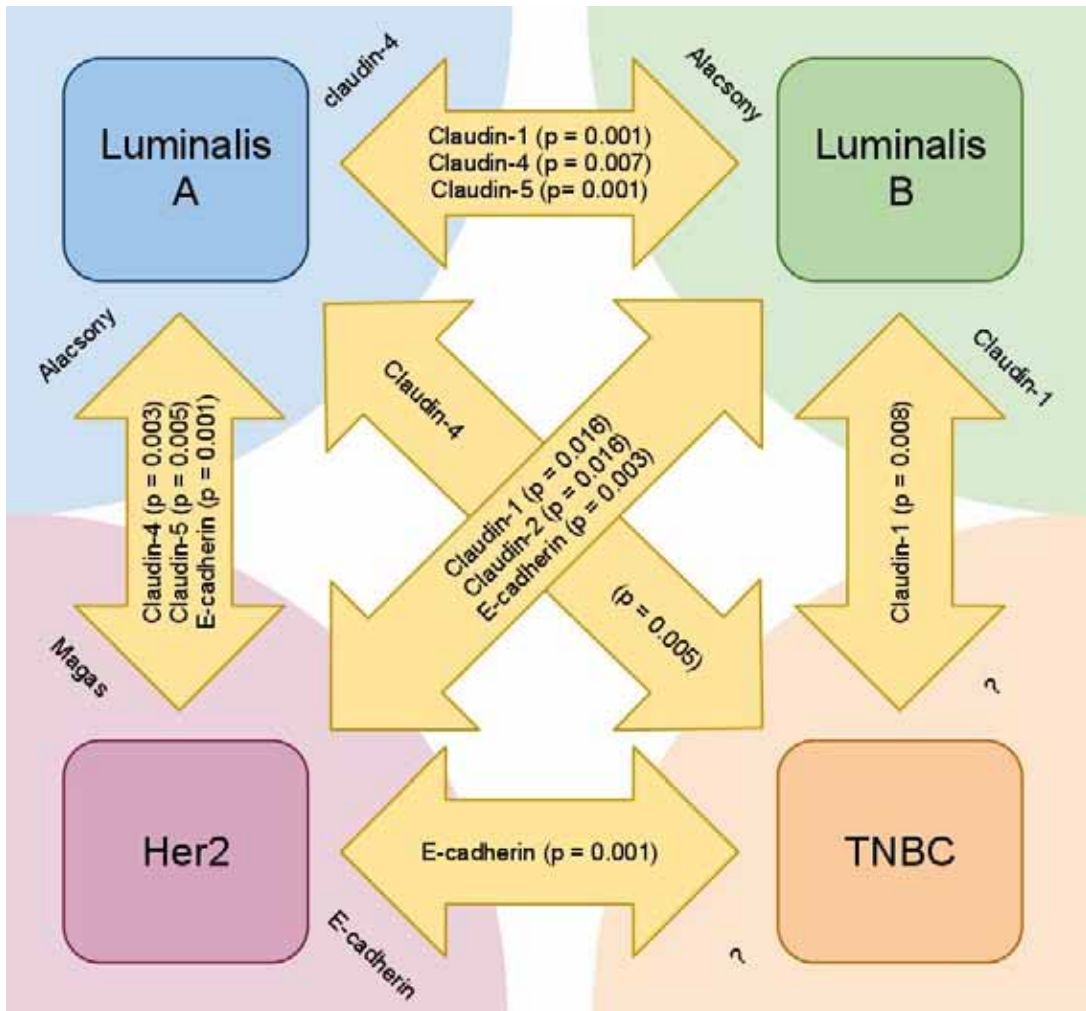
10. ábra. Claudin-1, -2, -3, -4 és -7 kifejeződése immunhisztokémiai reakciókkal a grade 1, 2 és 3 differenciáltságú tumorokban (Mirax Midi scan, 40x nagyítás).

Az immunfenotípus csoportok összehasonlításában a claudin-1 kifejeződése a luminalis B, a claudin-4 a luminalis A csoportban volt a legalacsonyabb, míg a többi csoportban e két fehérje expressziója relatíve magasabb volt (140). Az E-cadherin magas expressziót mutatott a Her2 pozitív csoportban. A jelentősebb különbségeket a 11. ábra mutatja.



11. ábra. Claudinok és E-cadherin kifejeződése a primer tumorokban az altípusok szerint. Az értékeléshez használt szemikvantitatív score-rendszerben kifejezve (0-11), az oszlopdiaagramokon az átlagos kifejeződés és a standard hiba van feltüntetve.

A luminalis A és B és a Her2 tumorokra igaz, hogy egy-egy, ezen dolgozatban elemzett, immunreakció segítségével is valamelyest elkülöníthetők egymástól. A tripla negatív daganatokban azonban nem tudunk egyelőre ilyen egyértelmű sejtkapcsoló fehérje markert vagy marker mintázatot találni. A luminalis A daganatoktól a claudin-4 (140), a luminalis B tumoroktól a claudin-1, míg a Her2 immunfenotípusú daganatokról az E-cadherin expresszió különítheti el (12. ábra).

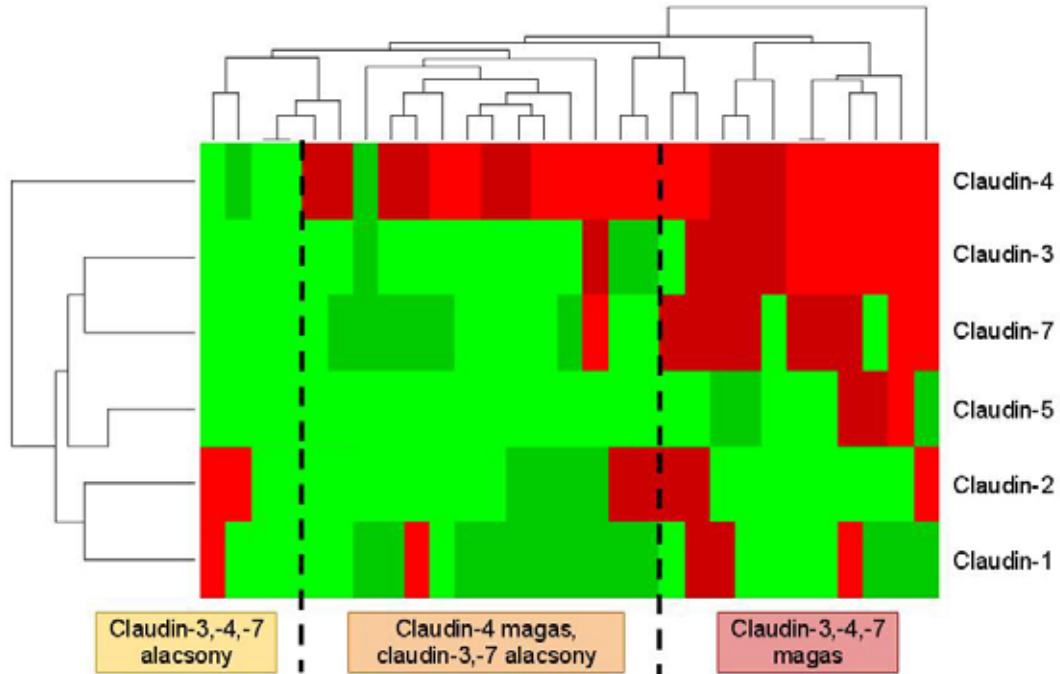


12. ábra. Az egyes immunfenotípus csoportok között jelentős kifejeződésbeli különbséget mutató, általunk vizsgált claudinok és E-cadherin. A kétirányú nyilak a csoportok között szignifikánsan eltérő claudin és E-cadherin kifejeződés konkrét adatait mutatják.

Ezért feltételezhető, hogy a tripla negatív tumorok egy heterogén csoportot alkotnak a sejtkapcsoló molekulák kifejeződésének tekintetében is. Ha csak a TNBC-ket elemezzük, hierarchikus cluster analízis segítségével, akkor 3 csoportjukat tudjuk megkülönböztetni a claudin molekulák expressziója alapján:

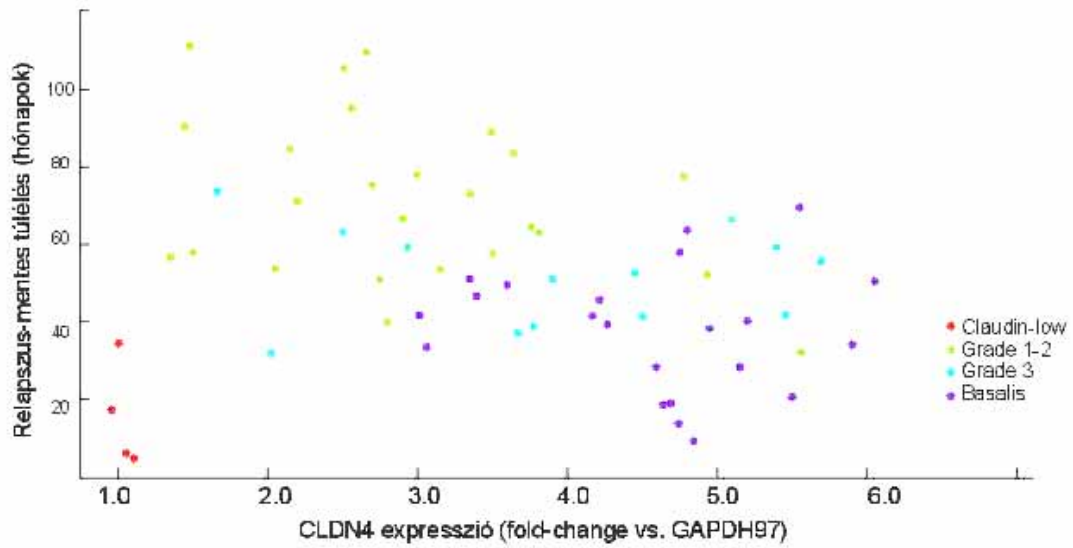
- 1) claudin-4,-3,-7 kifejező;
- 2) claudin-4 kifejező, de claudin-3,-7 alacsony/negatív;
- 3) claudin-4,-3,-7 alacsony („claudin-low”).

A „claudin-low” alcsoport megjelenik mint külön kategória (13. ábra). Amikor vizsgálatunkat megismételtük csak a basalis carcinomákat (a TNBC csoporton belül a CK5/6 pozitív eseteink, $n = 29$) elemezve, a csoportok ugyancsak elkülönültek: kevésbé élesen határolódott el azonban a claudin-4,-3,-7 kifejező és a claudin-4 kifejező, claudin-3,-7 negatív típus. A claudin-low daganatok ismét külön csoportba kerültek (141).



13. ábra. Csak basalis daganatokat tartalmazó daganatcsoport hierarchikus cluster analízis eredményeinek grafikonja. Az alacsony expressziótól a magas expresszió felé az élénkzöld-zöld-sötétpiros-élénkpiros színskála mutatja az átmenetet.

A claudin-4 mRNS-szintű expresszióját is megvizsgáltuk valós idejű PCR segítségével. A vizsgálatba kontrollként grade 1, 2 és 3 IDC-kat is bevettünk. A basalis daganatok között jelentős szignifikanciával elkülönült a claudin-4-et magasan és alacsonyan expresszáló tumorok csoportja, utóbbi egy claudin-low csoportot jelöl ($p = 5.7E-09$) (142). Ebben a tumortípusban a többihez képest rövidebb relapszus-mentes túlélési időt találtunk (14. ábra).



14. ábra. Valós idejű CLDN4 PCR eredmények a relapszus-mentes túléléssel való összefüggésükben ábrázolva. A claudin-low (piros) tumorok jelentősen elkülönülnek a többi basalis típusú TNBC-től (lila). A kontrollcsoportok (zöld és kék) IDC-k.

4.3. Adatbázisok elemzésével nyert prognosztikus információ a claudin-kifejeződés alapján

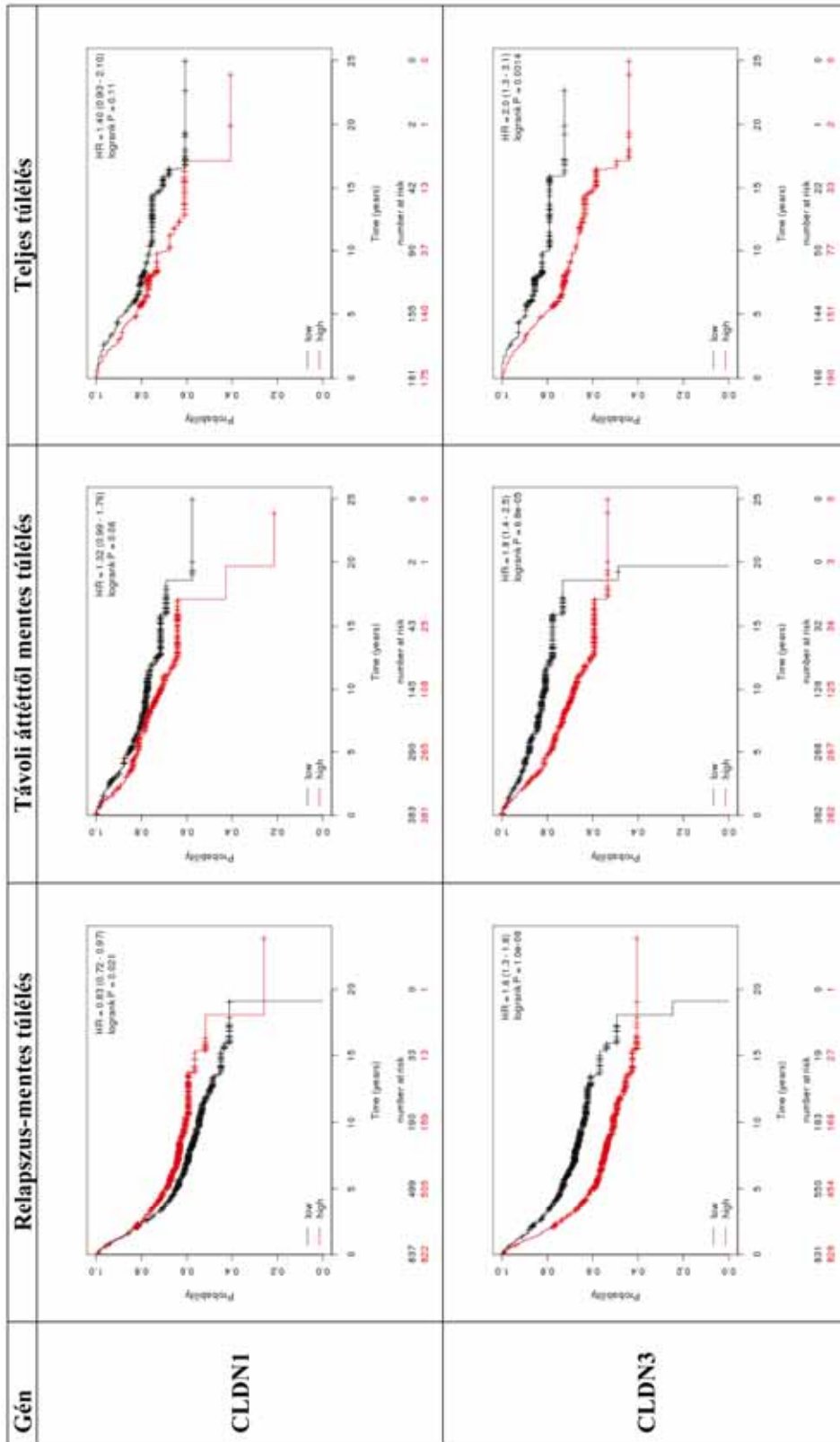
A 13 adatbázis letöltése után az általunk vizsgálni kívánt claudinok és E-cadherin kifejeződését egyesével elemeztük 1809 betegben (10. táblázat). Mind a relapszus-mentes (RT), mind a teljes (TT), mind a távoli áttétől mentes túlélés (MT) predikcióját ábrázolhattuk (15. ábra).

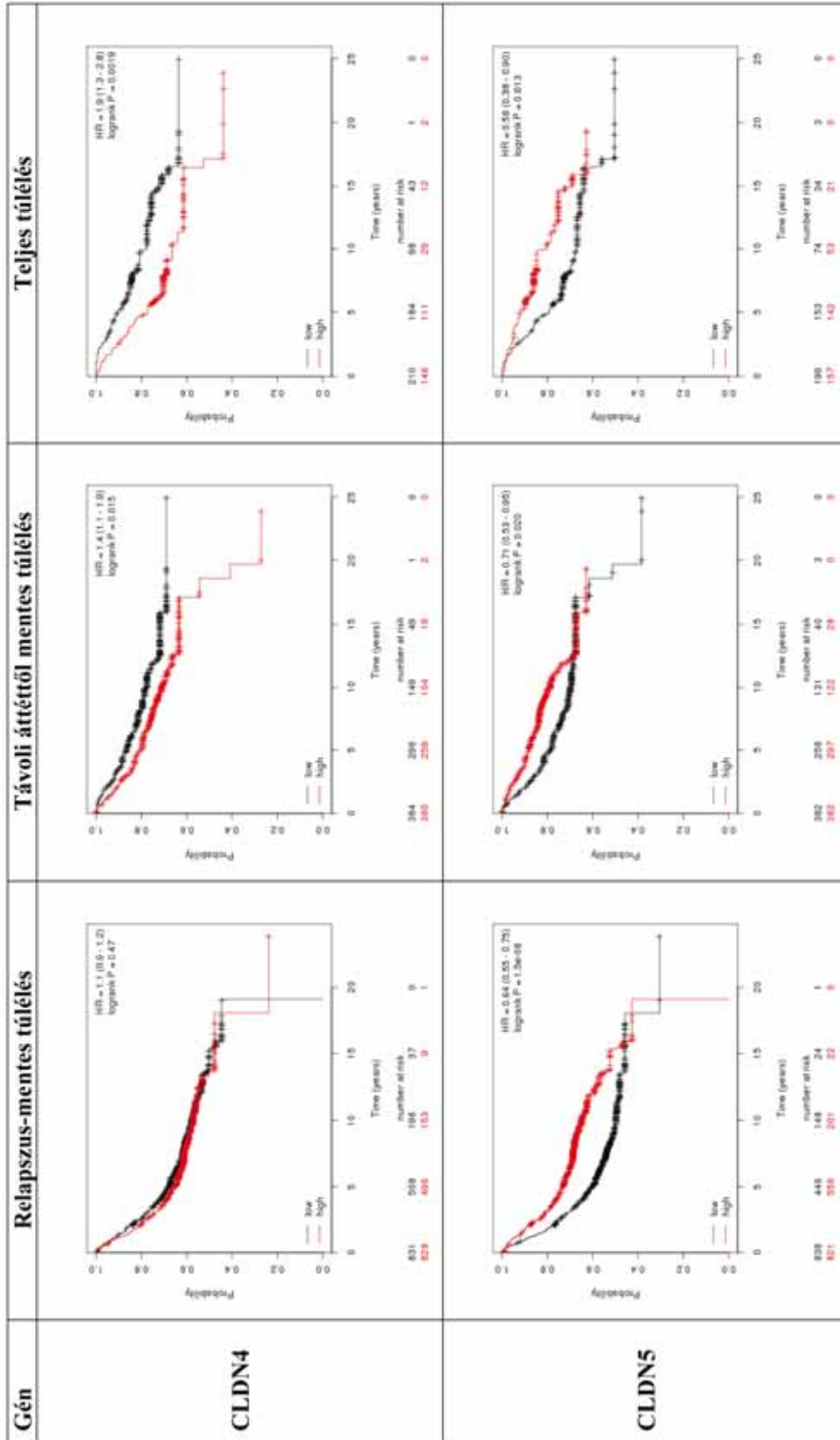
10. táblázat. A vizsgált gének median kifejeződése mentén elkülönített betegcsoportok túlélési csoportjai közötti különbségek (a jobb prognózist jelentő eltérés a rosszabb csoporthoz viszonyítva és a p érték, a szignifikáns eltérést * jelöli).

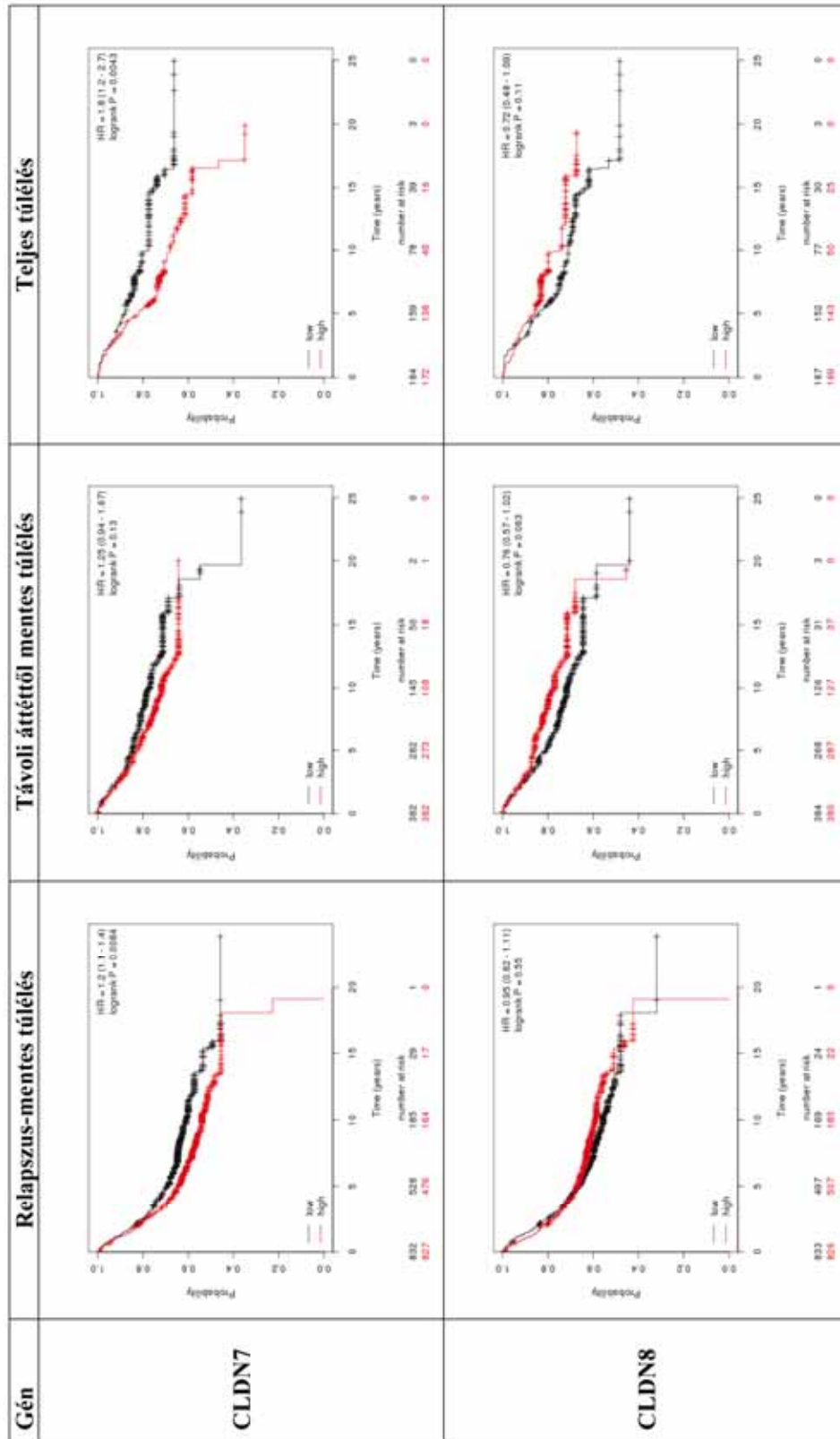
Gén	Relapszus-mentes túlélés (RT)	Metasztázistól mentes túlélés (MT)	Teljes túlélés (TT)
CLDN1	↑ 0.0201 *	↓ 0.0609	↓ 0.1100
CLDN3	↓ 1.0E-08 *	↓ 6.8E-05 *	↓ 0.0014 *
CLDN4	? 0.4702	↓ 0.0150 *	↓ 0.0019 *
CLDN5	↑ 1.5E-08 *	↑ 0.0208 *	↑ 0.0130 *
CLDN7	↓ 0.0084 *	↓ 0.1307	↓ 0.0043 *
CLDN8	↑ 0.5503	↑ 0.0630	↑ 0.1100
CLDN10	↑ 3.5E-08 *	↓ 0.0520	↓ 0.2605
CLDN15	↑ 8.4E-07 *	↑ 0.5606	↑ 1
CLDN18	↑ 3.4E-14 *	↓ 0.0870	↓ 0.4604
CDH1	↓ 5.3E-07 *	↓ 0.0040 *	↓ 0.0430 *

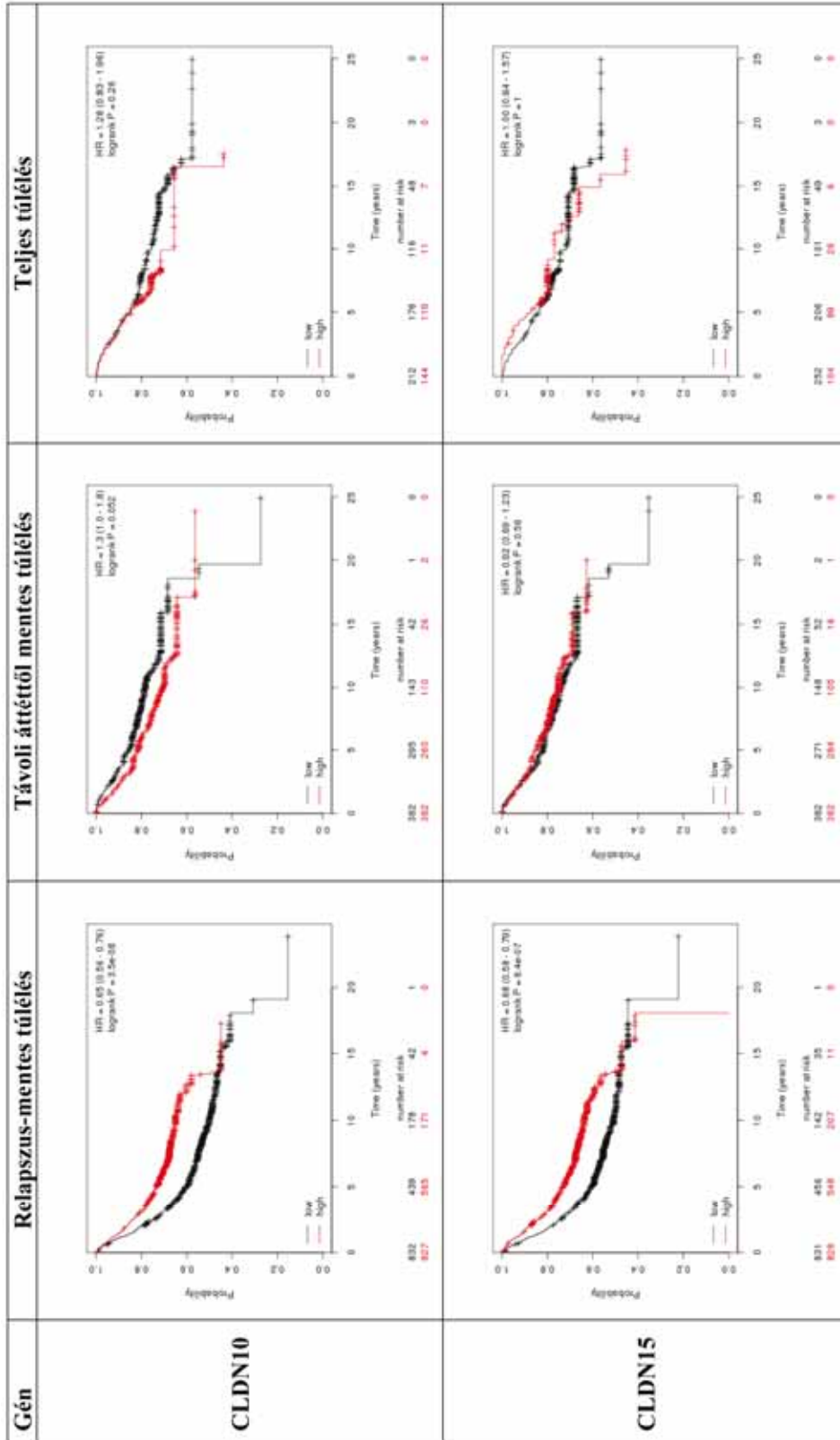
Megjegyzendő, hogy nagy esetszámú in silico vizsgálatban egyénileg a claudin-3, -4, -7 és E-cadherin csökkent kifejeződése mutatkozott a jobb prognózis jelének, míg a claudin-1, -5, -10, -15 és -18 egyéni magasabb kifejeződése is jobb kimenetelt jelentett. Rövidtávon a vizsgált gének nagyobb része volt képes a prognózis előrejelzésére, míg a későbbi túlélésre már csak a claudin-3, -4, -5, -7 és E-cadherin tudott prognózist becsülni.

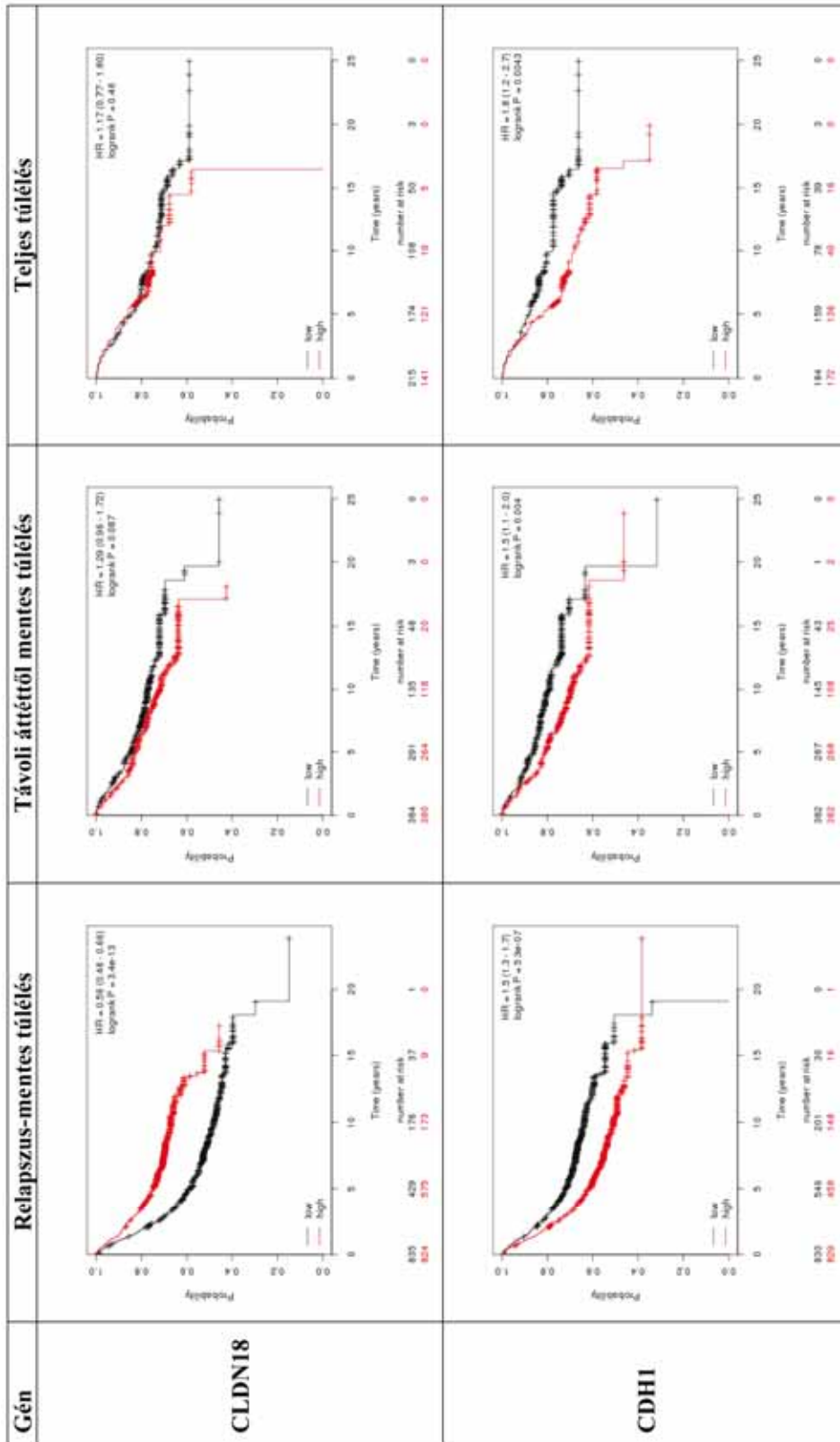
15. ábra. A CLDN1, CLDN3, CLDN4, CLDN5, CLDN7, CLDN8, CLDN10, CLDN15, CLDN18 és CDH1 gének által önmagukban hordozott információ a relapszus-mentes, a távoli áttétől mentes és a teljes túlélés tekintetében. Piros: magasan kifejeződik; fekete: alacsonyan expresszálódik (41-45. oldalak). →









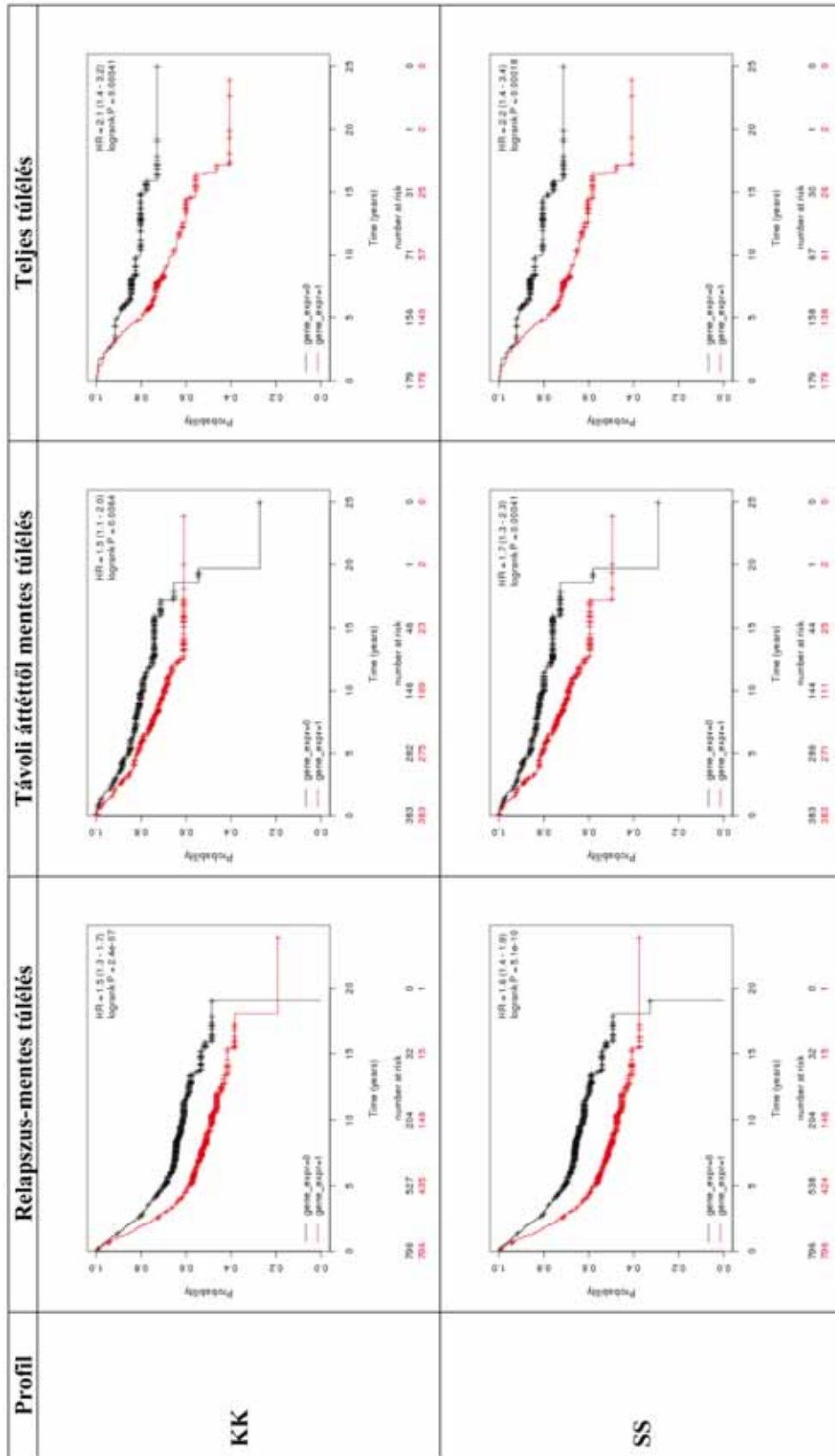


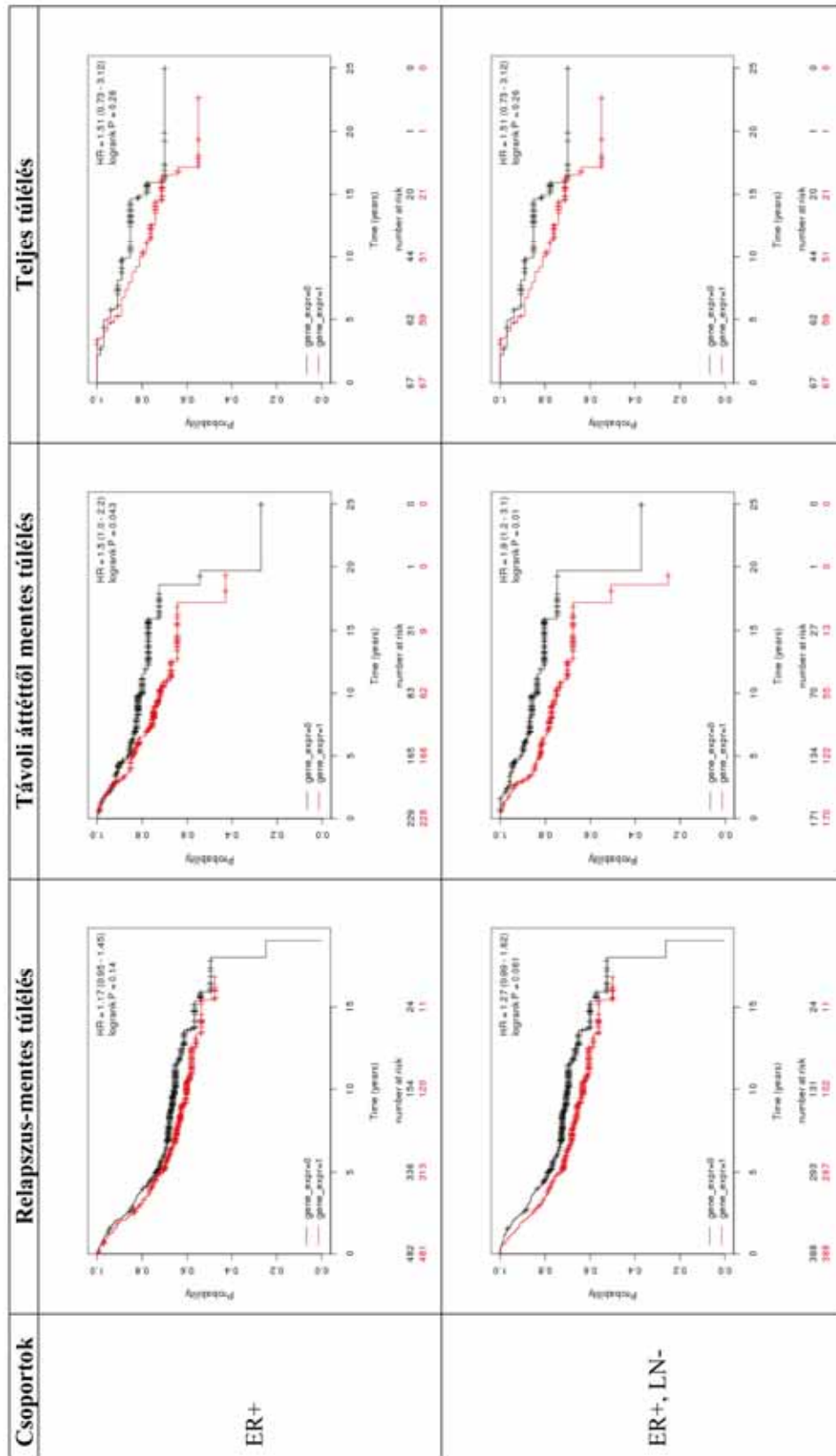
Bár önmagukban szignifikáns különbség adódott egyes claudinok esetén (10. táblázat), a predikciót a gének kombinált elemzésével egészítettük ki: egy komplex (sejt)kapcsolati (KK1) profilt teszteltünk következő lépésben, amely együttesen, súlyozás nélkül tartalmazta a vizsgált géneket: CLDN1, CLDN3, CLDN4, CLDN5, CLDN7, CLDN8, CLDN10, CLDN15, CLDN18, CDH1. Minden aspektusban javult a prediktív erő (6. ábra): $p /RT/ = 2.4E-07$, $p /MT/ = 0.00640$ és $p /TT/ = 0.00041$.

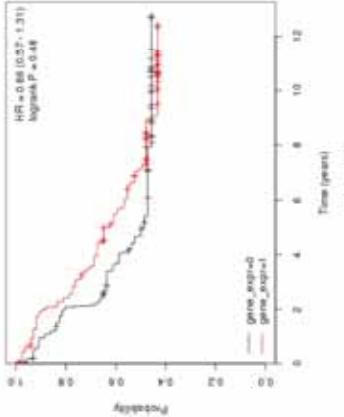
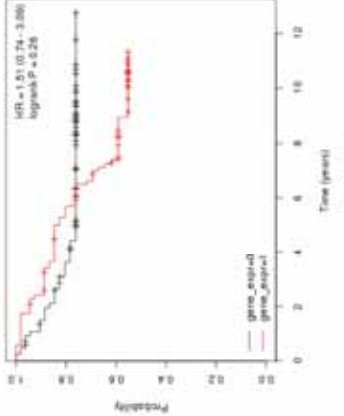
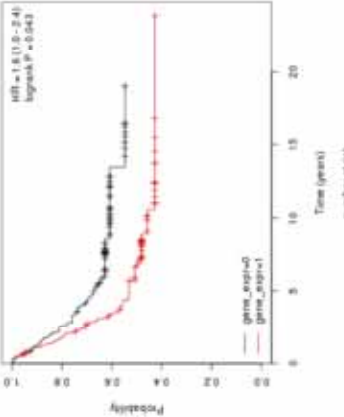
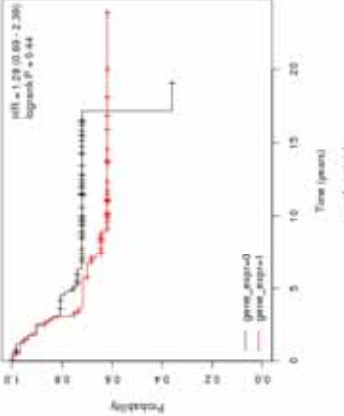
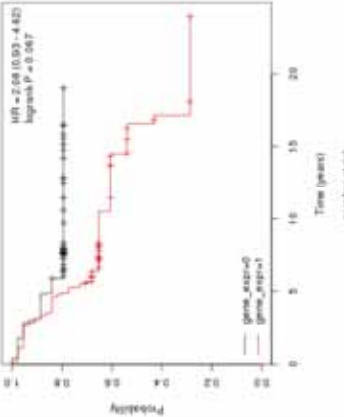
A gének számának csökkentése érdekében egy szimpla sejtkapcsolati (SS1) profilt alakítottunk ki centroid alapú eljárással, amelynek során a legerősebben működő gének csoportját határoztuk meg (16. ábra). Megjegyzendő, hogy a legjobb minőségű próbák közül azok, amelyek 2 vagy 3 túlélési összehasonlításban is jól szerepeltek, adták ezeket a géneket: CLDN3, CLDN4, CLDN7, CDH1 (8. és 10. táblázat). Az SS1 prognosztikus profil minden előrejelzésben jobban teljesített az előző összehasonlításoknál: $p /RT/ = 5.1E-10$, $p /MT/ = 0.00041$, $p /TT/ = 0.00018$.

Az adatbázis lehetővé tette, hogy a következőkben klinikai döntések szempontjából nem mindig egyértelmű betegcsoportokban megvizsgáljuk az egyszerűsített profil működését (17. ábra). Az SS1 mintázat ER+ daganatokban képes volt előre jelezni a távoli áttét kialakulását ($p = 0.043$), és még erősebben teljesített a nyirokcsomó áttéttel nem rendelkező (ER+, LN-) alcsoportban ($p = 0.010$). A közepesen differenciált, grade 2 ER+ tumorok esetében képes volt a relapszus-mentes túlélés tekintetében 2 csoportot elkülöníteni ($p=0.043$).

16. ábra. A komplex (sejt)kapcsolati (KK1) profil és a szimpla sejtkapcsolati (SS1) profil által hordozott információ a relapszus-mentes, a távoli áttétől mentes és a teljes túlélés tekintetében (47. oldal). →





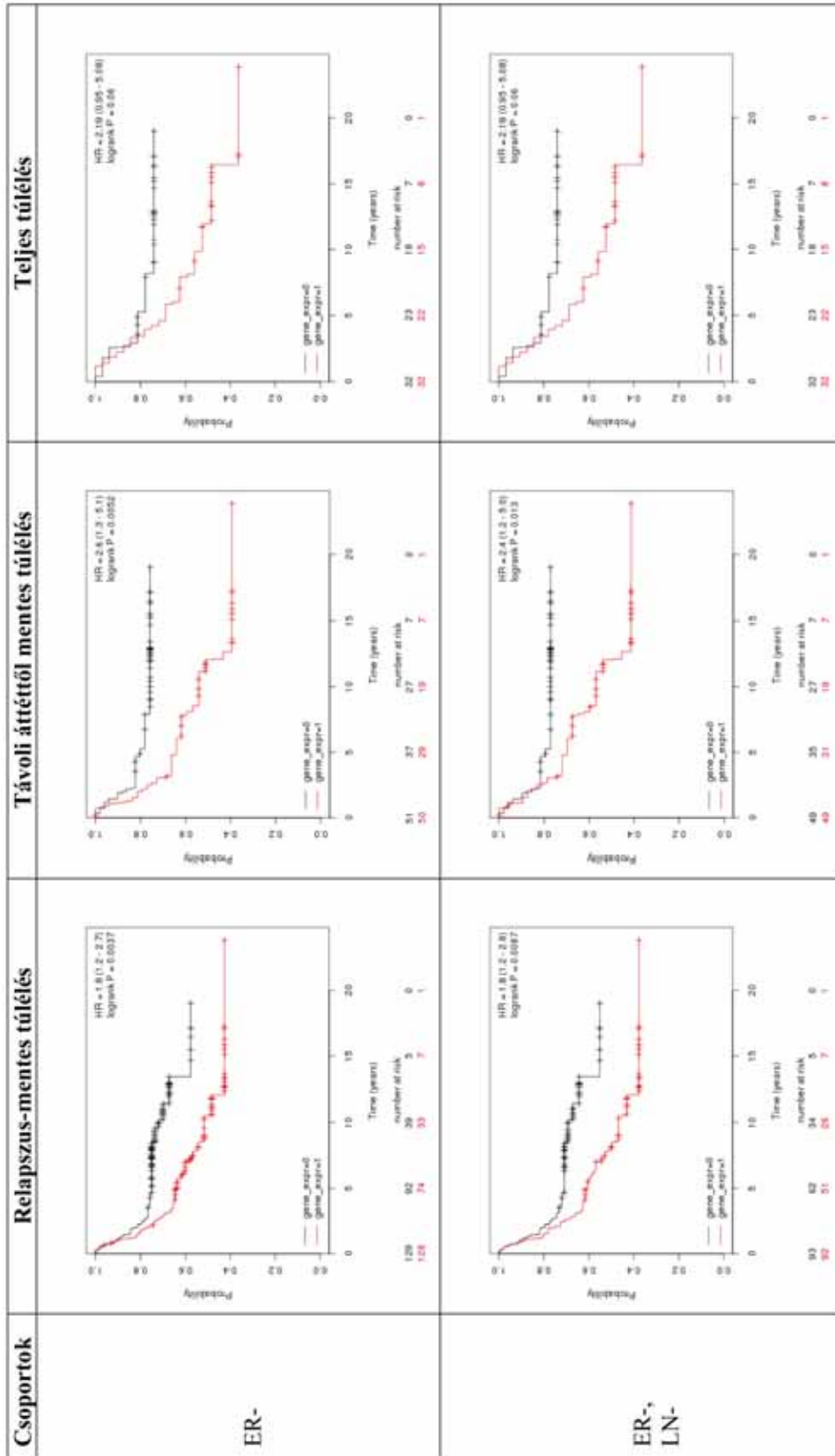
Csoportok	Relapszus-mentes túlélés	Távoli áttétől mentes túlélés	Teljes túlélés																																										
ER+, LN+	 <table border="1" data-bbox="738 1312 803 1648"> <tr> <td>88</td> <td>88</td> <td>47</td> <td>35</td> <td>31</td> <td>21</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>87</td> <td>74</td> <td>55</td> <td>41</td> <td>26</td> <td>16</td> <td>2</td> </tr> </table>	88	88	47	35	31	21	3	87	74	55	41	26	16	2	 <table border="1" data-bbox="738 833 803 1169"> <tr> <td>54</td> <td>44</td> <td>37</td> <td>30</td> <td>25</td> <td>7</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>54</td> <td>51</td> <td>41</td> <td>35</td> <td>16</td> <td>12</td> <td>6</td> </tr> </table>	54	44	37	30	25	7	1	54	51	41	35	16	12	6	<p data-bbox="576 346 641 661">Alacsony esetszám miatt az elemzés nem kivitelezhető.</p>														
88	88	47	35	31	21	3																																							
87	74	55	41	26	16	2																																							
54	44	37	30	25	7	1																																							
54	51	41	35	16	12	6																																							
ER+, Grade 2	 <table border="1" data-bbox="1188 1312 1253 1648"> <tr> <td>97</td> <td>81</td> <td>28</td> <td>7</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>96</td> <td>45</td> <td>17</td> <td>5</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> </tr> </table>	97	81	28	7	0	0	0	96	45	17	5	0	0	0	 <table border="1" data-bbox="1188 833 1253 1169"> <tr> <td>64</td> <td>44</td> <td>28</td> <td>9</td> <td>9</td> <td>9</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>63</td> <td>41</td> <td>22</td> <td>5</td> <td>2</td> <td>2</td> <td>2</td> </tr> </table>	64	44	28	9	9	9	2	63	41	22	5	2	2	2	 <table border="1" data-bbox="1188 350 1253 686"> <tr> <td>44</td> <td>37</td> <td>13</td> <td>6</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>43</td> <td>34</td> <td>14</td> <td>7</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> </tr> </table>	44	37	13	6	0	0	0	43	34	14	7	0	0	0
97	81	28	7	0	0	0																																							
96	45	17	5	0	0	0																																							
64	44	28	9	9	9	2																																							
63	41	22	5	2	2	2																																							
44	37	13	6	0	0	0																																							
43	34	14	7	0	0	0																																							

Az ER- daganatok esetében is működött az SS1 profil: képes volt a relapszus-mentes túlélés előrejelzésére, és a távoli áttétől mentes túlélést valamelyest jelezte (p /RT/ = 0.0037; p /MT/ = 0.0052). Hasonlóan teljesített az ER-, LN- alcsoportban (p /RT/ = 0.0087; p /MT/ = 0.013). Alacsony esetszám miatt az elemzés nem volt kivitelezhető az ER-, LN+ betegekben (18. ábra).

← 17. ábra. Az SS1 profil által hordozott információ a relapszus-mentes, a távoli áttétől mentes és a teljes túlélés tekintetében ER+ daganatok különböző csoportjaiban (48-49. oldalak).

18. ábra. Az SS1 profil által hordozott információ a relapszus-mentes, a távoli áttétől mentes és a teljes túlélés tekintetében ER- daganatok különböző csoportjaiban (51. oldal).

→



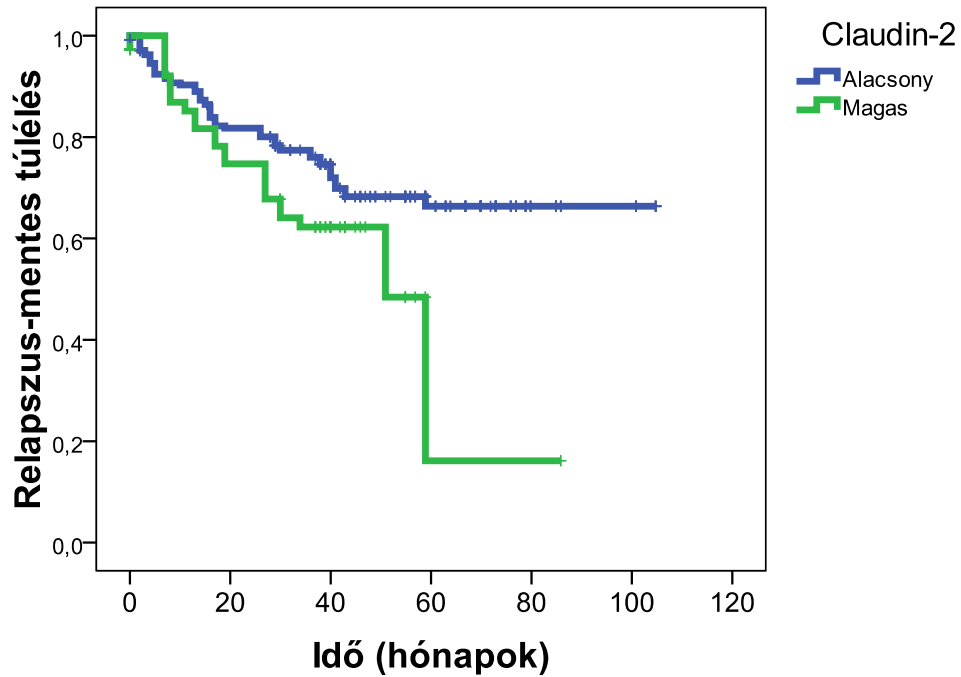
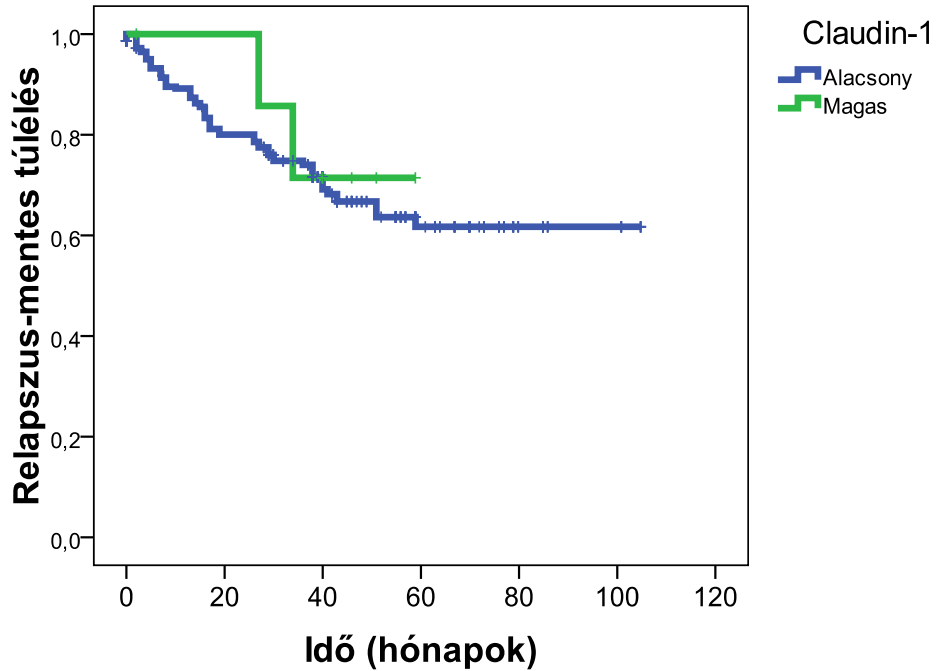
4.4. A szövetminták elemzésével nyerhető prognosztikus információ a claudin- és E-cadherin kifejeződés alapján a “tréning” csoportban

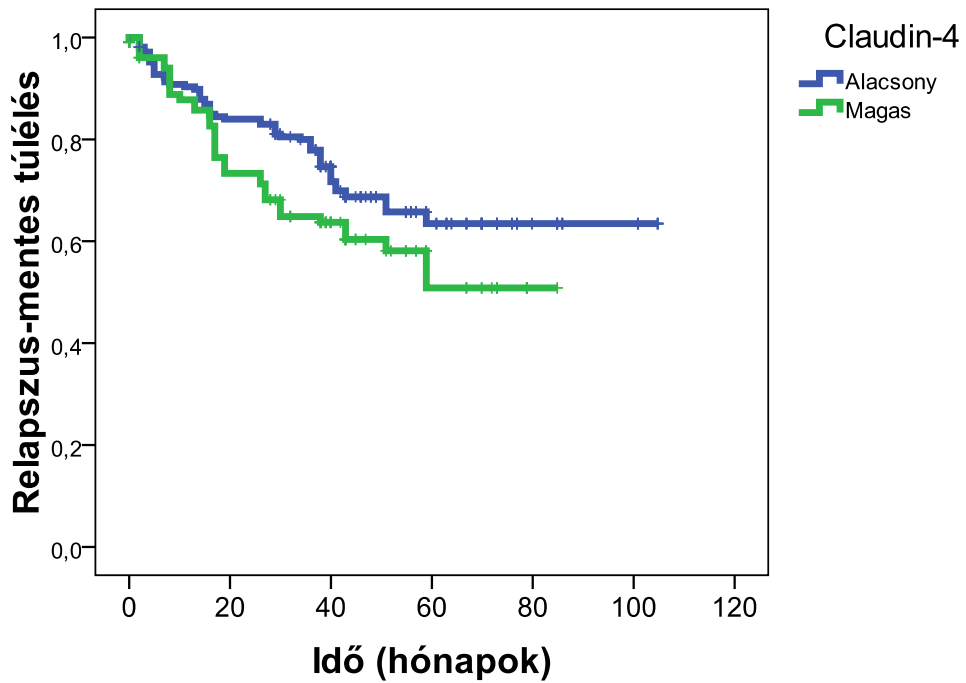
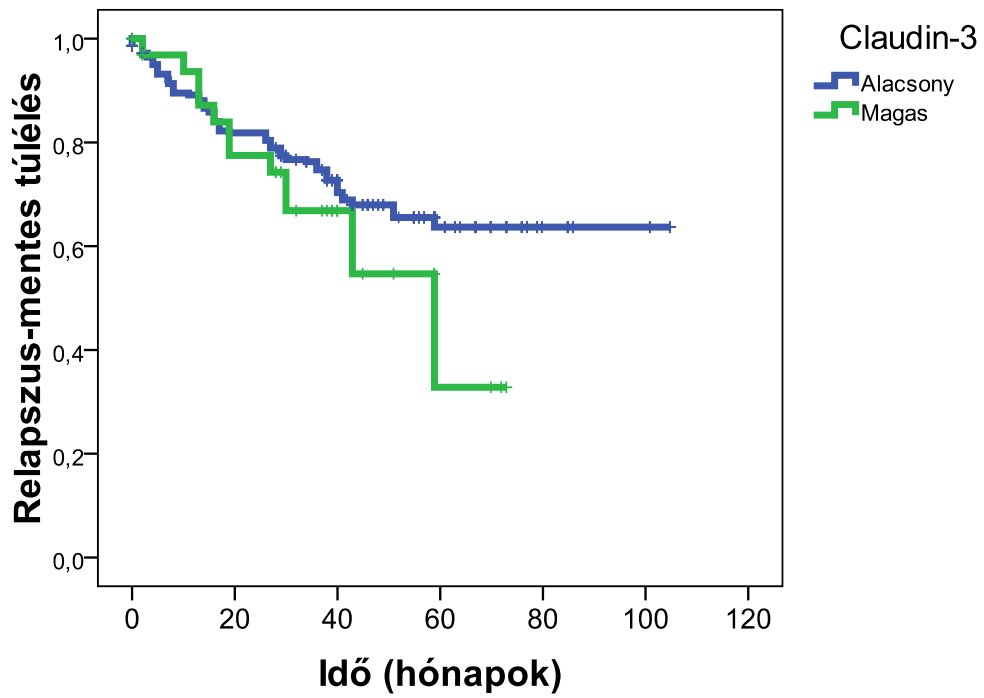
A 249 tumorban elemeztük a claudin-1, -2, -3, -4, -5, -7 és E-cadherin fehérjeszintű kifejeződését, és összefüggésüket a relapszus-mentes túléléssel. Az összehasonlításához minden vizsgált változó esetén a median mentén két csoportra osztottuk a betegeket (19/a és b ábra).

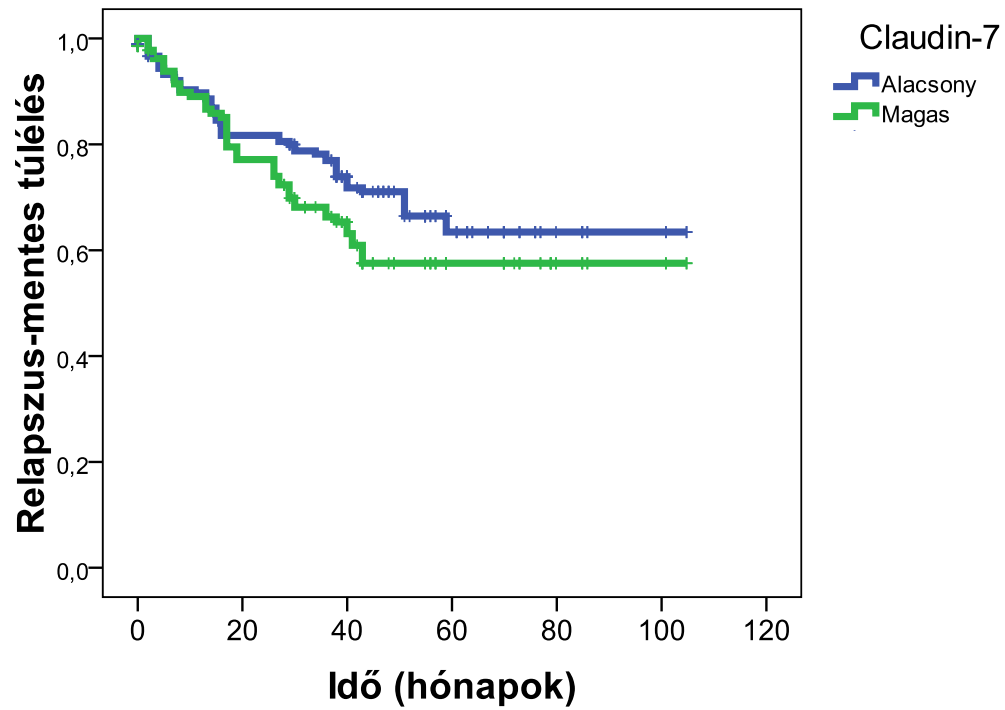
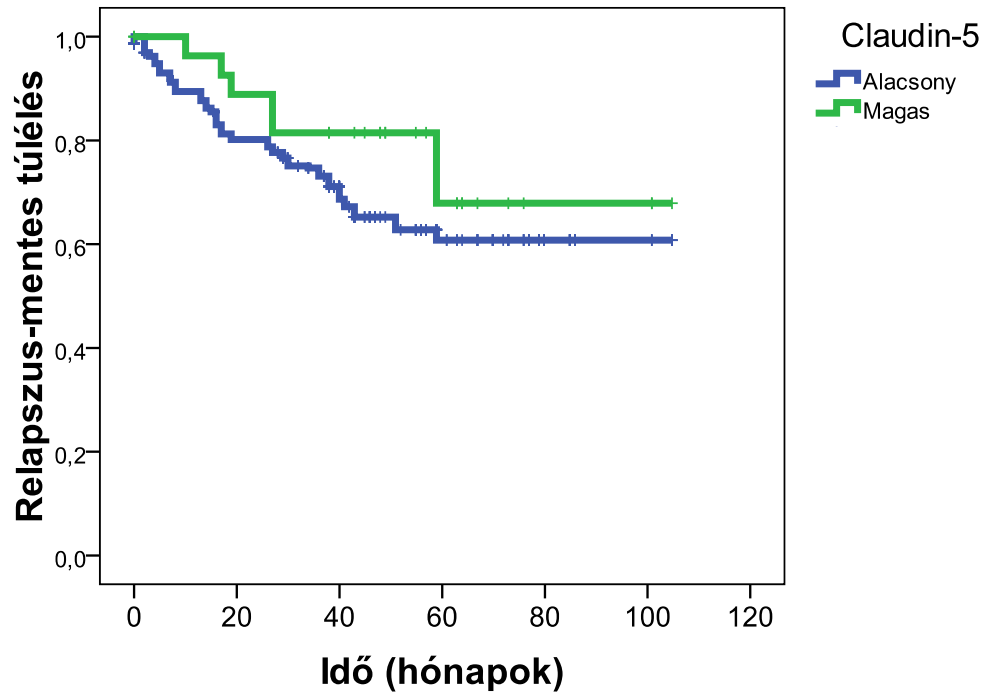
A claudin-2, -4 és E-cadherin tekintetében jelentősen elkülönültek az egyes csoportok ($p = 0.017$, $p = 0.050$, $p = 0.030$). Ezt követően az összes vizsgált sejtkapcsoló molekula score-ját összeadva (claudin-1, -2, -3, -4, -5, -7 és E-cadherin), az abból kalkulált (sejt)kapcsolati (KK2) index segítségével osztottuk fel a betegeket (20. ábra). Szignifikáns különbség adódott a túlélés előrejelzésében a median mentén osztott két csoport között ($p = 0.006$). Majd a legjobban működő proteinekre szűkítettük a marker profilt egy szimpla sejtkapcsolati indexet (SS2) létrehozva (21. ábra). A claudin-2, -4 és E-cadherin együtteséből létrejött SS2-index is hasonlóan el tudta különíteni a jó és rossz prognózisú csoportot ($p = 0.007$).

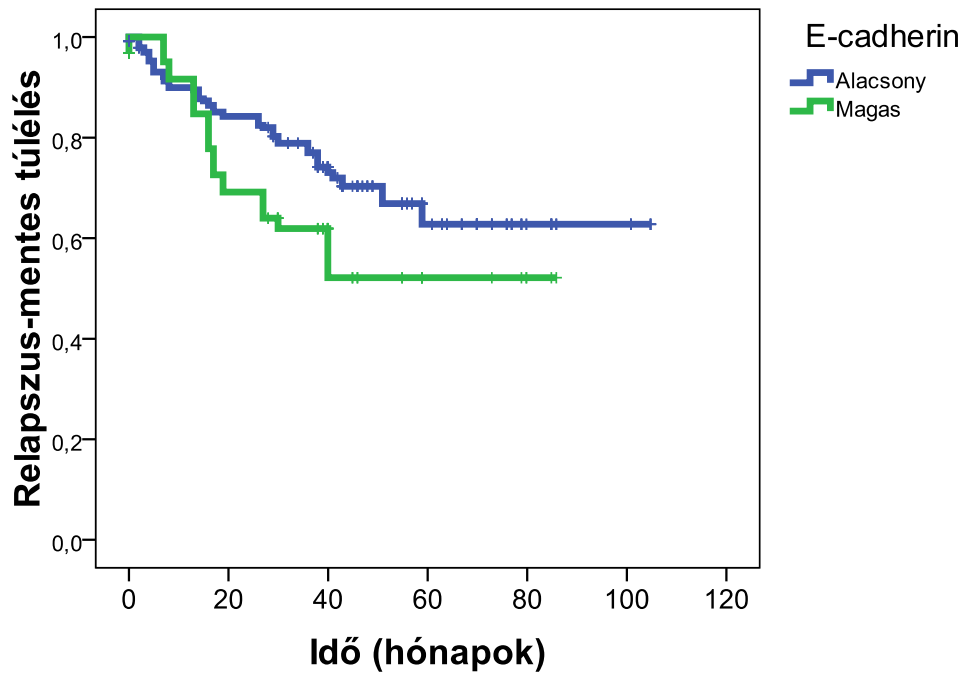
A bioinformatikai elemzés során kapott SS1 profil és a saját anyagunkon elvégzett immunhisztokémiai vizsgálat által eredményezett SS2 index alkotó elemeinek átfedéséből kialakítható a claudin-4 és E-cadherin együtteséből álló claudin-cadherin (CC) index (22. ábra): magas CC index rosszabb prognózissal jár együtt, ezen esetben mindkét alkotója emelkedett expressziót mutat. A CC index a tréning kohortban képes elkülöníteni a tumorokat prognózisuknak megfelelően ($p = 0.020$).

19/a. ábra. A Claudin-1, -2, -3, -4, -5 és -7 proteinek által önmagukban hordozott információ a relapszus-mentes túlélés tekintetében. Kék: alacsonyan fejeződik ki; zöld: magasan expresszálódik (53-55. oldalak). →

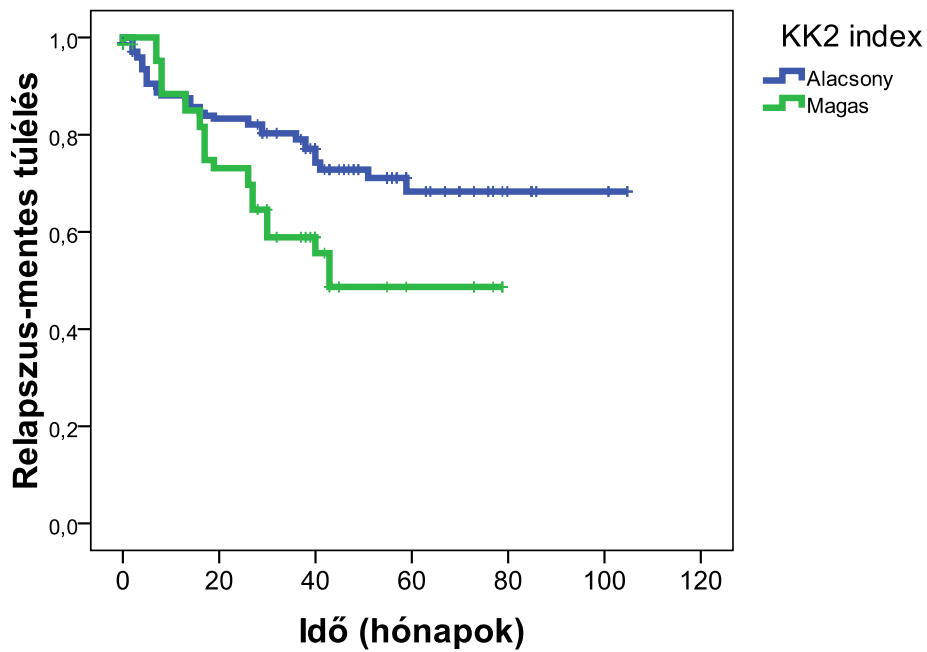




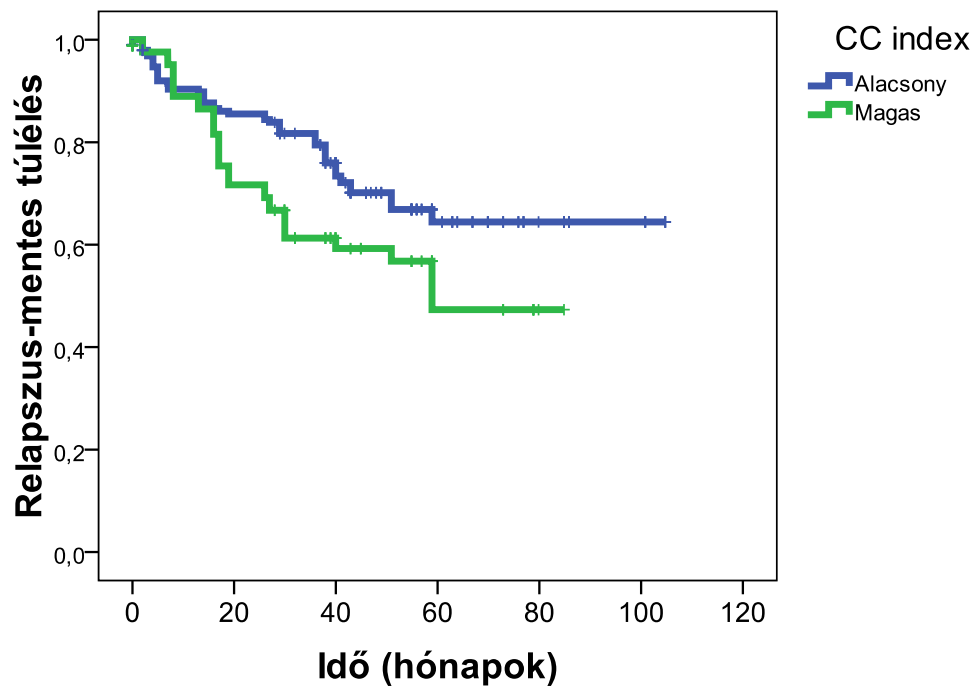
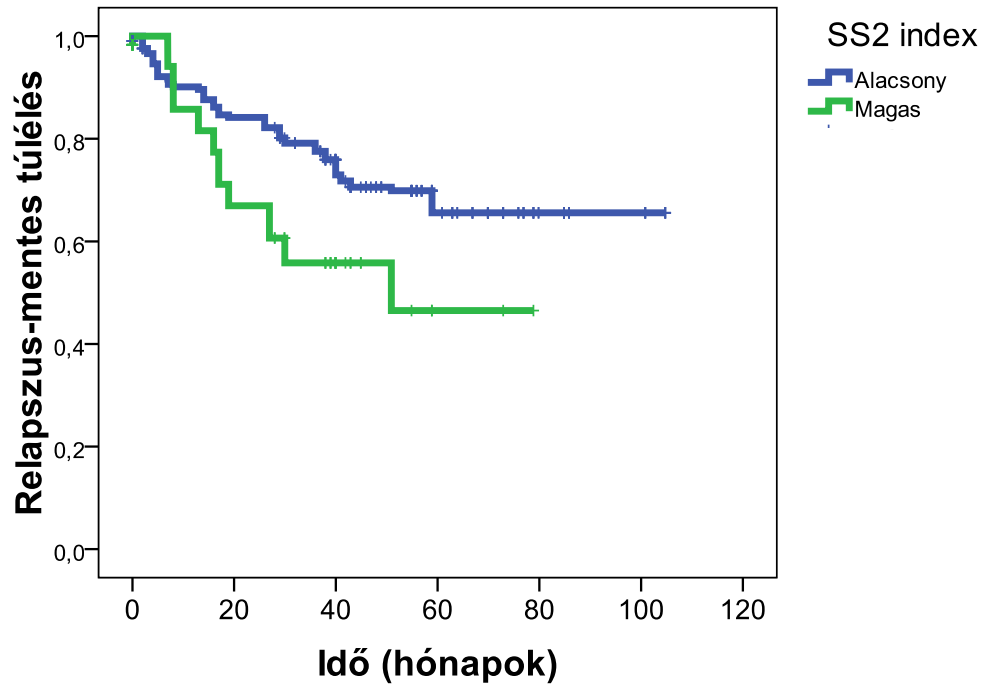




19/b. ábra. Az E-cadherin által önmagában hordozott információ a relapszus-mentes túlélés tekintetében. Kék: alacsonyan fejeződik ki; zöld: magasan expresszálódik.



20. ábra. A komplex (sejt)kapcsolati (KK2) index által hordozott információ a relapszus-mentes túlélés tekintetében.

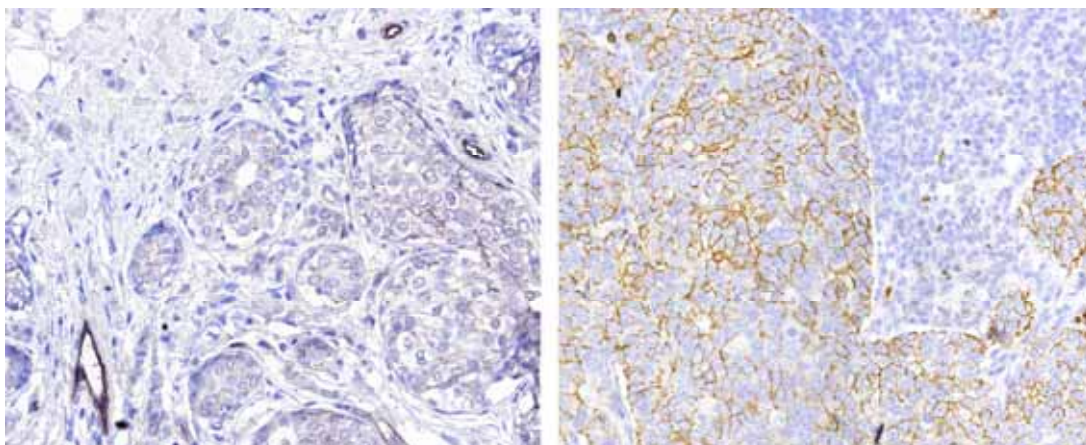


21. és 22. ábra. A szimpla sejtkapcsolati (SS2) index (felül) és a CC index által (alul) hordozott információ a relapszus-mentes túlélés tekintetében.

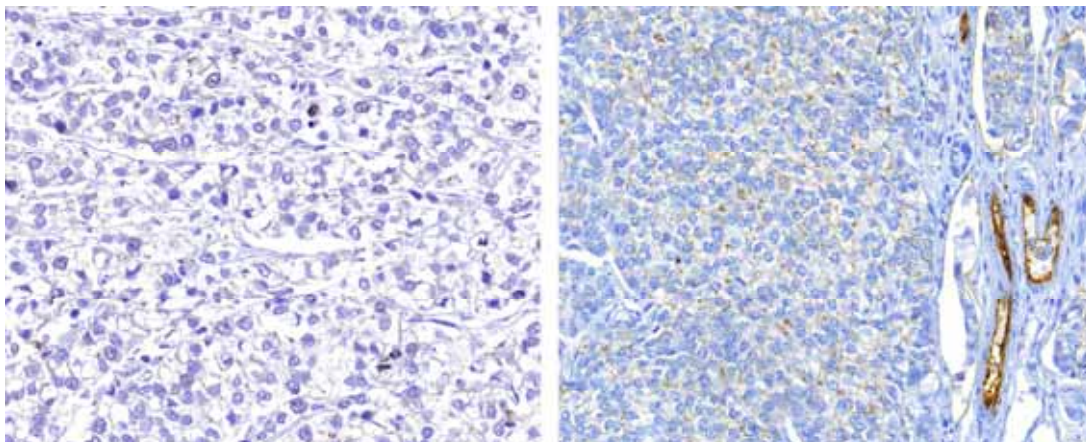
4.5. Nyirokcsomó áttétek claudin-kifejeződése és az általuk hordozott prognosztikus információ

97 esetben meg tudtuk vizsgálni a nyirokcsomó-áttétek claudin-1, -2, -3, -4, -5, -7 és E-cadherin kifejeződését is.

A ductalis carcinomák regionális nyirokcsomó áttétjeiben található tumorsejtek a claudin-3, -4, -5 és -7 tekintetében jelentősen eltérő expressziót mutattak a primer tumorokhoz képest ($p = 0.017$, $p = 0.026$, $p = 0.003$, $p = 0.004$): a claudin-3, -4 és -7 csökkent (8. ábra a 33. oldalon), a claudin-5 emelkedett (23/a. ábra). A lobularis carcinomák metasztázist tartalmazó regionális nyirokcsomóiban levő daganatsejtekben a primer tumorsejt populációhoz képest a claudin-1, -3, -4, -5 és -7 expressziója volt szignifikánsan eltérő ($p = 0.001$, $p = 0.025$, $p = 0.001$, $p = 0.034$, $p = 0.001$): a claudin-5 fokozott (23/b. ábra), a többi csökkent expressziót mutatott (8. ábra a 33. oldalon) (138, 139).

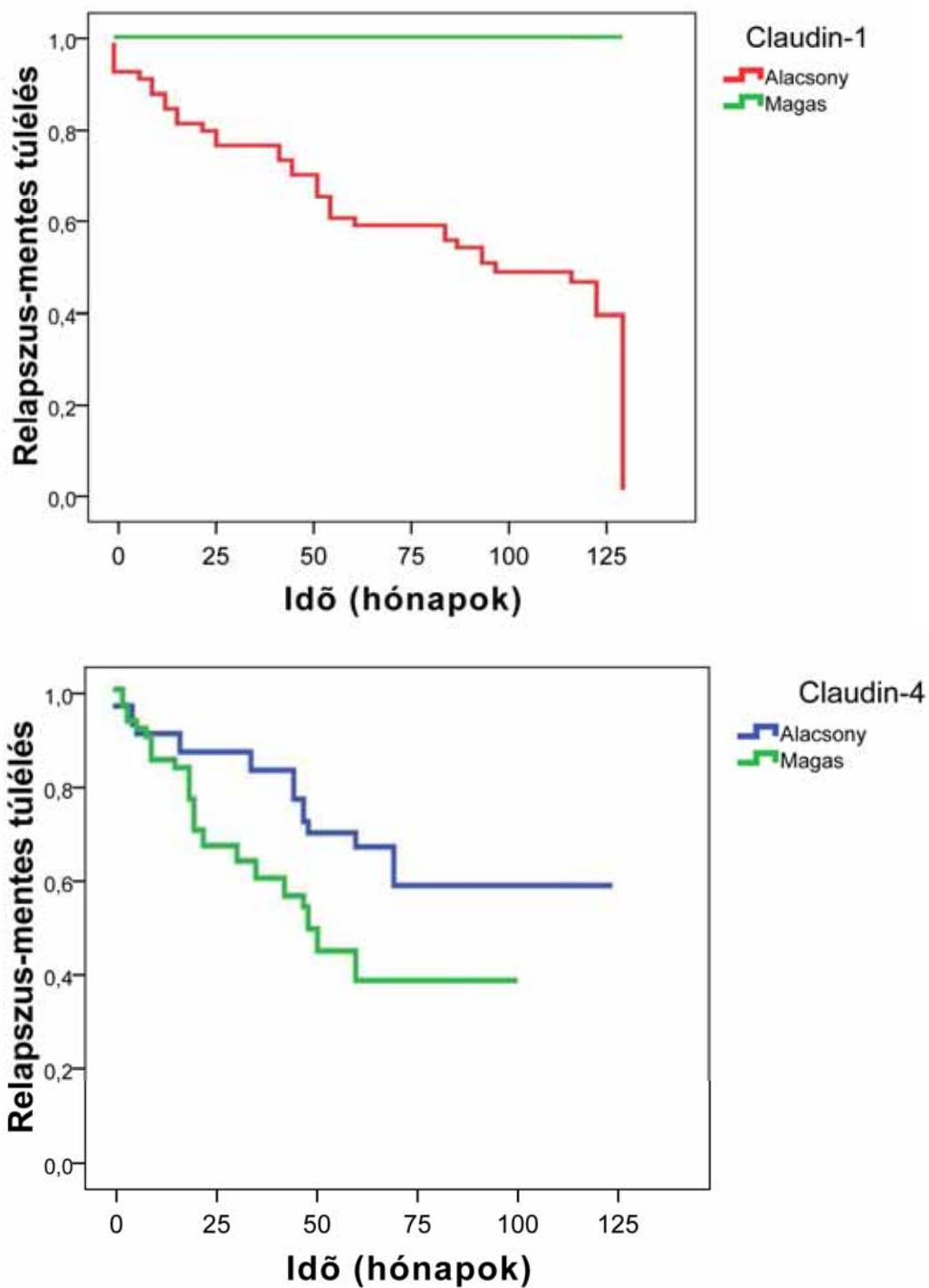


23/a. ábra. Claudin-5 kifejeződése primer ductalis emlőcarcinomában (bal) és ductalis carcinoma nyirokcsomó-áttétjében (jobb). A claudin-5 jellegzetesen erős, specifikus reakciót adott az erekben is.



23/b. ábra. Claudin-5 kifejeződése primer lobularis emlőcarcinomában (bal) és lobularis carcinoma nyirokcsomó-áttétjében (jobb). Az ér endothelt az immunhisztokémiai vizsgálat belső kontrolljaként alkalmazhattuk.

A következőkben a nyirokcsomó áttétekben látott tumorsejtek expressziós profilja alapján meghatározható prognosztikus információk elemzését végeztük el (143). A claudin-1 és claudin-4 tekintetében találtunk jelentős előrejelző potenciált (138). Önmagában a claudin-1 expressziójának csökkenése, illetve önmagában a claudin-4 kifejeződésének emelkedése rossz prognosztikus jelnek bizonyult ($p = 0.036$, $p = 0.045$) (24. és 25. ábra).

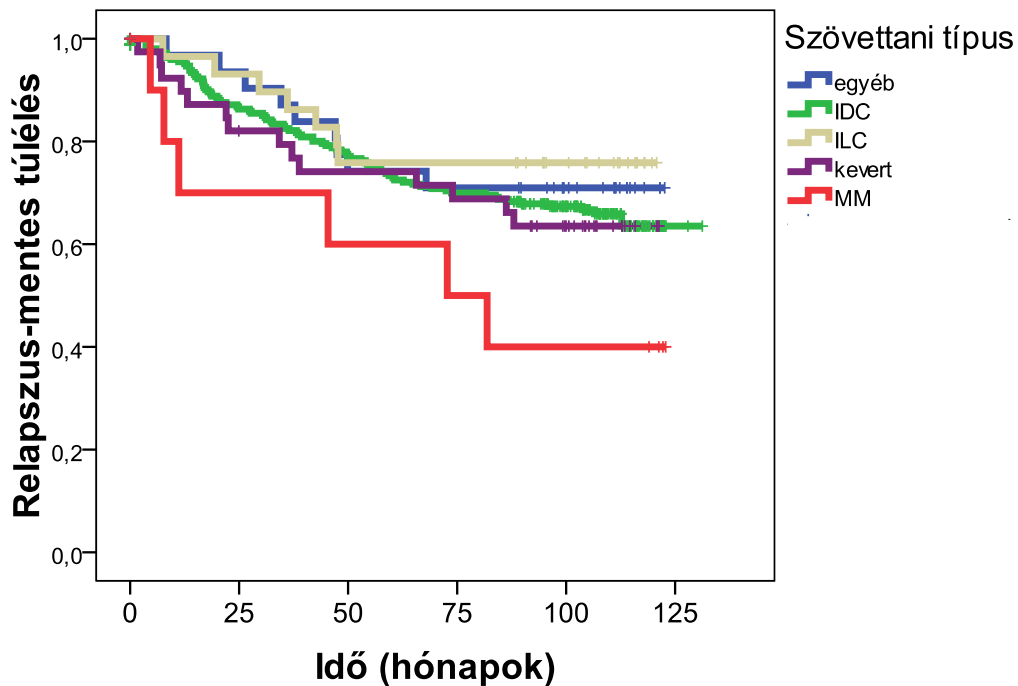


24. és 25. ábra. Claudin-1 (felül) és -4 (alul) nyirokcsomó-áttétben való kifejeződése, és prognosztikus csoportjai a median érték mentén felezve.

4.6. *A rutin diagnosztikus munka során figyelembe vett paraméterek előrejelző képessége a „validációs” kohortban*

A 387 fős validációs csoportban elsőként a patológiai paraméterek által hordozott prognosztikus információk elemzését végeztük el, majd ezt folytattuk a claudinok kifejeződési mintázatának elemzésével. Ennek során a relapszus-mentes túlélés előrejelzésére való képesség leírásával teszteltük az egyes faktorok erősségét.

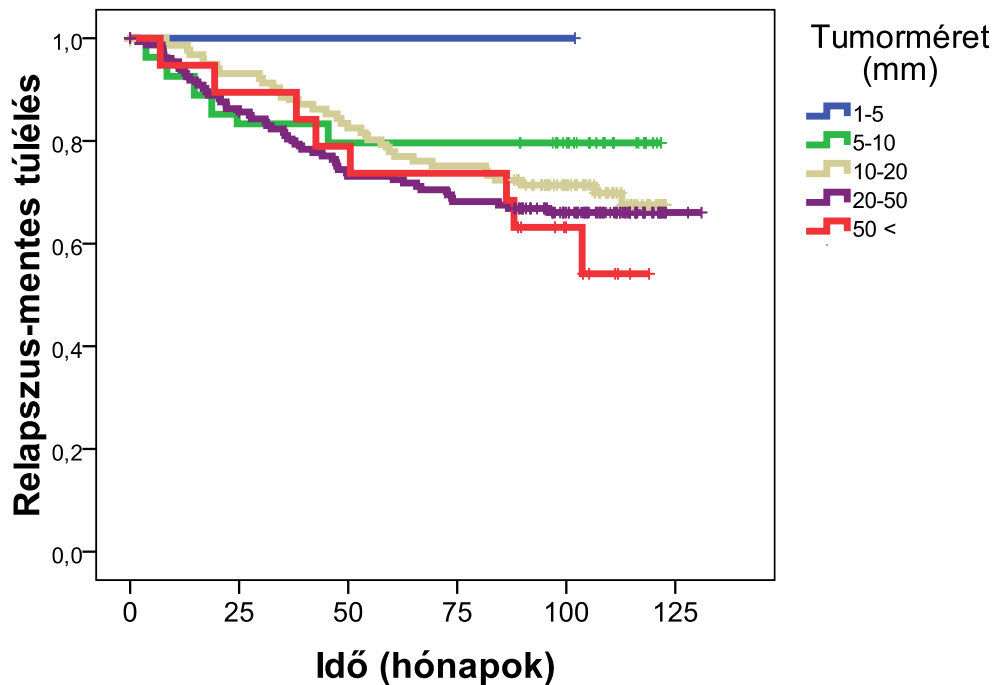
A szövettani típusok összehasonlító vizsgálata során a legjobb kimenetelű csoportba kerültek a tubularis-, mucinosus-, apocrin- és papillaris carcinomák (egyéb kategóriába sorolva). Ezeket követték az invazív lobularis carcinomák (ILC), majd az invazív ductalis carcinomák (IDC). A kevert tumorok csoportjába kerültek az IDC fő komponenset tartalmazó daganatok, amelyeknek shigillocellularis, neuroendocrin, micropapillaris, világossejtes vagy laphám komponensük is volt.



26. ábra. *A morfológiai megjelenés alapján kalkulált prognosztikus információ az összes általunk vizsgált validációs minta tekintetében (n=387).*

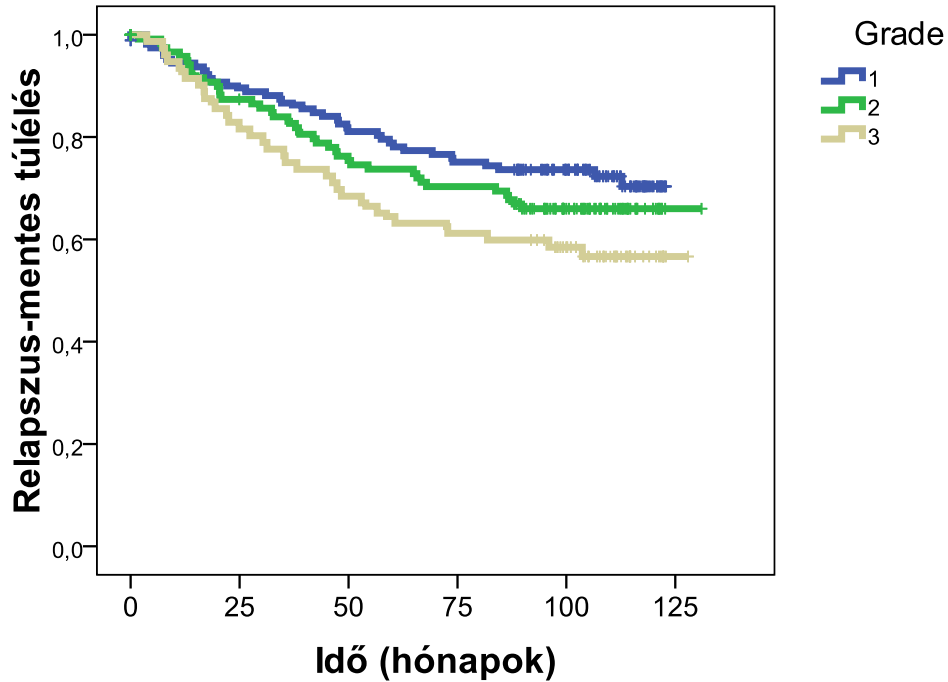
A medullaris jellegű és metaplasticus carcinomák (MM) mutattak legkorábbi relapsust: az egyéb kategóriába eső tumorokhoz és az ILC-khez képest jelentősen rosszabb volt a túlélésük (p /MM-egyéb/ = 0.039, p /MM-ILC/ = 0.042). A továbbiakban is Kaplan-Meier görbével ábrázoltuk a relapszus-mentes túlélést (26. ábra).

A tumorméret tekintetében a milliméterben megadott legnagyobb átmérőket vettük a számítás alapjául. Egy mm alatti tumor nem fordult elő, egyetlen 5 mm-es tumor került a vizsgálatba. A daganatokat mm-ben kifejezett méretük szerint csoportokba osztottuk: 1-5, >5-10, >10-20, >20-50 és 50 feletti. A görbék lefutása ennek megfelelő sorrendben alakult, megállapítható, hogy a tumorméret növekedésével a prognózis egyre rosszabb. (27. ábra). Szignifikáns különbség az 5-10 mm-es csoport és az 50 mm feletti tumorok túlélésében volt ($p = 0.049$).



27. ábra. A relapszus-mentes túlélés alakulása a tumorméret függvényében az összes általunk vizsgált daganat esetében ($n=387$).

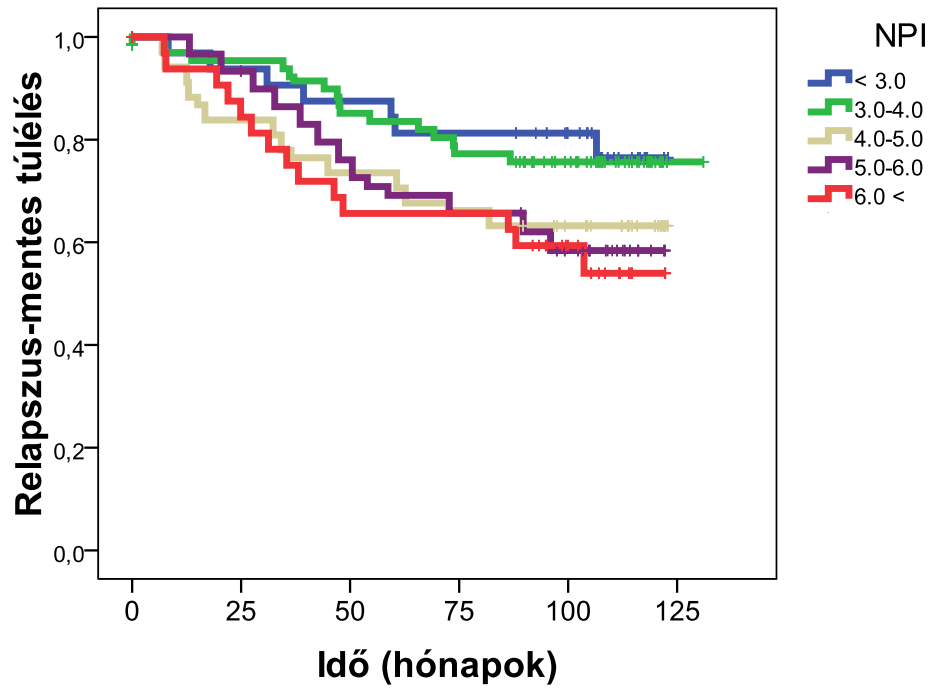
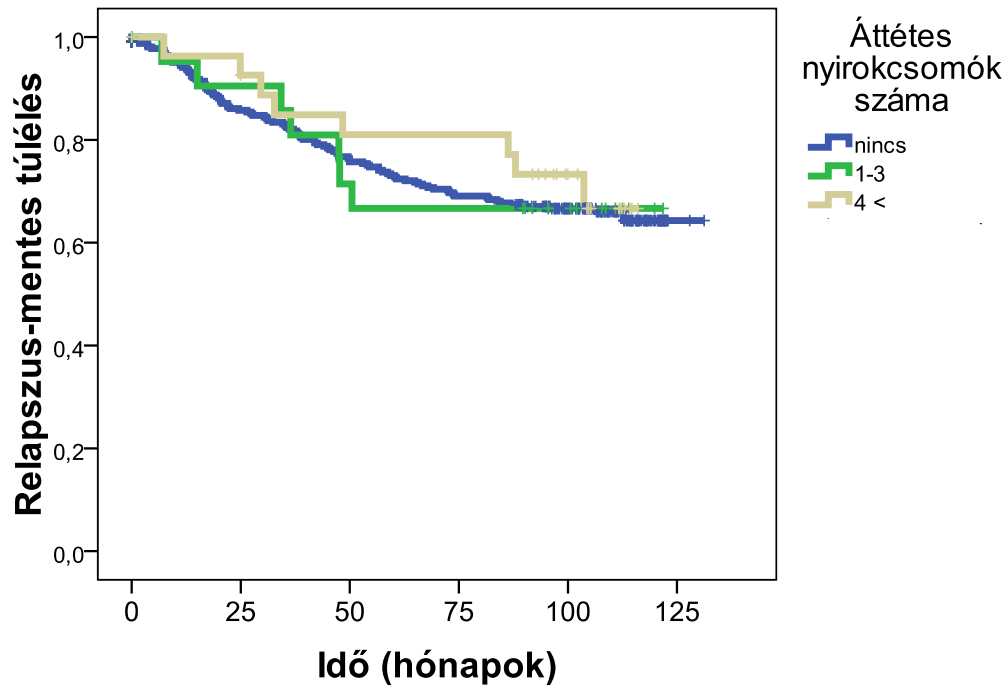
Ezután a szövettani grade függvényében elemeztük a túlélést (28. ábra). 151 grade 1, 145 grade 2 és 91 grade 3 differenciáltságú tumort találtunk a csoportban. Ebben az esetben a grade 1-3 tumorok különültek el jelentősen ($p = 0.001$).



28. ábra. . A relapszus-mentes túlélés alakulása a tumor grade függvényében az összes általunk vizsgált daganat esetében ($n=387$).

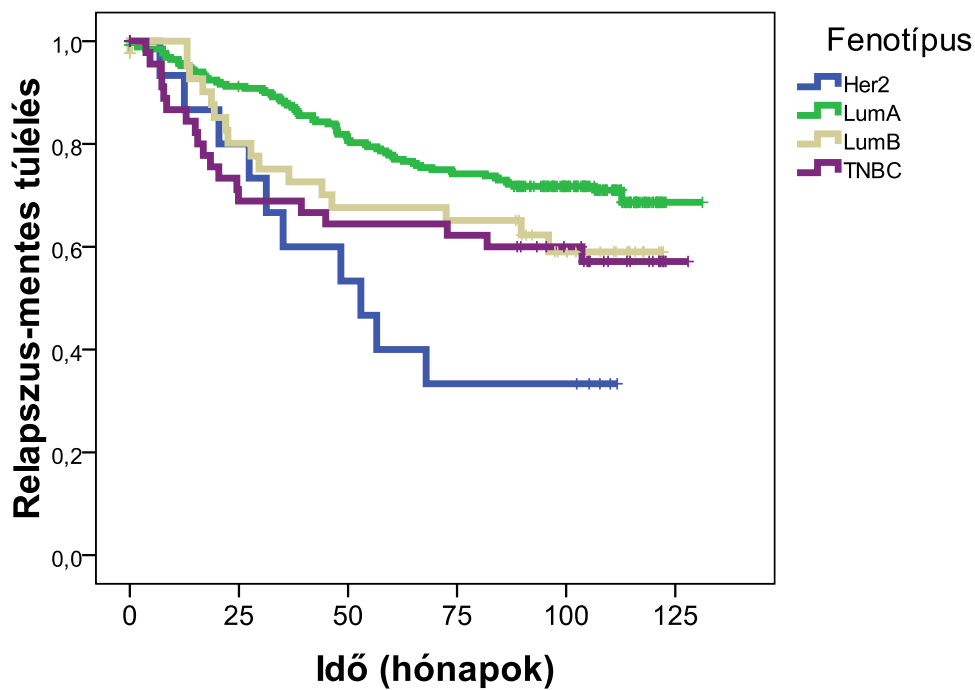
A nyirokcsomóstátusz elemzésekor az áttétes nyirokcsomók számának függvényében ábrázoltuk a relapszus-mentes túlélést (29. ábra), amelyben jelentős különbséget nem találtunk.

A Nottingham Prognosztikus Index (NPI) vizsgálatok az egyes prognosztikus csoportok szignifikánsan elkülönültek (30. ábra): az NPI=4.0 alatti és feletti csoportok relapszus-mentes túlélésében volt a legnagyobb különbség ($p = 0.001$).



29. és 30. ábra. A relapszus-mentes túlélés a nyirokcsomó áttétek (felül) és a Nottingham Prognosztikus Index (alul) függvényében (n=387).

Az immunfenotípus ER, PgR, Her2 és Ki67 immunhisztokémiai vizsgálat eredményén alapuló megállapításakor az alábbi csoportokat kaptuk: 276 luminalis A (71.5%), 43 luminalis B (11.1%), 16 Her2 pozitív (4.1%) és 51 tripla negatív (13.2%). Egy tumort nem tudtunk értékelni. A luminalis A csoport mind a Her2, mind a TNBC daganatoktól élesen elkülönült ($p = 0.001$, $p = 0.041$). A többi alcsoport egymástól statisztikailag jelentősen nem tért el. Az emlődaganat altípusok szerinti túlélési görbéket a 31. ábra mutatja.

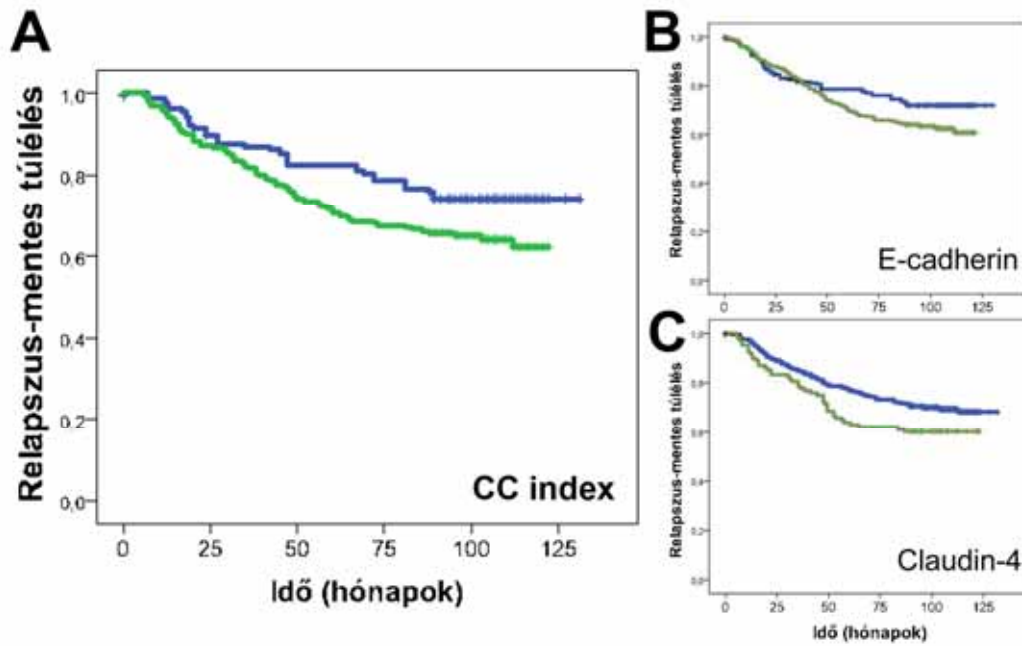


31. ábra. A validációs kohortban található esetek relapszus-mentes túlélése az immunfenotípus függvényében ($n=386$).

4.7. A „CC index” prognosztikus előrejelző képessége a validációs csoportban

Az E-cadherin és claudin-4 (CC index) nagy esetszámú kohortban relapszusmentes túlélést előrejelző képességének vizsgálatával folytattuk az elemzést (144). Vizsgálatunkban jelentősen elkülönült a CC index által meghatározott csoportok túlélése a median érték mentén elválasztva. A claudin-4 és E-cadherin önmagában is képes volt a csoportok szétválasztására, azonban erősségük nőtt a CC index kialakításával (32. és 33. ábra): a CC index erősebb előrejelző képességgel rendelkezett (HR=1.51, 95%CI: 1.04-2.19, $p = 0.029$), mint az alkotó claudin-4 (HR=1.43, 95%CI: 1.02-2.03, $p = 0.038$) és E-cadherin (HR=1.39, 95%CI:1.01-1.90, $p = 0.039$) önmagában.

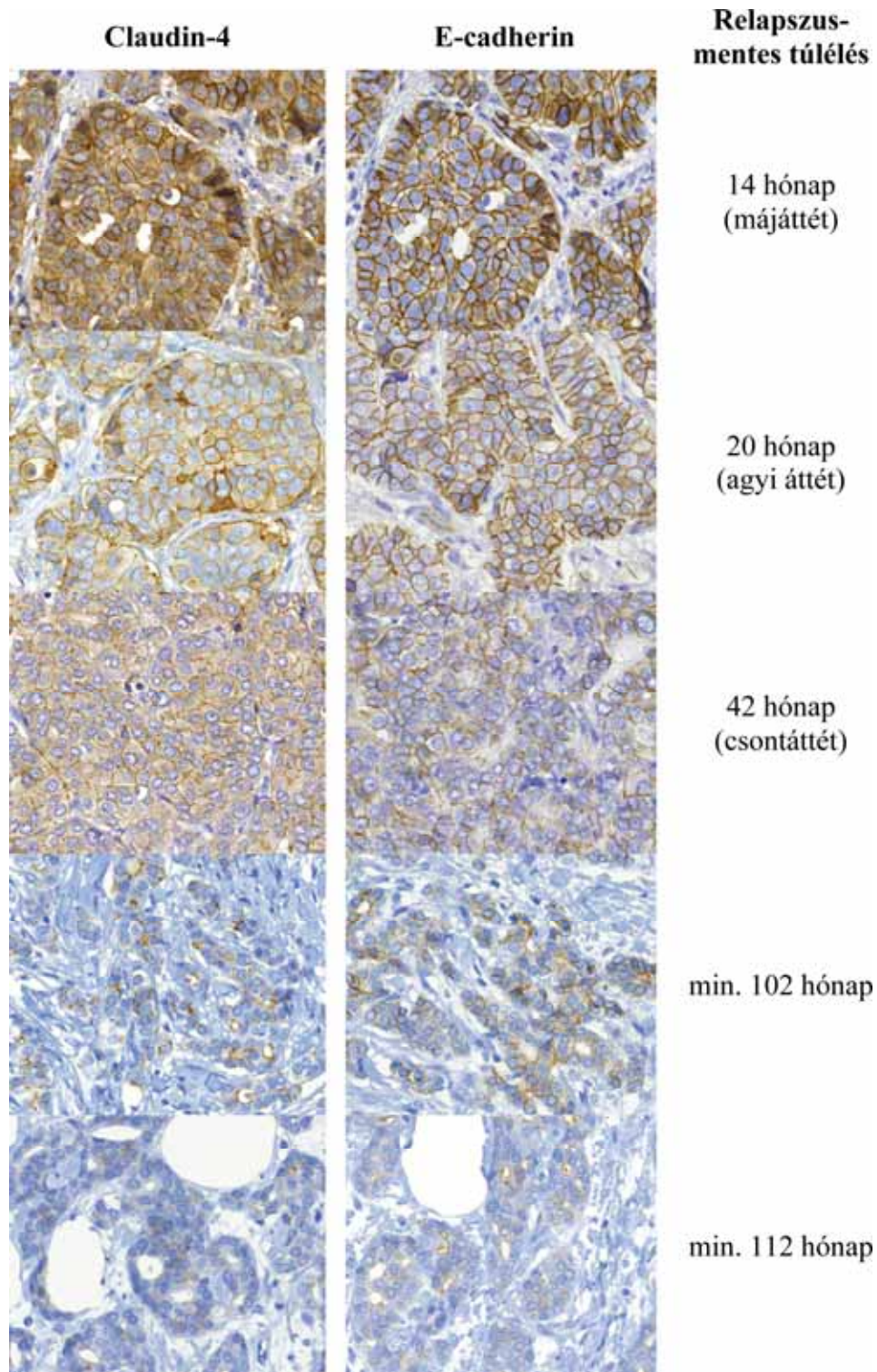
Cox multivariáns regressziós analízist végeztünk, hogy felmérjük az index szerepét a többi faktoral szemben. Ennek során a grade, éretörés, necrosis, áttétes nyirokcsomók száma és immunfenotípus beosztásával szemben teszteltük a CC indexet miután függetlenségi vizsgálatot végeztünk (contingencia táblázat). A CC index a tumormérettel ($p = 0.040$), a szövettani típussal ($p = 0.001$) és a NPI-vel ($p = 0.004$) mutatott az előzetes tesztben összefüggést. Így ezeket a multivariáns tesztből kivettük. A vizsgálat szerint a CC index az immunfenotípus és az éretörés mellett megállta a helyét ebben az összehasonlításban (11. táblázat).



32. ábra. A CC index (A), E-cadherin (B) és claudin-4 (C) által meghatározott csoportok relapszus-mentes túlélése a validációs csoportban (n=387).

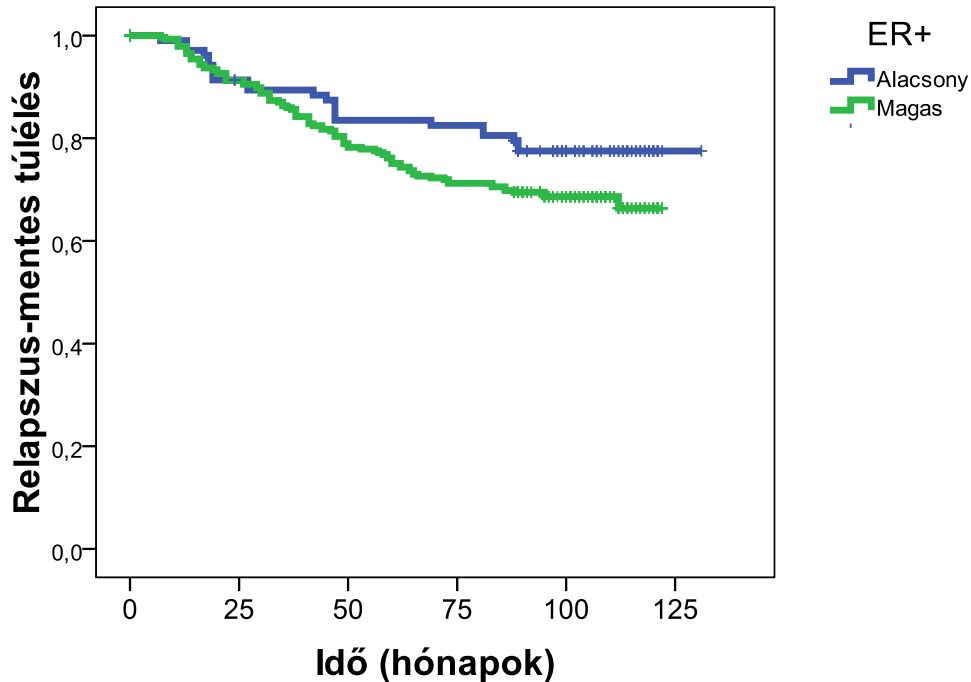
11. táblázat. A Cox regressziós multivariáns analízis eredményei a különböző faktorok között.

Paraméter	p	HR	95%CI	
			Alsó	Felső
CC index	0.040	1.503	1.02	2.216
Immunfenotípus	0.001	1.064	0.59	1.918
Érbetörés	0.011	0.704	0.31	1.808
Nyirokcsomó-áttétek száma	0.091	0.791	0.6	1.038
Grade	0.767	1.037	0.82	1.32
Necrosis	0.232	2.233	0.72	8.435



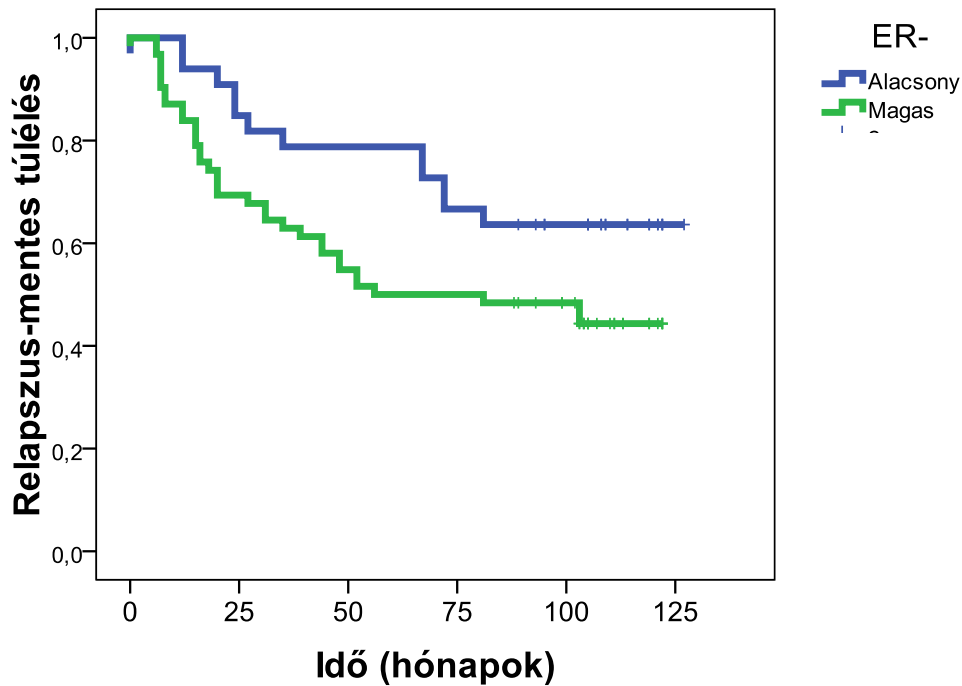
33. ábra. Claudin-4 és E-cadherin kifejeződése immunhisztokémiai reakciókkal, és az adott betegek relapsusra vonatkozó követési adatai (Mirax Midi scan, 40x nagyítás).

A daganatokat az altípusok szempontjából is megvizsgáltuk (144). Az ER+ és ER- tumorok között elkülönültek a prognosztikus alcsoportok (34. és 35. ábra), de egyik esetben sem volt az eredmény statisztikailag szignifikáns ($p = 0.074$, $p = 0.059$), ezért az egyes kategóriákat tovább bontottuk.



34. ábra. A CC index által meghatározott csoportok relapszus-mentes túlélése az ER+ csoportban ($n=319$).

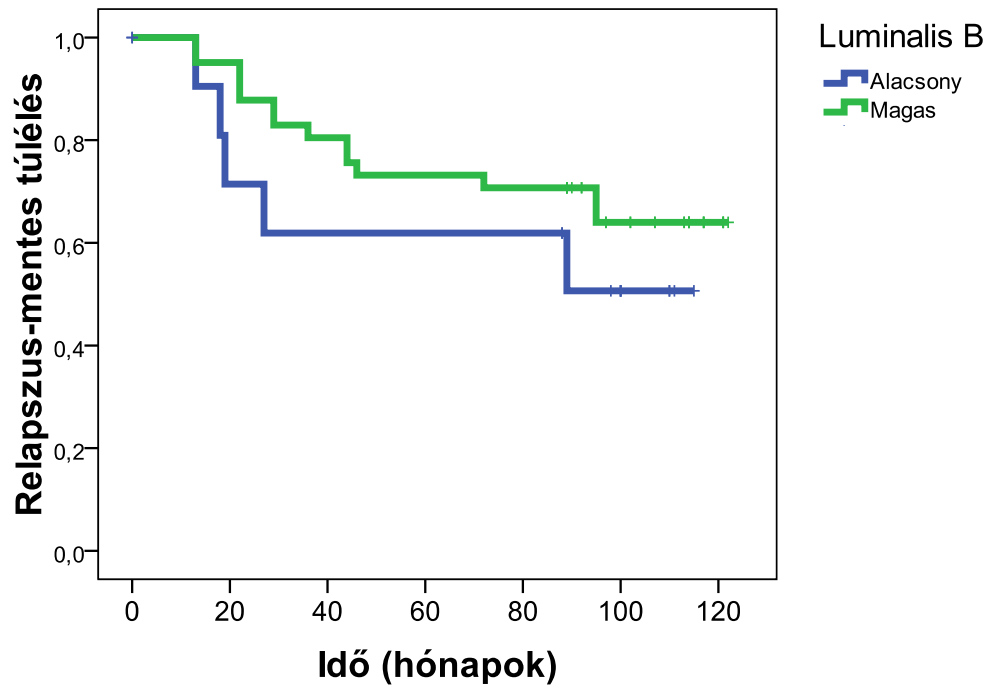
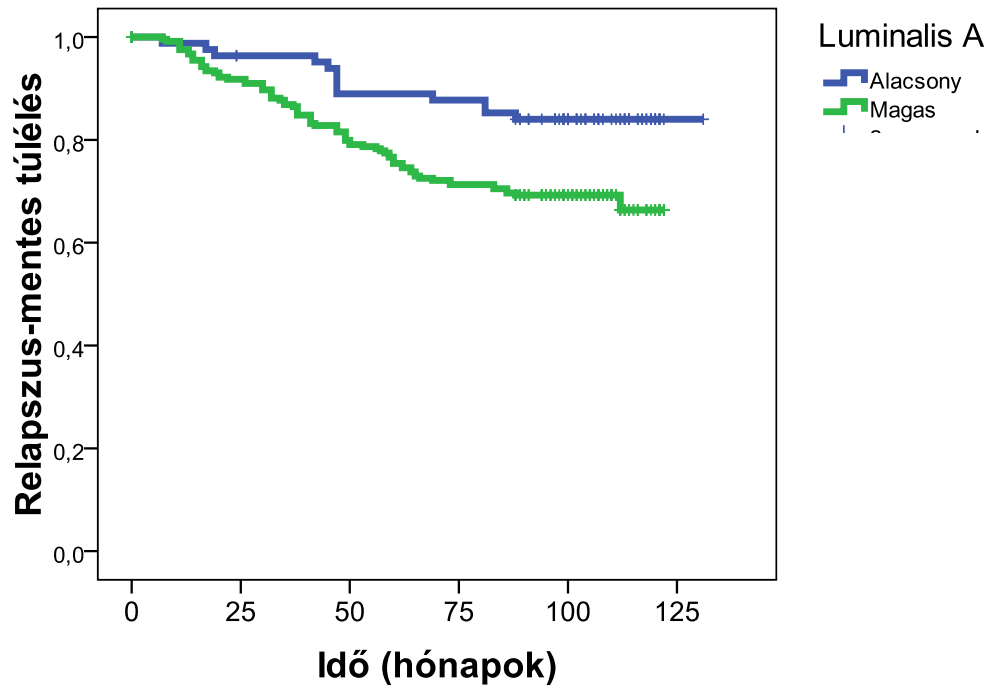
Az ER+ tumorok immunhisztokémiai phenotípusainak megfelelő luminalis A és B csoportok elemzésekor a luminalis A csoportban működött a CC index előrejelző képessége ($p = 0.006$), míg a luminalis B csoportban az index szerinti alacsonyabb kifejezési szinttel bíró esetek kerültek a rosszabb prognózisú csoportba, a magasabb expressziót mutatóak pedig a jobb kimenetelű csoportba. Az eredmény tendenciát mutatott, azonban nem volt szignifikáns (36. és 37. ábra). A luminalis grade 2-es csoporton belül szintén elkülönült egy jobb és egy rosszabb prognózisú csoport ($p = 0.048$).



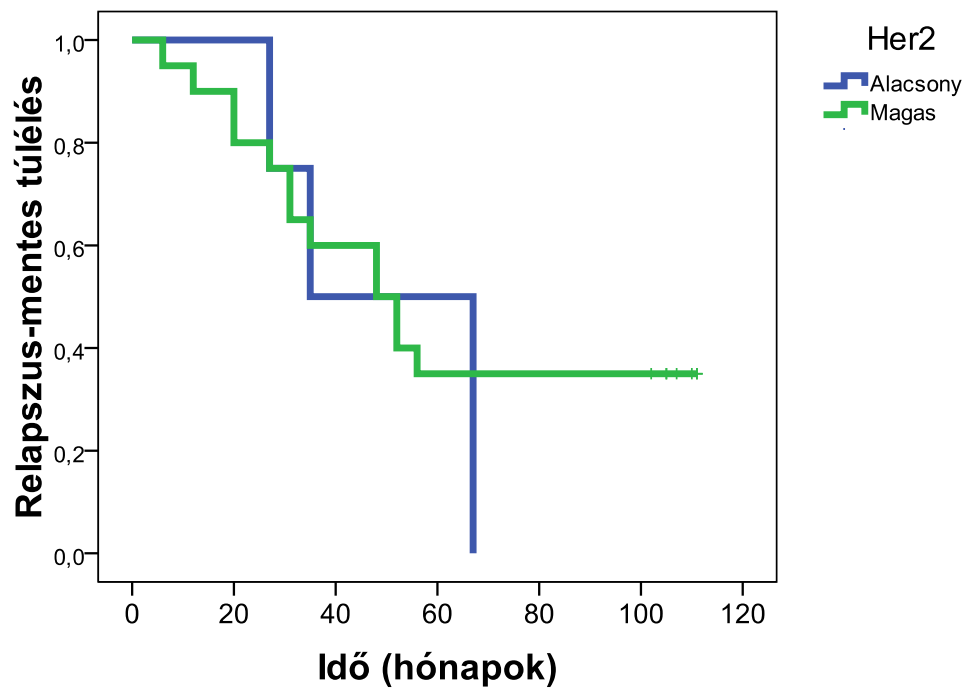
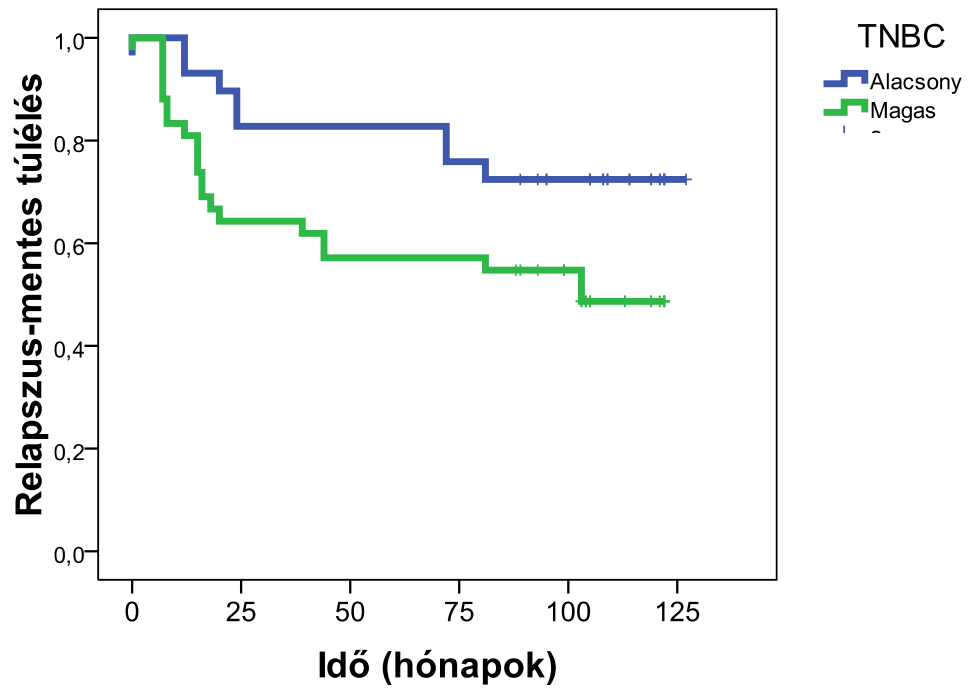
35. ábra. A CC index által meghatározott csoportok relapszus-mentes túlélése az ER-csoportban ($n=67$).

Az ER- tumorok esetében a CC index prognosztikus előrejelző képessége éppen szignifikánsnak adódott a tripla-negatív alcsoportban ($p = 0.047$), míg a Her2 pozitív daganatok esetében nem nyújtott érdemben információt ($p = 0.547$) (38. és 39. ábra).

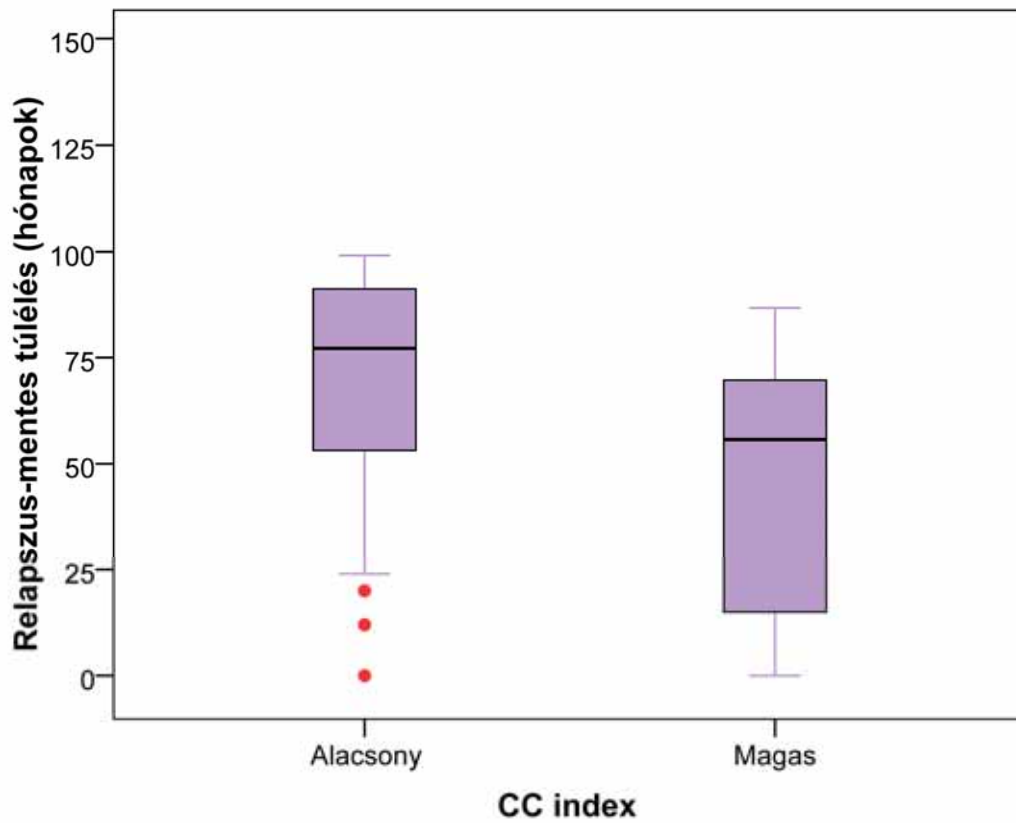
A várakozásokkal ellentétben az alacsony CC index a tripla negatív daganatokban is a jobb prognózist jelezte, ezért a tumorokat közelebbi vizsgálatnak vetettük alá: box-plot diagrammon ábrázoltuk a relapszus-mentes túlélés és a CC index viszonyát azon daganatos betegeknél, akiknél valamilyen relapszus előfordult (40. ábra). A grafikonon látható, hogy létezik egy néhány esetből álló “outlier” csoport, amelyekben a CC index alacsony, és relapszus-mentes túlélésük rövid, az azonos csoportba sorolható daganatoktól láthatóan eltérnek.



36. és 37. ábra. A CC index által meghatározott csoportok relapszus-mentes túlélése a luminalis A csoportban (felül) és luminalis B csoportokban (alul).



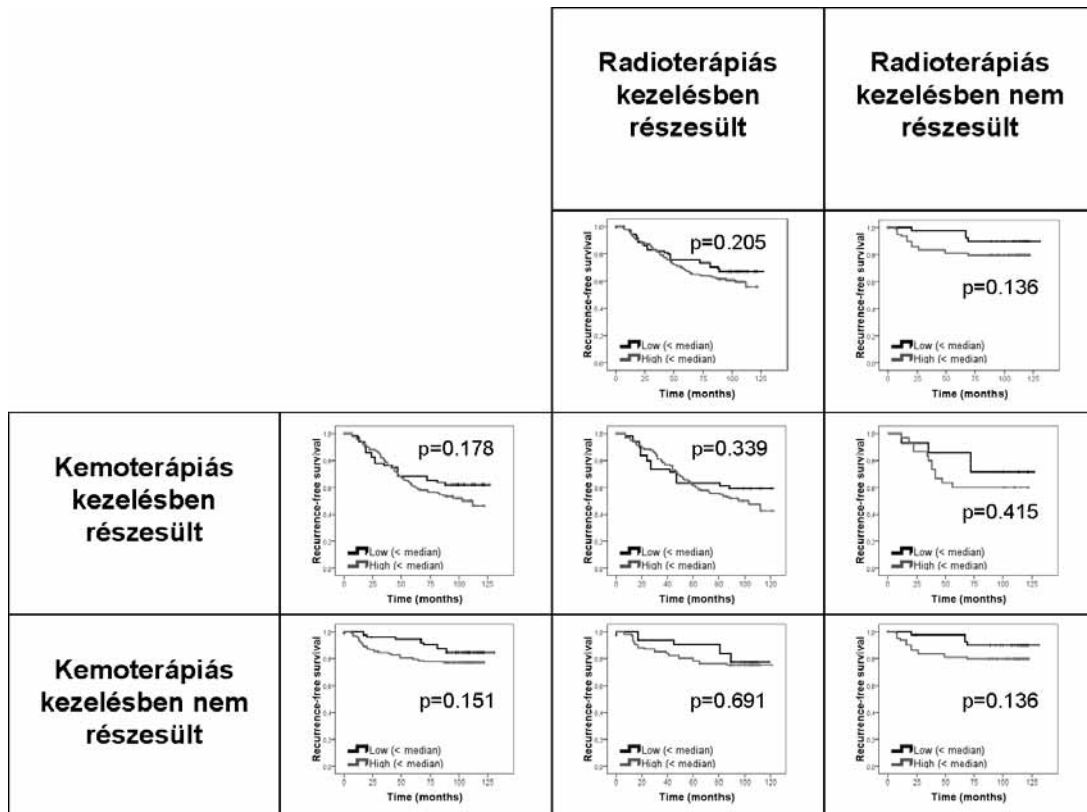
38. és 39. ábra. A CC index által meghatározott csoportok relapszus-mentes túlélése a tripla negatív (felül) és a Her2 (alul) csoportokban.



40. ábra. Tripla negatív emlődaganatos esetek ($n = 37$) a relapszus-mentes túlélése: A CC indexet tekintve „alacsony” csoportban is megtalálhatóak a rövid relapszus-mentes túlélésű betegek daganatai (piros), amelyek a csoportjuk átlagához képest eltérően viselkednek.

4.8. A CC index prognosztikus szerepe a különböző terápiás csoportokban

A következő lépésben a rendelkezésre álló kezelési adatok fényében vizsgáltuk a CC indexet. Sem a kemoterápiás kezelés (Pearson χ^2 -teszt: 0.822, $p=0.191$), sem a besugárzás (Pearson χ^2 -teszt: 5.124, $p=0.346$) nem mutatott összefüggést a CC index-szel. További lépésben a különböző kezelésben részesült csoportokban külön elemeztük az index prognosztikus előrejelző képességét (41. ábra): adjuváns kezelésben nem részesült betegek, és chemo-, illetve radioterápiás kezelés utáni, valamint ezek kombinációival kezelt nők túlélését vizsgáltuk. A csoportok a korábbi trendnek megfelelően viselkedtek, azonban a különbségek nem voltak szignifikánsak az egyes prognosztikus alcsoportok között.



41. ábra. Kaplan-Meier görbék a különböző adjuváns kezelésben részesült alcsoportokban (fekete, alacsony CC index kifejeződés; szürke, magas CC index; a p értékek a log-rank teszt eredményét mutatják).

5. MEGBESZÉLÉS

A 13 adatbázis letöltése után az általunk vizsgálni kívánt claudinok és E-cadherin kifejeződését elemeztük 1809 betegben. 1593 betegnél relapszus-mentes túlélés, 594 betegnél teljes túlélés, 767 betegnél távoli áttét mentes túlélési adatokkal számolhattunk (133).

Rövidtávú túlélést a vizsgált gének nagyobb része volt képes előre jelezni, míg a későbbi túlélésre már csak a claudin-3, -4, -5, -7 és E-cadherin tudott prognózist becsülni. Az összes gén által (CLDN1, CLDN3, CLDN4, CLDN5, CLDN7, CLDN8, CLDN10, CLDN15, CLDN18, CDH1) alkotott komplex (sejt)kapcsolati (KK1) profil erősebb prognosztikus erővel bírt. Azonban a legjobban működő, és egy időben a legjobb minőségű próbákból álló kombináció (SS1 prognosztikus profil) volt az, amely még ennél is jobban szerepelt: CLDN3, CLDN4, CLDN7, CDH1. Nem lehet véletlen, hogy a Perou munkacsoport több tagja is e gének alapján tudta elkülöníteni a claudin-low alcsoportot a többi emlődaganatos beteg tumorától (28, 105, 145, 146).

Az SS1 mintázat ER+ daganatokban képes volt előre jelezni a távoli áttét kialakulását, és még erősebben jelezte a kimenetelt a nyirokcsomó áttéttel nem rendelkező (ER+, LN-) alcsoportban. A közepesen differenciált, grade 2 ER+ tumorok esetében képes volt a relapszus-mentes túlélés tekintetében is 2 csoportot elkülöníteni. Ezzel olyan tesztekhez hasonló eredményt nyújt, amelyek a közepes differenciáltságú tumorokat igyekeznek jobb és rosszabb prognózisú csoportokra osztani (34, 123, 147). Az ER- daganatok esetében is működött az SS1 profil: képes volt a relapszus-mentes túlélés előrejelzésére, és a távoli áttétől mentes túlélést is valamelyest jelezte. Hasonlóan teljesített az ER-, LN- alcsoportban. Bár az ER- daganatok alacsony esetszáma miatt az elemzés nem volt kivitelezhető az ER-, LN+ betegekben, az immunhisztokémiai minták elemzése szerint ebben a betegcsoportban is ugyanolyan jól működik a profil; a szöveti tréning csoportban mesterségesen dúsítottuk a műtét időpontjában nyirokcsomó- és későbbiekben távoli áttéttel rendelkező tumorokat a nem recidiváló kontrollokkal szemben annak érdekében, hogy a túlélési vizsgálatokhoz kellően markáns végpontokat állapíthassunk meg. Munkacsoportunk korábbi eredményei szerint nem volt különbség a pT1pN0 és pT1pN1 stádiumú daganatok claudin mintázata között a claudin-1,-2,-3,-4 és -

7 kifejeződés tekintetében (103), de ebben a tanulmányban nem történt alcsoport elemzés, és viszonylag kevés eset vizsgálatára volt lehetőség.

A bioinformatikai elemzéssel párhuzamosan immunhisztokémiai vizsgálatokat végeztünk a szöveti mintáink tréning szett részén. A 249 fős tréning csoportban a relapszus-mentes túlélés előrejelzésére való képesség leírásával teszteltük a szövettani típus, a grade és az immunfenotípus csoportok által hordozott prognosztikus információkat, amelyek az irodalmi adatokkal megegyeztek (27, 35, 51, 62, 63, 148-153). Felmérésünkben kezelési adatok nem álltak rendelkezésre, ezt a nagy esetszámmal kívántuk ellensúlyozni. A fokozott Her2-kifejeződést mutató daganatos betegek túlnyomó többsége a 2000. év előtti időszakról származik, így trastuzumab kezelést valószínűleg nem kaptak.

Ezt követően a tréning csoportban immunhisztokémiai reakciókkal vizsgáltuk a claudin-1, -2, -3, -4, -5, -7 és E-cadherin kifejeződést. A ductalis carcinomák esetében a claudin-1 csökkent, a claudin-4 és -7 emelkedett. A lobularis carcinomák vizsgálata során a claudin-1, -5 és E-cadherin csökkent, a claudin-4 és -7 emelkedett. Ezek korábbi vizsgálatainkkal és a nemzetközi irodalmi adatokkal megegyező tendenciát mutatnak (79, 101, 102, 106, 154). Az ILC-s betegekben 29,7 %-ban volt látható igen alacsony szintű E-cadherin kifejeződés. Az irodalmi adatok szerint 46-100%-ban csökkent vagy eltűnt az E-cadherin kifejeződés lobularis emlőcarcinomákban (14-18). A szövettani grade tekintetében megfigyelhető volt a claudin-1 és -2 csökkenése és a claudin-4 emelkedése a szöveti differenciáció csökkenésével, eredményeink az e tárgyban ismert irodalmi adatok többségének megfelelően alakultak (102, 106, 108, 140, 155-160). Mindössze két tanulmány eredményei szerint csökken a claudin-7 expresszió a szöveti differenciáció csökkenésével, azonban az egyik aspirációs citológiai mintákat vizsgált (161), a másik pedig 38 DCIS és 31 IDC vizsgálata alapján jutott erre az eredményre - igaz, mind western blot és IHC, mind PCR eljárással ugyanerre a konklúzióra jutott (100). 355 emlődaganatos esetben sikerült megerősíteniük e feltevést (100). Saját vizsgálataink több alkalommal is konzisztens módon a claudin-7 fokozott kifejeződését találták a grade emelkedésével (142, 143).

Közel száz esetben meg tudtuk vizsgálni a nyirokcsomó-áttétek claudin-1, -2, -3, -4, -5, -7 és E-cadherin kifejeződését. A ductalis carcinomák regionális nyirokcsomó metasztázisaiban található tumorsejtek vizsgálatakor a claudin-3, -4 és -7 expresszió

csökkenését, a claudin-5 expresszió emelkedését láttuk. A lobularis carcinomák metasztázist tartalmazó regionális nyirokcsomóiban levő daganatsejtekben a primer tumorsejt populációhoz képest a claudin-1, -3, -4, és -7 expresszió csökkent és a claudin-5 expresszió fokozódott (138, 139). Ezek szerint feltehetően létezik egy olyan sejtpopuláció a daganatokban, amely migrációs képességeit tekintve előnyösebb helyzetben van: claudin-7 kifejeződése csökkent, míg claudin-5 expressziója fokozódott, amely így az irodalmi adatokkal egyezést mutat (100, 160-162). A primer daganatok és áttétek közötti, kismértékű csökkenést az E-cadherin kifejeződésben más tanulmány is megerősítette (163), míg mások jelentősebb mértékű expressziós csökkenésről számoltak be korábban (113).

A nyirokcsomó áttétek claudin-1, valamint claudin-4 expressziójának tekintetében találtunk jelentős prognózist előrejelző potenciált: önmagában a claudin-1 csökkenése, illetve a claudin-4 kifejeződésének emelkedése rossz prognosztikus jelnek bizonyult (138, 143). Vizsgálatunkban az E-cadherin kifejeződése kismértékben csökkent vagy stabil maradt az axillaris nyirokcsomó áttétekben, és nem jelentett prognosztikus információt vizsgált betegeink esetében. Az EMT folyamata során feltételezik, hogy ezeknek a sejtkapcsoló fehérjéknek kifejeződése csökken, így fokozódik a sejtek mobilitása és metasztatizáló képessége. Nem világos azonban, hogy ez a jelenség ok vagy következmény ezekben az esetekben (113). Az EMT alakulásában számos jelátviteli útvonal aktivációja is szerephez jut, és ezeket sejtkultúrás és szöveti vizsgálatokban is megerősítették (120). Azonban az EMT-vel ellentétes folyamatok is ismeretesek már, amelyek ennek teljesen ellentétes irányú tényezőit foglalják magukban: mesenchymalis-epithelialis transitio (MET). Ez a folyamat a normális embrionális fejlődés és a tumorprogresszió során is szerephez jut (164). A claudin-low tumorok vizsgálatakor olyan tulajdonságokat azonosítottak, amelyek mesenchymalis sajátosságokra utalnak (28, 105, 146, 165, 166). Az utóbbi évtizedben az EMT létezését számos vizsgálat támasztotta alá, de *in vivo* szemléltetése nehézségekbe ütközött (117, 167, 168). Feltételezhetjük, hogy az invazív tumorsejtek megváltoztatják phenotípusukat, ami a tumorterjedés során az előnyüket szolgálja. Majd befejezve vándorlásukat, a MET során újra visszanyerik eredeti tulajdonságaikat (esetleg más tulajdonságokkal is felvértezve), amikor távoli áttéteket alakítanak ki. Az egyik ilyen EMT tulajdonság a claudinok kifejezésének elvesztése (105). Feltételezések szerint a “claudin-low” alcsoport(ok)ba tartozó tumorok

ilyen epithelialis-mesenchymalis transziós tulajdonságokat halmozottan hordozó sejtekből állnak, így kifejezetten agresszív viselkedés jellemzi ezeket a daganatokat. (105, 165). A saját eredményeink és a Perou munkacsoport független vizsgálatai alapján a claudin-low emlődaganatok kérdése sokkal bonyolultabb, mely szerint a claudinok alacsonyabb kifejeződése az egyes altípusokban ellentétes jelentőséggel bír (143, 169). A daganatok progressziója számos esemény és faktor eredője (47). Így a bármely tumorban megfigyelt események e számos tényező összhatásaként alakulnak, egyesek erősebb, mások gyengébb hatást gyakorolnak a daganatsejtek viselkedésére.

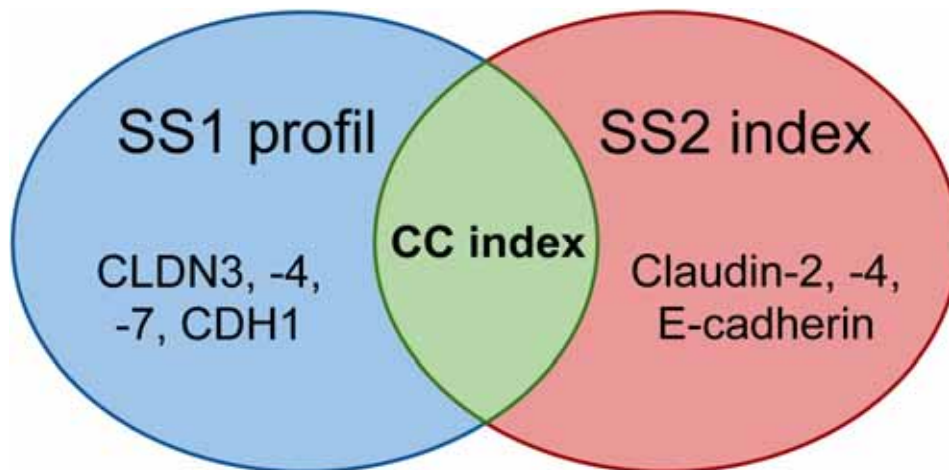
Az immunfenotípus csoportok összehasonlításában a claudin-1 kifejeződése a luminalis B, a claudin-4 a luminalis A csoportban volt a legalacsonyabb, míg a többi csoportban e két fehérje expressziója relatíve magasabb volt. Felmérésünkben kimutattuk, hogy a claudin-4 fokozott kifejeződése látható a basalis típusú tumorokban (140), azonban ezek között elkülönül egy rosszabb prognózisú csoport, ahol a claudin-4 kifejeződés jelentősen alacsonyabb (141, 142). Munkacsoportunkkal egyidőben ezzel megegyező eredményre jutott a Perou munkacsoport is (143, 145, 169). Az E-cadherin magas expressziót mutatott a Her2 pozitív csoportban. Ezt, és magas grade-ű tumorokban e kapcsolatot további tanulmányok erősítették meg (170, 171).

A tripla negatív daganatok esetén a tréning kohortban nem tudtunk a többi emlődaganat alcsoporttól egyértelműen elkülönítő sejtkapcsoló fehérje markert vagy marker-mintázatot találni. A luminalis A daganatoktól a claudin-4 (140), a luminalis B tumoroktól a claudin-1, míg a Her2 immunfenotípusú daganatokról az E-cadherin expresszió különítheti el. Ezért feltételeztük, hogy a tripla negatív tumorok egy heterogén csoportot alkotnak a sejtkapcsoló molekulák kifejeződésének tekintetében is. Hierarchikus cluster analízis segítségével 3 csoportjukat tudjuk megkülönböztetni a claudin molekulák expressziója alapján: 1) claudin-4,-3,-7 kifejező; 2) claudin-4 kifejező, de claudin-3,-7 alacsony/negatív; 3) claudin-4,-3,-7 alacsony („claudin-low”). A „claudin-low” alcsoport tehát megjelent mint külön kategória, azaz kimutattuk, hogy az irodalomban többszörösen megerősítést nyert génexpressziós profil alapján elkülönülő rossz prognózisú „claudin-low” daganatcsoport fehérje expressziós szinten valószínűleg azonosítható, legalábbis az általunk vizsgált esetekben (28, 143, 145, 169). A csak a basalis immunhisztokémiai phentípusú carcinomákat elemző vizsgálatunkban a csoportok ugyancsak elkülönültek, de kevésbé élesen határolódott el a claudin-4,-3,-7

kifejező és a claudin-4 kifejező, claudin-3,-7 negatív típus. A claudin-low daganatok kerültek ismét külön csoportba (141). A claudin-4 mRNS-szintű expressziója is ezt látszott alátámasztani (142).

A tréning csoportban elemeztük a claudin-1, -2, -3, -4, -5, -7 és E-cadherin fehérjeszintű kifejeződését, és összefüggésüket a relapszus-mentes túléléssel. Az összehasonlításához minden vizsgált változó esetén a median mentén két csoportra osztottuk a betegeket. Ezen felosztás bizonyosan finomítható a későbbiekben, akár több csoportra is lehet majd osztani a tumorokat a quartilisek mentén is.

A claudin-2, -4 és E-cadherin kifejeződés tekintetében jelentősen elkülönültek a különböző viselkedésű csoportok, e fehérjék expressziója a szakirodalom szerint is prognosztikus információt hordoz (91, 104, 108, 140, 155, 163, 170-173). Ezt követően az összes vizsgált sejtkapcsoló molekula score-ját összeadva (claudin-1, -2, -3, -4, -5, -7 és E-cadherin), az abból kalkulált (sejt)kapcsolati (KK2) index segítségével osztottuk fel a betegeket, amely jelentős különbséget adott a túlélés előrejelzésében a median mentén osztott két csoport között. A legjobban működő proteinekre szűkítettük a marker profilt egy szimpla sejtkapcsolati indexet (SS2) létrehozva. A claudin-2, -4 és E-cadherin együtteséből létrejött SS2-index is hasonlóan el tudta különíteni a jó és rossz prognózisú csoportot.



42. ábra. A bioinformatikai elemzés (SS1 profil – kék) és immunhisztokémiai vizsgálat (SS2 index – piros) alapján kijelölt Claudin-Cadherin index (zöld).

A bioinformatikai elemzés során kapott SS1 profil és a saját anyagunkon elvégzett immunhisztokémiai vizsgálat által eredményezett SS2 index alkotó elemeinek átfedéséből kialakítottuk a claudin-4 és E-cadherin együtteséből álló claudin-cadherin (CC) indexet (42. ábra).

A 387 fős validációs csoport esetében is elsőként a patológiai paraméterek által hordozott prognosztikus információk elemzését végeztük el, majd ezt folytattuk a claudinok kifejeződési mintázatának elemzésével. Ennek során a relapszus-mentes túlélés előrejelzésére való képesség leírása során a szövettani típus, a tumorméret, a grade, az NPI és az immunfenotípus által hordozott prognosztikus információ az irodalmi adatokkal megegyezett (27, 35, 51, 62, 63, 148-153), míg a nyirokcsomó-státus előrejelző képessége nem volt egyértelmű. Egy vizsgálat során a közelmúltban kétségbe vonták az axillaris blokkdiszekciónak az életkilátásokra gyakorolt hatását (174); ez is mutatja, hogy jelenleg intenzív kutatás tárgyát képezi ezen paraméter vizsgálata (175-178).

Vizsgálatunkban jelentősen elkülönült a CC index által meghatározott csoportok túlélése a median érték mentén elválasztva. A claudin-4 és E-cadherin önmagában is képes volt a csoportok szétválasztására, azonban erősségük nőtt a CC index kialakításával. A kezelési adatok figyelembevételével is megmaradtak a különböző prognosztikus alcsoportok, azonban az eredmények ebben az összehasonlításban nem voltak jelentősek, feltehetően a mintaszám alacsony volta miatt.

Cox multivariáns regressziós analízist végeztünk, hogy felmérjük az index helyét a többi faktorról szemben. Ennek során a grade, érinvázio, necrosis, áttétes nyirokcsomók száma és immunfenotípus beosztásával szemben teszteltük a CC indexet, miután függetlenségi vizsgálatot végeztünk. A CC index erős prognosztikus faktornak bizonyult az immunfenotípus és érinvázio mellett. Eredetileg azt feltételeztük, hogy a claudin-low tumorok jelenléte ronthatja beosztásunk pontosságát. Ezért a daganatokat az altípusok függvényében is megvizsgáltuk.

Az ER+ és ER- tumorok között elkülönültek a prognosztikus alcsoportok, de egyik esetben sem mutatott az eredmény jelentős különbséget, ezért az egyes kategóriákat tovább bontottuk. Csak a luminalis grade 2-es csoport figyelembevételkor a median expresszió alapján elkülönült egy jobb és egy rosszabb prognózisú csoport, amely az in silico elemzés során korábban látható volt. Ez a klinikai döntéshozatalban alkalmazható

felosztást vetít előre a validációs csoportban, amely összhangban van más erre a területre fókuszáló elemzésekkel (34, 123, 147).

Az ER+ tumorok immunhisztokémiai phenotípusainak megfelelő luminalis A és B csoportok elemzésekor a luminalis A csoportban működött a CC index előrejelző képessége, míg a luminalis B csoportban az index szerinti alacsonyabb kifejeződési szinttel bíró esetek kerültek a rosszabb prognózisú csoportba, a magasabb expressziót mutatóak pedig a jobb kimenetelű csoportba. Az eredmény tendenciózus megjelenése miatt feltételezhető, hogy nemcsak a tripla negatív daganatok, hanem a luminalis B csoportba sorolható tumorok is heterogén csoportot alkotnak.

A várakozásokkal ellentétben az alacsony CC index a tripla negatív daganatokban is a jobb prognózist jelezte, ezért a tumorokat közelebbi vizsgálatnak vetettük alá: box-plot diagrammon láttuk, hogy létezik egy néhány esetből álló „outlier” csoport, amelyekben a CC index alacsony, és relapszus-mentes túlélésük rövid, az azonos csoportba sorolható daganatoktól láthatóan eltérnek. Alacsony számuk lehet a válasz arra, hogy miért nem alkotnak önálló csoportot. Ugyancsak ezért lehetséges, hogy korábbi, basalis phenotípusú emlőcarcinomákkal foglalkozó közleményünkben nem tudtuk elkülöníteni a claudin-low alcsoportot a tripla negatív tumorok között (140), majd későbbi elemzésünkben azonosítottuk ezeket a daganatokat (141, 142). A claudin-low tumorok pontosabb azonosítására további fehérjék, pl. a claudinokkal kapcsolatban álló cytoplasmaticus fehérjék és jelátviteli utak vizsgálata egészítheti ki ismereteinket és a „claudin-low” tumorok pontosabb azonosítását teheti lehetővé egy jóval nagyobb esetszámú vizsgálatban.

Sørlie eredeti közleményében 32 tumort tudott génexpressziós array adatok alapján a luminalis A csoportba sorolni, ezekben az ER α gén, a GATA binding protein 3, az X-box binding protein 1, a trefoil factor 3, a hepatocyte nuclear factor 3 α , és az ER-regulált LIV-1 jelentősen magasabb kifejeződést mutatott. A további ER+ csoportot két részre tudta osztani: 5 esetben a luminalis B és 10 tumor esetében a luminalis C alcsoportot jelölte meg. Utóbbiak alacsony-közepes szintű „luminalis” kifejeződési mintázatot mutattak. A luminalis C típus addig ismeretlen funkciójú géncsoport alapján különült el a luminalis B és A típusoktól (62). Azonban fény derült arra is, hogy ez a profil mind a Her2+, mind a tripla negatív daganatok sajátja (62). Meglepetésre, a luminalis C altípus nem volt konzekvensen elkülöníthető a további elemzésekben (63),

amikor egy, az előzőektől független 500 génes profil alapján osztották fel a tumorokat (200 gén fedett át a korábbi 500-as szettel). A kérdés árnyaltságára utal, hogy még a luminalis A és luminalis B alcsoportok elkülönítése sem volt egy újabb tanulmány szerint egyértelmű (179), amely a későbbi profilból 120 gént őrzött meg, és 83 emlőtumor mintát vizsgált kevesebb gén kifejeződésének elemzésével (63). Egy további vizsgálatban megerősítették a tényt, hogy az osztályozásra alkalmazott gének száma kritikus paraméter, mert az eredeti Sørlie-féle luminalis A és B tumorok osztályozását sem tudták egy 47 génes profil segítségével reprodukálni, amely 15 génnel fedett át az eredeti osztályozási szettel (180).

A genomikai elemzések során azonosított kifejeződési mintázatok különböző biológiai tulajdonságokkal jellemezhető tumorcsoportokat azonosítanak. Az expressziós diverzitás biológiai diverzitást is sugall. Már számos paramétert kapcsolatba hoztak az emlőtumorok biológiai tulajdonságaival és azok kimenetelével, azonban a kép sokszor ennél bonyolultabb: a különböző paraméterek és a biológiai funkció kapcsolata és ezek prognosztikus előrejelző képessége eltérő (pl. az ER kifejező tumorokkal rendelkező betegek viszonylag jó életkilátásokkal bírnak, annak ellenére, hogy az oestradiol a receptor-pozitív sejtekben potens mitogen faktor). A tumorok eltérő viselkedésű csoportokba való sorolása ismételtelen azonosítható génexpressziós mintázatok és marker-kombinációk segítségével (mint pl. a CC index) az ilyen kérdések megválaszolásában lehet segítségünkre. Egy-egy addicionális paraméter a különböző emlőcarcinoma alap-típusokban eltérő tulajdonságokat jelenthet: az agresszívebb daganatokban a CC-index csökkenése jelez rosszabb prognózist, míg az alap-típus alapján kedvezőbb kimenetelű daganatokban a CC-index növekedése jelentheti ugyanezt. Ezen markerek az előzetes tudásunk (pl. altípusok csoportjaiba való besorolás) alkalmazásával többletinformációt nyújthatnak, paradigmaváltást jelenthetnek a daganatokról való gondolkodásunkban (181).

6. MEGÁLLAPÍTÁSOK

Munkánk során az alábbi megállapításokat tettük:

1. A claudinok kifejeződése eltér a különböző szövettani típusú emlődaganatokban (138, 143, 182).
2. Az emlődaganatok dedifferenciálódása során eltérnek a különböző grádusú tumorokban kifejeződő claudinok: legjellemzőbb a claudin-1 és -2 csökkenése, és a claudin-4 és -7 emelkedése (139, 140).
3. A claudinok és E-cadherin kifejeződése eltér az immunhisztokémiai profil által tükrözött emlődaganat altípusokban: a luminalis A típust az alacsonyabb claudin-4, a luminalis B típust az alacsonyabb claudin-1, a Her2 csoportot a kifejezett E-cadherin, míg a tripla negatív tumorokat elsősorban az emelkedett claudin-4 expresszió jellemzi (140-143, 182).
4. A nyirokcsomó-áttétek claudin kifejeződése eltér-e a primer emlődaganatokétól, jellemzően a claudin-5 magasabban, a claudin-3,-4 és -7 alacsonyabban fejeződik ki (138, 139).
5. Nyilvános genomikai adatbázisok vizsgálata során a claudinok és E-cadherin mRNS-szinten önmagukban is, azonban együttes mintázatként (claudin-3, -4, -7 és E-cadherin) kifejezetten robosztus prognosztikus információt nyújtanak (143, 182, 183).
6. A claudinok és E-cadherin fehérjeszintű kifejeződése prognosztikus információt hordoz primer emlőtumorokban: a claudin-2, -4 és E-cadherin rendelkezik legerősebb előrejelző képességgel a relapszus-mentes túlélést tekintve (143, 182, 183).
7. A nyirokcsomó-áttétek claudin kifejeződése prognosztikus információval bír emlődaganatos megbetegedésben, mert az áttétben a claudin-1 alacsonyabb kifejeződése és a claudin-4 fokozott kifejeződése kedvezőtlenebb kimenetelt sugall (138, 139, 143).
8. A genomikai adatbázisok vizsgálatából származó CC indexet immunhisztokémiai technikával validáltuk független betegcsoporton: uni- és multivariáns összehasonlításban is megállja a helyét (182, 183).

9. A claudin és E-cadherin expressziója további prognosztikus információt nyújt a rutinszerűen alkalmazható faktorok mellett, különböző kezelési csoportokban is releváns lehet, prospectiv vizsgálata megfontolandó (140-142, 182, 183).

7. KÖVETKEZTETÉSEK

A claudinok és E-cadherin kifejeződésének változása számos malignus folyamatban eltér. Szerepük a prognózis predikciójában egyre inkább előtérbe került mind emlő-, mind gastrointestinalis, nőgyógyászati és urológiai daganatokban (80, 89, 91, 184).

Ebben a vizsgálat-sorozatban igazoltuk, hogy a claudin-kifejeződés önmagában is hordoz prognosztikus információt. Bioinformatikai elemzés során az egyes sejtkapcsoló molekulák kifejeződése prognosztikus besorolás alapját képezheti, kombinációjukkal jelentősen növelhető a pontosság. A claudin-3, -4, -7 és E-cadherin mutatkozott a legerősebb tényezőnek, valamint ezek kombinációja messze meghaladta az alkotórészek és az összes vizsgált sejtkapcsoló molekula segítségével kialakított profil prognosztikus előrejelző képességét. Ezen eredmény validálható a mindennapi gyakorlatban alkalmazható immunhisztokémiai technikával, azonban a fehérjeszintű eredmények csak részben fednek át az mRNS-alapú profillal. A szöveti kifejeződés szintjén a claudin-2, -4 és E-cadherin bizonyult megbízhatónak. Így a kettő átfedéséből kialakított CC index (amely a claudin-4 és E-cadherin kettőséből áll) erőteljes prognosztikus információt hordoz, amely az összetevőinél jelentősen erősebb.

Független validációs vizsgálatban ezt megerősítettük, és a CC index multivariáns analízisben is elég erősen teljesített a prognózis előrejelzésében az immunfenotípus és érinvázio jelenléte vagy hiánya mellett. Ugyanakkor a CC index által meghatározott csoportok tovább finomították az altípusok által meghatározott prognosztikus alcsoportokat. Tehát a claudin-cadherin index a rutinszerűen alkalmazható faktorok *mellett* további lehetőséget nyújt a rendszerezés pontosítására, a kimenetel megjósolására.

A claudin-low daganatok pontos meghatározása egyelőre további tényezők (pl. őssejt markerek) figyelembevételével lehetséges. Ezen tumorok további karakterizálása csak igen nagy esetszámú vizsgálatban lesz lehetséges.

Nyirokcsomó-áttétek claudin kifejeződése további prognosztikus információt hordoz emlődaganatos megbetegedésben, a claudin-1 csökkent és a claudin-4 emelkedett expressziója jelenti a rosszabb kimenetelt. Távoli áttétek vizsgálata jelenleg még a primer tumor és a hozzá tartozó metasztázis altípusának összehasonlításával több

munkacsoportban folyik, a claudin kifejeződési mintázat elemzése ebben is további lehetőségeket hordozhat.

ÖSSZEFOGLALÁS

Bevezetés: Az emlőrák kialakulása és progressziója során a claudin és cadherin sejtkapcsoló fehérjék kifejeződése megváltozik. Mivel ezeknek a génexpressziós változásoknak számos más daganatban is meghatározó szerepe van, éppen ezért ezeknek a fehérjéknek lehetséges prognosztikus jelentőségét vizsgáltuk emlőcarcinoma esetekben.

Betegek és módszerek: A claudin-1, -3, -4, -5, -7, -8, -10, -15, -18 és E-cadherin kifejeződésének vizsgálatát végeztük 1809 beteg publikus adatbázisokban elérhető génexpressziós adatainak bioinformatikai elemzésével. Emellett összesen 636 emlődaganatos beteg tumorait szöveti multiblokkba ágyazva, immunhisztokémiai módszerrel vizsgáltuk a claudin-1, -2, -3, -4, -5, -7 és E-cadherin expressziót. 96 esetben a nyirokcsomó-áttéteket is elemezni tudtuk.

Eredmények: A claudin-kifejeződés önmagában is hordoz prognosztikus információt. Bioinformatikai elemzés során a claudin-3, -4, -7 és E-cadherin mutatkozott a legerősebb tényezőnek, valamint ezek kombinációja messze meghaladta az alkotórészek és az összes vizsgált sejtkapcsoló molekula segítségével kialakított profil prognosztikus előrejelző képességét. A fehérjeszintű eredmények szerint a claudin-2, -4 és E-cadherin bizonyult megbízhatónak. Így a kettő átfedéséből kialakítottuk az ún. CC indexet (amely a claudin-4 és E-cadherin kettőséből áll), amely erőteljes prognosztikus információt hordoz, amely az összetevőinél jelentősen erősebb ($p = 0.029$).

Független validációs vizsgálatban ezt megerősítettük, és multivariáns analízisben is erősen teljesített a prognózis előrejelzésében. Ugyanakkor a CC index által meghatározott csoportok tovább finomították az altípusok által meghatározott prognosztikus alcsoportokat.

Nyirokcsomó-áttétek vizsgálata során azt találtuk, hogy a claudin-1 csökkent és a claudin-4 emelkedett expressziója jelzi a rosszabb kimenetelt.

Összefoglalás: Az általunk bemutatott claudin-cadherin index a rutinszerűen alkalmazható faktorok mellett további lehetőséget nyújt a rendszerezés pontosítására, a kimenetel megjósolására. Vizsgálataink igazolták továbbá, hogy a nyirokcsomó-áttétek claudin kifejeződése további prognosztikus információt hordoz emlődaganatos megbetegedésben.

ABSTRACT

Background: Different expression of claudins and E-cadherin was described in the pathogenesis and progression of breast cancer. The changes in the expression of these junctional molecules was also described as being of prominent importance in other cancers as well. Thus, we aimed at exploring the potential prognostic relevance of these cell junction molecules in breast carcinoma cases.

Patients and methods: Expression of claudin-1, -3, -4, -5, -7, -8, -10, -15, -18 and E-cadherin at mRNA level was evaluated in correlation with survival in publicly available datasets containing expression measurements of 1809 breast cancer patients. Breast cancer tissues of 636 patients were evaluated with tissue microarray technique and immunohistochemical method for claudin-1, -2, -3, -4, -5, -7 and E-cadherin protein expression. In 96 cases lymph node metastases were also subjects of the study.

Results: Claudin expression bears prognostic information in itself. Based on bioinformatic data analysis, the meta-gene of claudin-3, -4, -7 and E-cadherin has shown the most powerful predictive power for survival. An immunohistochemical protein profile consisting of claudin-2, -4 and E-cadherin was able to predict outcome in the most effective manner in the training set. Combining the overlapping members of the distinct methods resulted in the CC index (consisting of claudin-4 and E-cadherin), which was able to accurately predict relapse-free survival in the validation cohort ($p = 0.029$) in a more efficient way than its components. Cox regression analysis including clinicopathological variables and the average CC score showed that in univariate analysis most of them were prognostic but most of them lost independent prognostic value in multivariate analysis except for the CC index, the subtypes defined by immunoprofiling and vascular invasion. On the other hand the CC index was able to further refine prognosis splitting good vs. poor prognosis patients into two clusters in these subgroups. Evaluation of lymph node metastases has shown that decreased expression of claudin-1 and elevated expression of claudin-4 can predict worse prognosis in breast cancers spreading to the regional nodes.

Conclusion: The defined claudin-cadherin index provides additional prognostic information besides the routinely utilized diagnostic approaches and factors. The level of

expression of certain claudins can be of prognostic significance in regional lymph node metastases.

**A JELŐLT HÁROM LEGFONTOSABBNAK ÍTÉLT PUBLIKÁCIÓJÁNAK BIBLIOGRÁFIAI
ADATAI**

- 1) Kulka J*, Szász AM*, Németh Zs, Madaras L, Schaff Zs, Molnár IA, Tőkés AM:
Expression of tight junction protein claudin-4 in basal-like breast carcinomas.
Pathol Oncol Res 2009;15:59-64. IF=1.152

- 2) Szasz AM, Tokes AM, Micsinai M, Krenacs T, Jakab Cs, Lukacs L, Nemeth Zs,
Baranyai Zs, Dede K, Madaras L, Kulka J: Prognostic significance of claudin
expression changes in breast cancer with regional lymph node metastasis.
Clin Exp Metast 2011;28:55-63. IF=4.113

- 3) Szasz AM, Nemeth Zs, Gyorffy B, Micsinai M, Krenács T, Baranyai Zs, Harsanyi L,
Kiss A, Schaff Zs, Tokes AM, Kulka J: Identification of a claudin-4/E-cadherin score
(CURIO) to predict prognosis in breast cancer.
Cancer Sci 2011;102:2248-54. IF=3.846

IRODALOMJEGYZÉK

1. Tusnády G, Gaudi I, Rejtő L, Kásler M, Szentirmay Z.(2008) A magyar daganatos betegek túlélési esélye a Nemzeti Rákregiszter adatai alapján. *Magy Onkol*,52: 339-349.
2. Forrai G, Szabó É, Ormándi K, Ambrózay É, Péntek Z, Milics M, Rajtár M, Sinkovics I.(2010) A képalkotó vizsgálómódszerek alkalmazása az emlődaganatok korszerű diagnosztikájában és szűrésében. *Magy Onkol*,54: 211-216.
3. Eheman CR, Shaw KM, Ryerson AB, Miller JW, Ajani UA, White MC.(2009) The Changing Incidence of In situ and Invasive Ductal and Lobular Breast Carcinomas: United States, 1999-2004. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prevent*,18: 1763-1769.
4. Trent J, Benjamin R, Valero V.(2001) Primary soft tissue sarcoma of the breast. *Curr Treat Options Oncol*,2: 169-176.
5. Székely B, Madaras L, Szentmártoni G, Szász AM, Baranyák Z, Szittya L, Torgyik L, Zergényi É, Borbényi E, Kenessey I, Korompay A, Langmár Z, Bánhidly F, Kulka J, Dank M.(2010) A fiatal- és időskori emlőrák összehasonlítása klinikopatológiai jellemzők alapján. *Magy Onkol*,54: 19-26.
6. Canello G, Maisonneuve P, Rotmensz N, Viale G, Mastropasqua MG, Pruneri G, Veronesi P, Torrisi R, Montagna E, Luini A, Intra M, Gentilini O, Ghisini R, Goldhirsch A, Colleoni M.(2010) Prognosis and adjuvant treatment effects in selected breast cancer subtypes of very young women (<35 years) with operable breast cancer. *Ann Oncol*,21: 1974-1981.
7. Wo JY, Chen K, Neville BA, Lin NU, Punglia RS.(2011) Effect of Very Small Tumor Size on Cancer-Specific Mortality in Node-Positive Breast Cancer. *J Clin Oncol*,29: 2619-2627.
8. Packard RA, Prosnitz LR, Bobrow SN.(1977) Selection of Breast Cancer Patients for Adjuvant Chemotherapy. *JAMA*,238: 1034-1036.
9. Cserni G, Francz M, Járay B, Kálmán E, Kovács I, Kulka J, Orosz Z, Udvarhelyi N, Vass L.(2010) Az emlőrák patológiai diagnosztikája, feldolgozása és kórszöveti leletezése. *Magy Onkol*,54: 217-226.
10. Elston EW, Ellis IO.(1993) Method for grading breast cancer. *J Clin Pathol*,46: 189-190.

11. Galea MH, Blamey RW, Elston CE, Ellis IO.(1992) The Nottingham Prognostic Index in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*,22: 207-219.
12. Sobin LH, Gospodarowicz MK, Ch. W.(2009) *TNM Classification of Malignant Tumors*. Wiley-Blackwell, Oxford,7th ed.
13. Denoix P.(1946) Enquete permanent dans les centres anticancereaux. *Bull Inst Nat Hyg*: 70–75.
14. Hashizume R, Koizumi H, Ihara A, Ohta T, Uchikoshi T.(1996) Expression of beta-catenin in normal breast tissue and breast carcinoma: a comparative study with epithelial cadherin and alpha-catenin. *Histopathology*,29: 139-146.
15. De Leeuw WJ, Berx G, Vos CB, Peterse JL, Van de Vijver MJ, Litvinov S, Van Roy F, Cornelisse CJ, Cleton-Jansen AM.(1997) Simultaneous loss of E-cadherin and catenins in invasive lobular breast cancer and lobular carcinoma in situ. *J Pathol*,183: 404-411.
16. Karayiannakis AJ, Nakopoulou L, Gakiopoulou H, Keramopoulos A, Davaris PS, Pignatelli M.(2001) Expression patterns of beta-catenin in in situ and invasive breast cancer. *Eur J Surg Oncol*,27: 31-36.
17. Mastracci TL, Tjan S, Bane AL, O'Malley FP, Andrulis IL.(2005) E-cadherin alterations in atypical lobular hyperplasia and lobular carcinoma in situ of the breast. *Mod Pathol*,18: 741-751.
18. Kuroda H, Tamaru J, Takeuchi I, Ohnisi K, Sakamoto G, Adachi A, Kaneko K, Itoyama S.(2006) Expression of E-cadherin, alpha-catenin, and beta-catenin in tubulolobular carcinoma of the breast. *Virchows Arch*,448: 500-505.
19. Rakha EA, Putti TC, Abd El-Rehim DM, Paish C, Green AR, Powe DG, Lee AH, Robertson JF, Ellis IO.(2006) Morphological and immunophenotypic analysis of breast carcinomas with basal and myoepithelial differentiation. *J Pathol*,208: 495-506.
20. Rakha EA, El-Sayed ME, Green AR, Paish EC, Lee AHS, Ellis IO.(2007) Breast carcinoma with basal differentiation: a proposal for pathology definition based on basal cytokeratin expression. *Histopathology*,50: 434-438.
21. Leibl S, Gogg-Kammerer M, Sommersacher A, Denk H, Moinfar F.(2005) Metaplastic Breast Carcinomas: Are They of Myoepithelial Differentiation?: Immunohistochemical Profile of the Sarcomatoid Subtype Using Novel Myoepithelial Markers. *Am J Surg Pathol*,29: 347-353.

22. Welch DR, McClure SA, Aeed PA, Bahner MJ, Adams LD.(1990) Tumor progression- and metastasis-associated proteins identified using a model of locally recurrent rat mammary adenocarcinomas. *Clin Exp Metast*,8: 533-551.
23. Sager R.(1989) Tumor suppressor genes: the puzzle and the promise. *Science*,246: 1406-1412.
24. Levin I.(1901) Cell Proliferation under Pathological Conditions with Special reference to the Etiology of tumors (An Experimental Study.). *J Med Res* 6: 145–155.
25. Koller P.(1947) Abnormal Mitosis in Tumours. *Br J Cancer*,1: 38–47.
26. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lonning PE, Borresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D.(2000) Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*,406: 747 - 752.
27. van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, Peterse HL, van der Kooy K, Marton MJ, Witteveen AT, Schreiber GJ, Kerkhoven RM, Roberts C, Linsley PS, Bernards R, Friend SH.(2002) Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*,415: 530-536.
28. Herschkowitz JI, Simin K, Weigman VJ, Mikaelian I, Usary J, Hu Z, Rasmussen KE, Jones LP, Assefnia S, Chandrasekharan S, Backlund MG, Yin Y, Khramtsov AI, Bastein R, Quackenbush J, Glazer RI, Brown PH, Green JE, Kopelovich L, Furth PA, Palazzo JP, Olopade OI, Bernard PS, Churchill GA, Van Dyke T, Perou CM.(2007) Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol*,8: R76.
29. Creighton CJ, Li X, Landis M, Dixon JM, Neumeister VM, Sjolund A, Rimm DL, Wong H, Rodriguez A, Herschkowitz JI, Fan C, Zhang X, He X, Pavlick A, Gutierrez MC, Renshaw L, Larionov AA, Faratian D, Hilsenbeck SG, Perou CM, Lewis MT, Rosen JM, Chang JC.(2009) Residual breast cancers after conventional therapy display mesenchymal as well as tumor-initiating features. *PROC NATL ACAD SCI USA*,106: 13820-13825.
30. Narod S, Lynch H, Conway T, Watson P, Feunteun J, Lenoir G.(1993) Increasing incidence of breast cancer in family with BRCA1 mutation. *The Lancet*,341: 1101-1102.

31. Bártek J, Bártková J, Vojtěšek B, Stašková Z, Rejthar A, Kovařík J, Lane DP.(1990) Patterns of expression of the p53 tumour suppressor in human breast tissues and tumours in situ and in vitro. *Int J Cancer*,46: 839-844.
32. van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, Dai H, Hart AA, Voskuil DW, Schreiber GJ, Peterse JL, Roberts C, Marton MJ, Parrish M, Atsma D, Witteveen A, Glas A, Delahaye L, van der Velde T, Bartelink H, Rodenhuis S, Rutgers ET, Friend SH, Bernards R.(2002) A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med*,347: 1999-2009.
33. Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, Baehner FL, Walker MG, Watson D, Park T, Hiller W, Fisher ER, Wickerham DL, Bryant J, Wolmark N.(2004) A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med*,351: 2817-2826.
34. Sotiriou C, Wirapati P, Loi S, Harris A, Fox S, Smeds J, Nordgren H, Farmer P, Praz V, Haibe-Kains B, Desmedt C, Larsimont D, Cardoso F, Peterse H, Nuyten D, Buyse M, Van de Vijver MJ, Bergh J, Piccart M, Delorenzi M.(2006) Gene expression profiling in breast cancer: understanding the molecular basis of histologic grade to improve prognosis. *J Natl Cancer Inst*,98: 262-272.
35. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lonning PE, Borresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D.(2000) Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*,406: 747 - 752.
36. Lázár G, Besznyák I, Boross G, Farsang Z, Gulyás G, Jakab F, Maráz R, Márkus B, Tóth L.(2010) Az emlőrák korszerű sebészi kezelése. *Magy Onkol*,54: 227-234.
37. Polgár C, Csejtej A, Gábor G, Landherr L, Mangel L, Mayer Á, Németh G, Fodor J.(2010) Sugárterápiás irányelvek. *Magy Onkol*,54: 257-265.
38. Bonadonna G, Brusamolino E, Valagussa P, Rossi A, Brugnatelli L, Brambilla C, De Lena M, Tancini G, Bajetta E, Musumeci R, Veronesi U.(1976) Combination Chemotherapy as an Adjuvant Treatment in Operable Breast Cancer. *N Engl J Med*,294: 405-410.
39. Young RC, Ozols RF, Myers CE.(1981) The Anthracycline Antineoplastic Drugs. *N Engl J Med*,305: 139-153.

40. Capri G, Tarenzi E, Fulfaro F, Gianni L.(1996) The role of taxanes in the treatment of breast cancer. *Semin Oncol*,23: 68-75.
41. Pegram MD, Lipton A, Hayes DF, Weber BL, Baselga JM, Tripathy D, Baly D, Baughman SA, Twaddell T, Glaspy JA, Slamon DJ.(1998) Phase II study of receptor-enhanced chemosensitivity using recombinant humanized anti-p185HER2/neu monoclonal antibody plus cisplatin in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer refractory to chemotherapy treatment. *J Clin Oncol*,16: 2659-2671.
42. Fendly BM, Winget M, Hudziak RM, Lipari MT, Napier MA, Ullrich A.(1990) Characterization of Murine Monoclonal Antibodies Reactive to Either the Human Epidermal Growth Factor Receptor or HER2/neu Gene Product. *Cancer Res*,50: 1550-1558.
43. Burris HA, III.(2004) Dual Kinase Inhibition in the Treatment of Breast Cancer: Initial Experience with the EGFR/ErbB-2 Inhibitor Lapatinib. *Oncologist*,9: 10-15.
44. Jubb AM, Oates AJ, Holden S, Koeppen H.(2006) Predicting benefit from anti-angiogenic agents in malignancy. *Nat Rev Cancer*,6: 626-635.
45. Sherwood LM, Parris EE, Folkman J.(1971) Tumor Angiogenesis: Therapeutic Implications. *N Engl J Med*,285: 1182-1186.
46. Láng I, Kahán Z, Pintér T, Dank M, Boér K, Pajkos G, Faluhelyi Z, Pikó B, Eckhardt S, Horváth Z.(2010) Az emlőrák belgyógyászati onkológiai (gyógyszeres) kezelése. *Magy Onkol*,54: 237-254.
47. Hanahan D, Weinberg RA.(2000) The Hallmarks of Cancer. *Cell*,100: 57-70.
48. Ramaswamy S, Ross KN, Lander ES, Golub TR.(2003) A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nat Genet*,33: 49-54.
49. Chang HY, Nuyten DSA, Sneddon JB, Hastie T, Tibshirani R, Sørlie T, Dai H, He YD, van't Veer LJ, Bartelink H, van de Rijn M, Brown PO, van de Vijver MJ.(2005) Robustness, scalability, and integration of a wound-response gene expression signature in predicting breast cancer survival. *PROC NATL ACAD SCI USA*,102: 3738-3743.
50. Finak G, Bertos N, Pepin F, Sadekova S, Souleimanova M, Zhao H, Chen H, Omeroglu G, Meterissian S, Omeroglu A, Hallett M, Park M.(2008) Stromal gene expression predicts clinical outcome in breast cancer. *Nature Med*,14: 518-527.

51. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL.(1987) Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the ERBB2 oncogene. *Science*,235: 177 - 181.
52. Davis LM, Harris C, Tang L, Doherty P, Hrabec P, Sakai Y, Bocklage T, Doeden K, Hall B, Alsobrook J, Rabinowitz I, Williams TM, Hozier J.(2007) Amplification Patterns of Three Genomic Regions Predict Distant Recurrence in Breast Carcinoma. *J Mol Diagn*,9: 327-336.
53. Wang Y, Klijn JG, Zhang Y, Sieuwerts AM, Look MP, Yang F, Talantov D, Timmermans M, Meijer-van Gelder ME, Yu J, Jatkoe T, Berns EM, Atkins D, Foekens JA.(2005) Gene-expression profiles to predict distant metastasis of lymph-node-negative primary breast cancer. *Lancet*,365: 671-679.
54. Chang HY, Sneddon JB, Alizadeh AA, Sood R, West RB, Montgomery K, Chi J-T, Rijn Mvd, Botstein D, Brown PO.(2004) Gene Expression Signature of Fibroblast Serum Response Predicts Human Cancer Progression: Similarities between Tumors and Wounds. *PLoS Biol*,2: e7.
55. Toussaint J, Sieuwerts AM, Haibe-Kains B, Desmedt C, Rouas G, Harris AL, Larsimont D, Piccart M, Foekens JA, Durbecq V, Sotiriou C.(2009) Improvement of the clinical applicability of the Genomic Grade Index through a qRT-PCR test performed on frozen and formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *BMC Genomics*,10: 424.
56. Ma XJ, Salunga R, Dahiya S, Wang W, Carney E, Durbecq V, Harris A, Goss P, Sotiriou C, Erlander M, Sgroi D.(2008) A five-gene molecular grade index and HOXB13:IL17BR are complementary prognostic factors in early stage breast cancer. *Clin Cancer Res*,14: 2601-2608.
57. Szasz AM, Tokes A-M, Szittyá L, Baranyak Z, Szekely B, Eklund AC, Li Q, Swanton C, Szallasi Z, Gyorffy B, Micsinai M, Kulka J.(2010) A focused, PCR based gene expression signature to refine grade in breast cancer. *Eur J Cancer*,8: 226s.
58. Tutt A, Wang A, Rowland C, Gillett C, Lau K, Chew K, Dai H, Kwok S, Ryder K, Shu H, Springall R, Cane P, McCallie B, Kam-Morgan L, Anderson S, Buerger H, Gray J, Bennington J, Esserman L, Hastie T, Broder S, Sninsky J, Brandt B, Waldman F.(2008) Risk estimation of distant metastasis in node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer patients using an RT-PCR based prognostic expression signature. *BMC Cancer*,8: 339.

59. Mullins M, Perreard L, Quackenbush JF, Gauthier N, Bayer S, Ellis M, Parker J, Perou CM, Szabo A, Bernard PS.(2007) Agreement in Breast Cancer Classification between Microarray and Quantitative Reverse Transcription PCR from Fresh-Frozen and Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissues. *Clin Chem*,53: 1273-1279.
60. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE.(1989) Studies of the ERBB2 proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*,244: 707 - 712.
61. Aleskandarany M, Rakha E, Macmillan R, Powe D, Ellis I, Green A.(2010) MIB1/Ki-67 labelling index can classify grade 2 breast cancer into two clinically distinct subgroups. *Breast Cancer Res Treat*: 1-9.
62. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Eystein Lonning P, Borresen-Dale AL.(2001) Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *PROC NATL ACAD SCI USA*,98: 10869-10874.
63. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, Deng S, Johnsen H, Pesich R, Geisler S, Demeter J, Perou CM, Lonning PE, Brown O, Borresen-Dale AL, Botstein D.(2003) Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci USA*,100: 8418 - 8423.
64. Graham D, Jin L, Lloyd R.(1991) Detection of estrogen receptor in paraffin-embedded sections of breast carcinoma by immunohistochemistry and in situ hybridization. *Am J Surg Pathol*,15: 475-485.
65. Ring BZ, Seitz RS, Beck R, Shasteen WJ, Tarr SM, Cheang MCU, Yoder BJ, Budd GT, Nielsen TO, Hicks DG, Estopinal NC, Ross DT.(2006) Novel Prognostic Immunohistochemical Biomarker Panel for Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer. *J Clin Oncol*,24: 3039-3047.
66. Nogales-Cadenas R, Carmona-Saez P, Vazquez M, Vicente C, Yang X, Tirado F, Carazo JMa, Pascual-Montano A.(2009) GeneCodis: interpreting gene lists through enrichment analysis and integration of diverse biological information. *Nucleic Acids Res*,37: W317-W322.
67. Gonzalez-Mariscal L, Betanzos A, Nava P, Jaramillo BE.(2003) Tight junction proteins. *Progr Biophys Mol Biol*,81: 1-44.

68. Furuse M, Fujita K, Hiiragi T, Fujimoto K, Tsukita S.(1998) Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol*,141: 1539-1550.
69. Morita K, Furuse M, Fujimoto K, Tsukita S.(1999) Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. *Proc Natl Acad Sci USA*,96: 511-516.
70. Balkovetz DF.(2006) Claudins at the gate: determinants of renal epithelial tight junction paracellular permeability. *Am J Physiol*,290: F572-579.
71. Wilcox ER, Burton QL, Naz S, Riazuddin S, Smith TN, Ploplis B, Belyantseva I, Ben-Yosef T, Liburd NA, Morell RJ, Kachar B, Wu DK, Griffith AJ, Riazuddin S, Friedman TB.(2001) Mutations in the gene encoding tight junction claudin-14 cause autosomal recessive deafness DFNB29. *Cell*,104: 165-172.
72. Morin PJ.(2005) Claudin proteins in human cancer: promising new targets for diagnosis and therapy. *Cancer Res*,65: 9603-9606.
73. Nemeth J, Nemeth Z, Tatrai P, Peter I, Somoracz A, Szasz AM, Kiss A, Schaff Z.(2010) High expression of claudin-1 protein in papillary thyroid tumor and its regional lymph node metastasis. *Pathol Oncol Res*,16: 19-27.
74. Weber CR, Nalle SC, Tretiakova M, Rubin DT, Turner JR.(2008) Claudin-1 and claudin-2 expression is elevated in inflammatory bowel disease and may contribute to early neoplastic transformation. *Lab Invest*,88: 1110-1120.
75. Smith JJ, Deane NG, Dhawan P, Beauchamp RD.(2008) Regulation of metastasis in colorectal adenocarcinoma: A collision between development and tumor biology. *Surgery*,144: 353-366.
76. Evans MJ, von Hahn T, Tscherne DM, Syder AJ, Panis M, Wolk B, Hatzioannou T, McKeating JA, Bieniasz PD, Rice CM.(2007) Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature*,446: 801-805.
77. Sobel G, Nemeth J, Kiss A, Lotz G, Szabo I, Udvarhelyi N, Schaff Z, Paska C.(2006) Claudin 1 differentiates endometrioid and serous papillary endometrial adenocarcinoma. *Gynecol Oncol*,103: 591-598.
78. Gonzalez-Mariscal L, Lechuga S, Garay E.(2007) Role of tight junctions in cell proliferation and cancer. *Progr Histochem Cytochem*,42: 1-57.

79. Soini Y.(2005) Expression of claudins 1, 2, 3, 4, 5 and 7 in various types of tumours. *Histopathology*,46: 551-560.
80. Gyorffy H, Holczbauer A, Nagy P, Szabo Z, Kupcsulik P, Paska C, Papp J, Schaff Z, Kiss A.(2005) Claudin expression in Barrett's esophagus and adenocarcinoma. *Virchows Arch*,447: 961-968.
81. Hewitt KJ, Agarwal R, Morin PJ.(2006) The claudin gene family: expression in normal and neoplastic tissues. *BMC Cancer*,6: 186.
82. Matsuda Y, Semba S, Ueda J, Fuku T, Hasuo T, Chiba H, Sawada N, Kuroda Y, Yokozaki H.(2007) Gastric and intestinal claudin expression at the invasive front of gastric carcinoma. *Cancer Sci*,98: 1014-1019.
83. Soini Y, Tammola S, Helin H, Martikainen P.(2006) Claudins 1, 3, 4 and 5 in gastric carcinoma, loss of claudin expression associates with the diffuse subtype. *Virchows Arch*,448: 52-58.
84. Borka K, Kaliszky Pt, Szabó Eb, Lotz Gb, Kupcsulik Pt, Schaff Z, Kiss As.(2007) Claudin expression in pancreatic endocrine tumors as compared with ductal adenocarcinomas. *Virchows Arch*,450: 549-557.
85. Kominsky SL, Vali M, Korz D, Gabig TG, Weitzman SA, Argani P, Sukumar S.(2004) Clostridium perfringens enterotoxin elicits rapid and specific cytolysis of breast carcinoma cells mediated through tight junction proteins claudin 3 and 4. *Am J Pathol*,164: 1627-1633.
86. Michikawa H, Fujita-Yoshigaki J, Sugiya H.(2008) Enhancement of barrier function by overexpression of claudin-4 in tight junctions of submandibular gland cells. *Cell Tissue Res*,334: 255-264.
87. Michl P, Barth C, Buchholz M, Lerch MM, Rolke M, Holzmann K-H, Menke A, Fensterer H, Giehl K, Löhner M, Leder G, Iwamura T, Adler G, Gress TM.(2003) Claudin-4 Expression Decreases Invasiveness and Metastatic Potential of Pancreatic Cancer. *Cancer Res*,63: 6265-6271.
88. Michl P, Buchholz M, Rolke M, Kunsch S, Löhner M, McClane B, Tsukita S, Leder G, Adler G, Gress TM.(2001) Claudin-4: A New Target for Pancreatic Cancer Treatment Using Clostridium perfringens Enterotoxin. *Gastroenterology*,121: 678-684.

89. Lodi C, Szabo E, Holczbauer A, Batmunkh E, Szijarto A, Kupcsulik P, Kovalszky I, Paku S, Illyes G, Kiss A, Schaff Z.(2006) Claudin-4 differentiates biliary tract cancers from hepatocellular carcinomas. *Mod Pathol*,19: 460-469.
90. Németh Z, Szász AM, Tátrai P, Németh JI, Györffy H, Somorác Á, Szijártó A, Kupcsulik P, Kiss A, Schaff Z.(2009) Claudin-1, -2, -3, -4, -7, -8, and -10 Protein Expression in Biliary Tract Cancers. *J Histochem Cytochem*,57: 113-121.
91. Landers KA, Samaratunga H, Teng L, Buck M, Burger MJ, Scells B, Lavin MF, Gardiner RA.(2008) Identification of claudin-4 as a marker highly overexpressed in both primary and metastatic prostate cancer. *Br J Cancer*,99: 491-501.
92. Agarwal R, D'Souza T, Morin PJ.(2005) Claudin-3 and claudin-4 expression in ovarian epithelial cells enhances invasion and is associated with increased matrix metalloproteinase-2 activity. *Cancer Res*,65: 7378-7385.
93. Morita K, Sasaki H, Furuse M, Tsukita S.(1999) Endothelial Claudin. *J Cell Biol*,147: 185-194.
94. Lippoldt A, Liebner S, Andbjør B, Kalbacher H, Wolburg H, Haller H, Fuxe K.(2000) Organization of choroid plexus epithelial and endothelial cell tight junctions and regulation of claudin-1, -2 and -5 expression by protein kinase C. *NeuroReport*,11: 1427-1431.
95. Lippoldt A, Kniesel U, Liebner S, Kalbacher H, Kirsch T, Wolburg H, Haller H.(2000) Structural alterations of tight junctions are associated with loss of polarity in stroke-prone spontaneously hypertensive rat blood-brain barrier endothelial cells. *Brain Res*,885: 251-261.
96. Sobel G, Paska C, Szabo I, Kiss A, Kadar A, Schaff Z.(2005) Increased expression of claudins in cervical squamous intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma. *Human Pathol*,36: 162-169.
97. Sobel G, Szabo I, Paska C, Kiss A, Kovalszky I, Kadar A, Paulin F, Schaff Z.(2005) Changes of cell adhesion and extracellular matrix (ECM) components in cervical intraepithelial neoplasia. *Pathol Oncol Res*,11: 26-31.
98. Tsukita S, Furuse M.(2000) Pores in the wall: claudins constitute tight junction strands containing aqueous pores. *J Cell Biol*,149: 13-16.

99. Kramer F, White K, Kubbies M, Swisshelm K, Weber BH.(2000) Genomic organization of claudin-1 and its assessment in hereditary and sporadic breast cancer. *Human Genet*,107: 249-256.
100. Kominsky SL, Argani P, Korz D, Evron E, Raman V, Garrett E, Rein A, Sauter G, Kallioniemi OP, Sukumar S.(2003) Loss of the tight junction protein claudin-7 correlates with histological grade in both ductal carcinoma in situ and invasive ductal carcinoma of the breast. *Oncogene*,22: 2021-2033.
101. Soini Y.(2004) Claudins 2, 3, 4, and 5 in Paget's disease and breast carcinoma. *Human Pathol*,35: 1531-1536.
102. Tokes AM, Kulka J, Paku S, Szik A, Paska C, Novak PK, Szilak L, Kiss A, Bogi K, Schaff Z.(2005) Claudin-1, -3 and -4 proteins and mRNA expression in benign and malignant breast lesions: a research study. *Breast Cancer Res*,7: R296-305.
103. Tokes AM, Kulka J, Paku S, Mathe M, Paska C, Lodi C, Kiss A, Schaff Z.(2005) The expression of five different claudins in invasive breast carcinomas: comparison of pT1pN1 and pT1pN0 tumors. *Pathol Res Pract*,201: 537-544.
104. Tabaries S, Dong Z, Annis MG, Omeroglu A, Pepin F, Ouellet V, Russo C, Hassanain M, Metrakos P, Diaz Z, Basik M, Bertos N, Park M, Guettier C, Adam R, Hallett M, Siegel PM.(2010) Claudin-2 is selectively enriched in and promotes the formation of breast cancer liver metastases through engagement of integrin complexes. *Oncogene*.
105. Hennessy BT, Gonzalez-Angulo AM, Stemke-Hale K, Gilcrease MZ, Krishnamurthy S, Lee JS, Fridlyand J, Sahin A, Agarwal R, Joy C, Liu W, Stivers D, Baggerly K, Carey M, Lluch A, Monteagudo C, He X, Weigman V, Fan C, Palazzo J, Hortobagyi GN, Nolden LK, Wang NJ, Valero V, Gray JW, Perou CM, Mills GB.(2009) Characterization of a naturally occurring breast cancer subset enriched in epithelial-to-mesenchymal transition and stem cell characteristics. *Cancer Res*,69: 4116-4124.
106. Morohashi S, Kusumi T, Sato F, Odagiri H, Chiba H, Yoshihara S, Hakamada K, Sasaki M, Kijima H.(2007) Decreased expression of claudin-1 correlates with recurrence status in breast cancer. *Int J Mol Med*,20: 139-143.
107. Martin TA, Harrison GM, Watkins G, Jiang WG.(2008) Claudin-16 reduces the aggressive behavior of human breast cancer cells. *J Cell Biochem*,105: 41-52.

108. Lanigan F, McKiernan E, Brennan DJ, Hegarty S, Millikan RC, McBryan J, Jirstrom K, Landberg G, Martin F, Duffy MJ, Gallagher WM.(2009) Increased claudin-4 expression is associated with poor prognosis and high tumour grade in breast cancer. *Int J Cancer*,124: 2088-2097.
109. Hulpiau P, van Roy F.(2009) Molecular evolution of the cadherin superfamily. *Int J Biochem Cell Biol*,41: 349-369.
110. Angst BD, Marcozzi C, Magee AI.(2001) The cadherin superfamily: diversity in form and function. *J Cell Sci*,114: 629-641.
111. Wijnhoven BPL, Dinjens WNM, Pignatelli M.(2000) E-cadherin—catenin cell—cell adhesion complex and human cancer. *Br J Surg*,87: 992-1005.
112. Papkoff J, Rubinfeld B, Schryver B, Polakis P.(1996) Wnt-1 regulates free pools of catenins and stabilizes APC-catenin complexes. *Mol Cell Biol*,16: 2128-2134.
113. Birchmeier C, Birchmeier W, Brand-Saberi B.(1996) Epithelial-mesenchymal transitions in cancer progression. *Acta Anat*,156: 217-226.
114. Brunetti B, Sarli G, Preziosi R, Monari I, Benazzi C.(2005) E-cadherin and beta-catenin reduction influence invasion but not proliferation and survival in canine malignant mammary tumours. *Vet Pathol*,42: 781 - 787.
115. Cowin P, Rowlands TM, Hatsell SJ.(2005) Cadherins and catenins in breast cancer. *Curr Opin Cell Biol*,17: 499-508.
116. Németh Z, Szász A, Somorác Á, Tátrai P, Németh J, Györffy H, Szíjártó A, Kupcsulik P, Kiss A, Schaff Z.(2009) Zonula Occludens-1, Occludin, and E-cadherin Protein Expression in Biliary Tract Cancers. *Pathol Oncol Res*,15: 533-539-539.
117. Onder TT, Gupta PB, Mani SA, Yang J, Lander ES, Weinberg RA.(2008) Loss of E-Cadherin Promotes Metastasis via Multiple Downstream Transcriptional Pathways. *Cancer Res*,68: 3645-3654.
118. Yoshida R, Kimura N, Harada Y, Ohuchi N.(2001) The loss of E-cadherin, alpha- and beta-catenin expression is associated with metastasis and poor prognosis in invasive breast cancer. *Int J Oncol*,18: 513-520.
119. Wong AST, Gumbiner BM.(2003) Adhesion-independent mechanism for suppression of tumor cell invasion by E-cadherin. *J Cell Biol*,161: 1191-1203.
120. Yang J, Weinberg RA.(2008) Epithelial-Mesenchymal Transition: At the Crossroads of Development and Tumor Metastasis. *Developmental Cell*,14: 818-829.

121. Förster C.(2008) Tight junctions and the modulation of barrier function in disease. *Histochem Cell Biol*,130: 55-70.
122. Bos PD, Zhang XH, Nadal C, Shu W, Gomis RR, Nguyen DX, Minn AJ, van de Vijver MJ, Gerald WL, Foekens JA, Massague J.(2009) Genes that mediate breast cancer metastasis to the brain. *Nature*,459: 1005-1009.
123. Desmedt C, Giobbie-Hurder A, Neven P, Paridaens R, Christiaens MR, Smeets A, Lallemand F, Haibe-Kains B, Viale G, Gelber RD, Piccart M, Sotiriou C.(2009) The Gene expression Grade Index: a potential predictor of relapse for endocrine-treated breast cancer patients in the BIG 1-98 trial. *BMC Med Genomics*,2: 40.
124. Desmedt C, Piette F, Loi S, Wang Y, Lallemand F, Haibe-Kains B, Viale G, Delorenzi M, Zhang Y, d'Assignies MS, Bergh J, Lidereau R, Ellis P, Harris AL, Klijn JG, Foekens JA, Cardoso F, Piccart MJ, Buyse M, Sotiriou C.(2007) Strong time dependence of the 76-gene prognostic signature for node-negative breast cancer patients in the TRANSBIG multicenter independent validation series. *Clin Cancer Res*,13: 3207-3214.
125. Ivshina AV, George J, Senko O, Mow B, Putti TC, Smeds J, Lindahl T, Pawitan Y, Hall P, Nordgren H, Wong JE, Liu ET, Bergh J, Kuznetsov VA, Miller LD.(2006) Genetic reclassification of histologic grade delineates new clinical subtypes of breast cancer. *Cancer Res*,66: 10292-10301.
126. Loi S, Haibe-Kains B, Desmedt C, Lallemand F, Tutt AM, Gillet C, Ellis P, Harris A, Bergh J, Foekens JA, Klijn JG, Larsimont D, Buyse M, Bontempi G, Delorenzi M, Piccart MJ, Sotiriou C.(2007) Definition of clinically distinct molecular subtypes in estrogen receptor-positive breast carcinomas through genomic grade. *J Clin Oncol*,25: 1239-1246.
127. Loi S, Haibe-Kains B, Desmedt C, Wirapati P, Lallemand F, Tutt AM, Gillet C, Ellis P, Ryder K, Reid JF, Daidone MG, Pierotti MA, Berns EM, Jansen MP, Foekens JA, Delorenzi M, Bontempi G, Piccart MJ, Sotiriou C.(2008) Predicting prognosis using molecular profiling in estrogen receptor-positive breast cancer treated with tamoxifen. *BMC Genomics*,9: 239.
128. Miller LD, Smeds J, George J, Vega VB, Vergara L, Ploner A, Pawitan Y, Hall P, Klaar S, Liu ET, Bergh J.(2005) An expression signature for p53 status in human breast

cancer predicts mutation status, transcriptional effects, and patient survival. *Proc Natl Acad Sci USA*,102: 13550-13555.

129. Minn AJ, Gupta GP, Padua D, Bos P, Nguyen DX, Nuyten D, Kreike B, Zhang Y, Wang Y, Ishwaran H, Foekens JA, van de Vijver M, Massague J.(2007) Lung metastasis genes couple breast tumor size and metastatic spread. *Proc Natl Acad Sci USA*,104: 6740-6745.

130. Pawitan Y, Bjohle J, Amler L, Borg AL, Egyhazi S, Hall P, Han X, Holmberg L, Huang F, Klaar S, Liu ET, Miller L, Nordgren H, Ploner A, Sandelin K, Shaw PM, Smeds J, Skoog L, Wedren S, Bergh J.(2005) Gene expression profiling spares early breast cancer patients from adjuvant therapy: derived and validated in two population-based cohorts. *Breast Cancer Res*,7: R953-964.

131. Schmidt M, Bohm D, von Torne C, Steiner E, Puhl A, Pilch H, Lehr HA, Hengstler JG, Kolbl H, Gehrman M.(2008) The humoral immune system has a key prognostic impact in node-negative breast cancer. *Cancer Res*,68: 5405-5413.

132. Zhang Y, Sieuwerts AM, McGreevy M, Casey G, Cufer T, Paradiso A, Harbeck N, Span PN, Hicks DG, Crowe J, Tubbs RR, Budd GT, Lyons J, Sweep FC, Schmitt M, Schittulli F, Golouh R, Talantov D, Wang Y, Foekens JA.(2009) The 76-gene signature defines high-risk patients that benefit from adjuvant tamoxifen therapy. *Breast Cancer Res Treat*,116: 303-309.

133. Gyorffy B, Lanczky A, Eklund AC, Denkert C, Budczies J, Li Q, Szallasi Z.(2009) An online survival analysis tool to rapidly assess the effect of 22,277 genes on breast cancer prognosis using microarray data of 1,809 patients. *Breast Cancer Res Treat*.

134. Callagy G, Cattaneo E, Daigo Y, Happerfield L, Bobrow LG, Pharoah PDP, Caldas C.(2003) Molecular Classification of Breast Carcinomas Using Tissue Microarrays. *Diagn Mol Pathol*,12: 27-34.

135. Carey LA, Perou CM, Livasy CA, Dressler LG, Cowan D, Conway K, Karaca G, Troester MA, Tse CK, Edmiston S, Deming SL, Geradts J, Cheang MC, Nielsen TO, Moorman PG, Earp HS, Millikan RC.(2006) Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA*,295: 2492 - 2502.

136. Nguyen PL, Taghian AG, Katz MS, Niemierko A, Abi Raad RF, Boon WL, Bellon JR, Wong JS, Smith BL, Harris JR.(2008) Breast Cancer Subtype Approximated

by Estrogen Receptor, Progesterone Receptor, and HER-2 Is Associated With Local and Distant Recurrence After Breast-Conserving Therapy. *J Clin Oncol*,26: 2373-2378.

137. Tibshirani R, Hastie T, Narasimhan B, Chu G.(2002) Diagnosis of multiple cancer types by shrunken centroids of gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA*,99: 6567-6572.

138. Szasz AM, Tokes AM, Micsinai M, Krenacs T, Jakab C, Lukacs L, Nemeth Z, Baranyai Z, Dede K, Madaras L, Kulka J.(2011) Prognostic significance of claudin expression changes in breast cancer with regional lymph node metastasis. *Clin Exp Metast*,28: 55-63.

139. Szasz AM, Tokes A-M, Lukacs LV, Nemeth Z, Krenacs T, Kulka J.(2008) Expression of tight junction molecules in breast carcinomas of different histological types and their corresponding lymph node metastases. *TTDP-3CERM-Breast Pathology Proceedings*: 163.

140. Kulka J, Szasz AM, Nemeth Z, Madaras L, Schaff Z, Molnar IA, Tokes AM.(2009) Expression of tight junction protein claudin-4 in basal-like breast carcinomas. *Pathol Oncol Res*,15: 59-64.

141. Szasz AM, Micsinai M, Tokes A-M, Madaras L, Baranyai Z, Dede K, Mersich T, Salamon F, Kulka J.(2009) Tripla-negatív emlőrákok alcsoportjainak azonosítása claudin kifejeződés alapján. *Magy Onkol*,53: 119-120.

142. Szasz AM, Micsinai M, Tokes A, Madaras L, Baranyai Z, Kulka J.(2009) Profiling of triple-negative breast carcinomas based on claudin expression pattern. *ASCO Breast Cancer Symposium Proceedings 2009*.

143. Szasz AM, Micsinai M, Tokes A, Madaras L, Krenacs T, Kulka J.(2009) Proteomic Profiling of Breast Carcinomas Based on Claudin Expression Pattern. *Cancer Res*,69: 6123.

144. Szasz AM, Nemeth Z, Gyorffy B, Micsinai M, Krenacs T, Baranyai Z, Harsanyi L, Kiss A, Schaff Z, Tokes A-M, Kulka J.(2011) Identification of a claudin-4/E-cadherin score (CURIO) to predict prognosis in breast cancer. *Cancer Sci*: doi: 10.1111/j.1349-7006.2011.02085.x.

145. Prat A, Parker J, Karginova O, Fan C, Livasy C, Herschkowitz J, He X, Perou C.(2010) Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res*,12: R68.

146. Creighton CJ, Li X, Landis M, Dixon JM, Neumeister VM, Sjolund A, Rimm DL, Wong H, Rodriguez A, Herschkowitz JI, Fan C, Zhang X, He X, Pavlick A, Gutierrez MC, Renshaw L, Larionov AA, Faratian D, Hilsenbeck SG, Perou CM, Lewis MT, Rosen JM, Chang JC.(2009) Residual breast cancers after conventional therapy display mesenchymal as well as tumor-initiating features. *Proc Natl Acad Sci USA*,106: 13820 - 13825.
147. Filho OM, Ignatiadis M, Sotiriou C.(2010) Genomic Grade Index: An important tool for assessing breast cancer tumor grade and prognosis. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*.
148. Andrulis IL, Bull SB, Blackstein ME, Sutherland D, Mak C, Sidlofsky S, Pritzker KP, Hartwick RW, Hanna W, Lickley L, Wilkinson R.(1998) neu/erbB-2 amplification identifies a poor-prognosis group of women with node-negative breast cancer. *J Clin Oncol*,16: 1340 - 1349.
149. Camp RL, Charette LA, Rimm DL.(2000) Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma. *Lab Invest*,80: 1943 - 1949.
150. Ellis IO, Galea M, Broughton N, Locker A, Blamey RW, Elston CW.(1992) Pathological prognostic factors in breast cancer. II. Histological type. Relationship with survival in a large study with long-term follow-up. *Histopathology*,20: 479-489.
151. Elston CW, Ellis IO.(1991) Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*,19: 403-410.
152. Elston CW, Ellis IO, Pinder SE.(1998) Prognostic factors in invasive carcinoma of the breast. *Clin Oncol*,10: 14-17.
153. Van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, Dai H, Hart AAM, Voskuil DW, Schreiber GJ, Peterse JL, Roberts C, Marton MJ, Parrish M, Atsma D, Witteveen A, Glas A, Delahaye L, van der Velde T, Bartelink H, Rodenhuis S, Rutgers ET, Friend SH, Bernards R.(2002) A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med*,347: 1999 - 2009.
154. Kulka J, Tokes AM.(2005) Claudin expression in breast tumors. *Human Pathol*,36: 859; author reply 860.

155. Kim TH, Huh JH, Lee S, Kang H, Kim GI, An HJ.(2008) Down-regulation of claudin-2 in breast carcinomas is associated with advanced disease. *Histopathology*,53: 48-55.
156. Blanchard AA, Skliris GP, Watson PH, Murphy LC, Penner C, Tomes L, Young TL, Leygue E, Myal Y.(2009) Claudins 1, 3, and 4 protein expression in ER negative breast cancer correlates with markers of the basal phenotype. *Virchows Arch*.
157. Chao YC, Pan SH, Yang SC, Yu SL, Che TF, Lin CW, Tsai MS, Chang GC, Wu CH, Wu YY, Lee YC, Hong TM, Yang PC.(2009) Claudin-1 is a metastasis suppressor and correlates with clinical outcome in lung adenocarcinoma. *Am J Resp Critical Care medicine*,179: 123-133.
158. Higashi Y, Suzuki S, Sakaguchi T, Nakamura T, Baba S, Reinecker HC, Nakamura S, Konno H.(2007) Loss of claudin-1 expression correlates with malignancy of hepatocellular carcinoma. *J Surg Res*,139: 68-76.
159. Hoevel T, Macek R, Swisshelm K, Kubbies M.(2004) Reexpression of the TJ protein CLDN1 induces apoptosis in breast tumor spheroids. *Int J Cancer*,108: 374-383.
160. Turunen M, Talvensaaari-Mattila A, Soini Y, Santala M.(2009) Claudin-5 overexpression correlates with aggressive behavior in serous ovarian adenocarcinoma. *Anticancer Res*,29: 5185-5189.
161. Sauer T, Pedersen MK, Ebeltoft K, Naess O.(2005) Reduced expression of Claudin-7 in fine needle aspirates from breast carcinomas correlate with grading and metastatic disease. *Cytopathology*,16: 193-198.
162. Blackman B, Russell T, Nordeen SK, Medina D, Neville MC.(2005) Claudin 7 expression and localization in the normal murine mammary gland and murine mammary tumors. *Breast Cancer Res*,7: R248-255.
163. Kowalski P, Rubin M, Kleer C.(2003) E-cadherin expression in primary carcinomas of the breast and its distant metastases. *Breast Cancer Res*,5: R217 - R222.
164. Hugo H, Ackland ML, Blick T, Lawrence MG, Clements JA, Williams ED, Thompson EW.(2007) Epithelial--mesenchymal and mesenchymal--epithelial transitions in carcinoma progression. *J Cell Physiol*,213: 374-383.
165. Creighton CJ, Chang JC, Rosen JM.(2010) Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) in Tumor-Initiating Cells and Its Clinical Implications in Breast Cancer. *J Mammary Gland Biol Neopl*.

166. Herschkowitz JI.(2010) Breast cancer stem cells: initiating a new sort of thinking. *Disease Mod Mech*,3: 257-258.
167. Huber MA, Kraut N, Beug H.(2005) Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Curr Opin Cell Biol*,17: 548-558.
168. Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA.(2009) Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*,139: 871-890.
169. Perou C.(2009) Overview of Gene Expression Profiling and Novel Translational Technologies in Breast Cancer. *Cancer Res*,69: ES3-1.
170. Howard EM, Lau SK, Lyles RH, Birdsong GG, Umbreit JN, Kochhar R.(2005) Expression of e-cadherin in high-risk breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*,131: 14-18.
171. Kleer CG, van Golen KL, Braun T, Merajver SD.(2001) Persistent E-Cadherin Expression in Inflammatory Breast Cancer. *Mod Pathol*,14: 458-464.
172. Charpin C, Bonnier P, Garcia S, Andrac L, Crebassa B, Dorel M, Lavaut MN, Allasia C.(1999) E-cadherin and beta-catenin expression in breast medullary carcinomas. *Int J Oncol*,15: 285-292.
173. Mahler-Araujo B, Savage K, Parry S, Reis-Filho JS.(2008) Reduction of E-cadherin expression is associated with non-lobular breast carcinomas of basal-like and triple negative phenotype. *J Clin Pathol*,61: 615-620.
174. Giuliano AE, Hunt KK, Ballman KV, Beitsch PD, Whitworth PW, Blumencranz PW, Leitch AM, Saha S, McCall LM, Morrow M.(2011) Axillary Dissection vs No Axillary Dissection in Women With Invasive Breast Cancer and Sentinel Node Metastasis. *JAMA*,305: 569-575.
175. Weaver DL, Ashikaga T, Krag DN, Skelly JM, Anderson SJ, Harlow SP, Julian TB, Mamounas EP, Wolmark N.(2011) Effect of Occult Metastases on Survival in Node-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med*,364: 412-421.
176. Cserni G, Amendoeira I, Bianchi S, Chmielik E, DeGaetano J, Faverly D, Figueiredo P, Foschini MP, Grabau D, Jacquemier J, Kaya H, Kulka J, Lacerda M, Liepniece-Karele I, Penuela JM, Quinn C, Regitnig P, Reiner-Concin A, Sapino A, van Diest PJ, Varga Z, Vezzosi V, Wesseling J, Zolota V, Zozaya E, Wells CA.(2010) Distinction of isolated tumour cells and micrometastasis in lymph nodes of breast cancer patients according to the new Tumour Node Metastasis (TNM) definitions. *European Journal of Cancer*,In Press, Corrected Proof.

177. Vinh-Hung V, Nguyen NP, Cserni Gb, Truong P, Woodward W, Verkooijen HM, Promish D, Ueno NT, Tai P, Nieto Y, Joseph S, Janni W, Vicini F, Royce M, Storme G, Wallace A-M, Vlastos G, Bouchardy C, Hortobagyi GN.(2009) Prognostic value of nodal ratios in node-positive breast cancer: a compiled update. *Future Oncology*,5: 1585-1603.
178. van Deurzen CHM, Cserni G, Bianchi S, Vezzosi V, Arisio R, Wesseling J, Asslaber M, Foschini MP, Sapino A, Castellano I, Callagy G, Faverly D, Martin-Martinez M-D, Quinn C, Amendoeira I, Kulka J, Reiner-Concin A, Cordoba A, Seldenrijk CA, van Diest PJ.(2010) Nodal-Stage Classification in Invasive Lobular Breast Carcinoma: Influence of Different Interpretations of the pTNM Classification. *J Clin Oncol*,28: 999-1004.
179. Bertucci Fo, Finetti P, Rougemont J, Charafe-Jauffret E, Cervera N, Tarpin C, Nguyen C, Xerri L, Houlgatte Rm, Jacquemier J, Viens P, Birnbaum D.(2005) Gene Expression Profiling Identifies Molecular Subtypes of Inflammatory Breast Cancer. *Cancer Res*,65: 2170-2178.
180. Chanrion M, Fontaine H, Rodriguez C, Negre V, Bibeau F, Theillet C, Henaut A, Darbon J-M.(2007) A new molecular breast cancer subclass defined from a large scale real-time quantitative RT-PCR study. *BMC Cancer*,7: 39.
181. Pusztai L, Rouzier R, Qi Y, Lehmann-Che J, Bianchini G, Iwamoto T, Symmans W, Andre F, de The H, Coutant C, Coutant C.(2009) Clinical Subtype-Derived p53 Gene Signature Is Predictive of Prognosis and Response to Chemotherapy in ER-Positive but Not in ER-Negative Breast Cancers. *Cancer Res*,69: 6122-.
182. Szasz AM, Nemeth Z, Gyorffy B, Micsinai M, Krenacs T, Baranyai Z, Harsanyi L, Kiss A, Schaff Z, Tokes A-M, Kulka J.(Identification of a claudin-4/E-cadherin score (CURIO) to predict prognosis in breast cancer. *Cancer Sci*. doi: 10.1111/j.1349-7006.2011.02085.x.
183. Szasz A, Gyorffy B, Németh Z, Krenacs T, Baranyai Z, Harsanyi L, Dank M, Madaras L, Tokes A, Kulka J.(2011) Claudin-4/E-cadherin index to predict prognosis in breast cancer. *Eur J Cancer*,47: S181.
184. Szabo I, Kiss A, Schaff Z, Sobel G.(2009) Claudins as diagnostic and prognostic markers in gynecological cancer. *Histol Histopathol*,24: 1607-1615.

SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE (A DISSZERTÁCIÓHOZ KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK)

- 1) Kulka J*, Szász AM*, Németh Zs, Madaras L, Schaff Zs, Molnár IA, Tőkés AM:
Expression of tight junction protein claudin-4 in basal-like breast carcinomas.
Pathol Oncol Res 2009;15:59-64. IF=1.152

- 2) Szasz AM, Tokes AM, Micsinai M, Krenacs T, Jakab Cs, Lukacs L, Nemeth Zs,
Baranyai Zs, Dede K, Madaras L, Kulka J: Prognostic significance of claudin
expression changes in breast cancer with regional lymph node metastasis.
Clin Exp Metast 2011;28:55-63. IF=4.113

- 3) Szasz AM, Nemeth Zs, Gyorffy B, Micsinai M, Krenács T, Baranyai Zs, Harsanyi L,
Kiss A, Schaff Zs, Tokes AM, Kulka J: Identification of a claudin-4 - E-cadherin
score to predict prognosis in breast cancer.
Cancer Sci 2011;102:2248-54. IF=3.846

SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE (A DISSZERTÁCIÓHOZ KAPCSOLÓDÓ ABSZTRAKTOK)

- 1) Szasz AM, Tokes A-M, Lukacs LV, Nemeth Z, Krenacs T, Kulka J.(2008)
Expression of tight junction molecules in breast carcinomas of different histological types and their corresponding lymph node metastases. Technology Transfer in Diagnostic Pathology, 3rd Central European Regional Meeting, Breast Pathology, Proceedings: 163.
- 2) Szasz AM, Micsinai M, Tokes A-M, Madaras L, Baranyai Z, Dede K, Mersich T, Salamon F, Kulka J.(2009) Tripla-negatív emlőrákok alsoportjainak azonosítása claudin kifejeződés alapján. Magyar Onkol,53: 119-120.
- 3) Szasz AM, Micsinai M, Tokes A, Madaras L, Baranyai Z, Kulka J.(2009) Profiling of triple-negative breast carcinomas based on claudin expression pattern. ASCO Breast Cancer Symposium Proceedings 2009.
- 4) Szasz AM, Micsinai M, Tokes A, Madaras L, Krenacs T, Kulka J.(2009) Proteomic Profiling of Breast Carcinomas Based on Claudin Expression Pattern. Cancer Res, 69: 6123. (IF=7.543)
- 5) Szasz AM, Gyorffy B, Nemeth Z, Krenacs T, Baranyai Zs, Harsanyi L, Dank M, Madaras L, Tokes AM, Kulka J.(2011) Claudin-4/E-cadherin index to predict prognosis in breast cancer. Eur J Cancer,47:S181 (IF=4.944)

SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE (A DISSZERTÁCIÓTÓL FÜGGETLEN KÖZLEMÉNYEK)

- 1) Jakab Cs, Halasz J, Szasz AM, Batmunkh E, Kiss A, Schaff Zs, Rusvai M, Galfi P, Kulka J: Claudin-1, -2, -3, -4, -5, -7 and -10 proteins expression and localization in the normal canine mammary gland. *Acta Vet Hung* 2007;56:341-52; IF=0.624
- 2) Stangl R, Sziártó A, Ónody P, Tamás J, Tátrai M, Hegedus V, Blázovics A, Lotz G, Szász M, Kiss A, Gero D, Szabó Cs, Kupcsulik P, Darvas K, Harsányi L: Hosszú latenciájú preoperatív glutamin előkezelés vizsgálata patkány ischaemia-reperfüziós modellben. *Aneszteziológia és Intenzív Terápia* 2008; 8:179-87.
- 3) Jakab Cs, Arany-Tóth A, Csébi P, Szász AM, Rusvai M, Gálfí P, Kulka J: Kutya nervus hypoglossusból kiinduló, rosszindulatú perifériás ideghüvely daganata (MPNST) : Esetismertetés. *Magyar Állatorvosok Lapja* 2008; 130:671-9.
- 4) Jakab Cs, Szász AM, Kulka J, Baska F, Rusvai M, Gálfí P, Németh T: Secondary tumoural valvulopathy in dog. Case report. *Acta Vet Hung* 2009;57:63-7
IF=0.624
- 5) Tőkés AM*, Szász AM*, Tóth AI, Farkas A, Dank M, Harsanyi L, Molnar IA, Molnar BA, Laszlo Zs, Rusz Z, Kulka J: Stromal protein expression following preoperative systemic therapy in breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2009;15:731-9;
IF=6.747
- 6) Jakab Cs, Halász J, Kiss A, Szász AM, Schaff Zs, Rusvai M, Kulka J: Külső pozitív kontrollok alkalmazása claudin-expressziós immunhisztokémiai vizsgálatokban. *Magyar Állatorvosok Lapja* 2008;130:433-8.
- 7) Kovacs K, Jakab Cs, Szasz AM: Laser-assisted removal of a feline eosinophilic granuloma from the back of the tongue - case report. *Acta Vet Hung* 2009;57:417-26
IF=0.624

- 8) Jakab Cs, Szász AM, Kulka J, Rusvai M, Gálfi P, Németh T: Cutaneous mast cell tumour within a lipoma in a Boxer. *Acta Vet Hung* 2009;57:263–74.
IF=0.624
- 9) Jakab Cs, Szasz AM, Kiss A, Schaff Z, Rusvai M, Szabara A, Kulka J: Claudin-expression studies in lung metastases of canine solid mammary gland carcinomas. *Magyar Állatorvosok Lapja* 2009;131:33-41
- 10) Jakab Cs, Halász J, Kiss A, Schaff Zs, Szász AM, Rusvai M, Abonyi-Tóth Zs, Kulka J: Evaluation of microvessel density (MVD) in canine mammary tumours by quantitative claudin-5 molecule immunohistochemistry. *Acta Vet Hung*. 2008;56:495-510. IF=0.624
- 11) Jakab Cs, Halász J, Szász AM, Kiss A, Schaff Zs, Rusvai M, Gálfi P, Kulka J: Expression of Claudin-1, -2, -3, -4, -5 and -7 Proteins in Benign and Malignant Canine Mammary Gland Epithelial Tumours. *J Comp Pathol*. 2008;139:238-45.
IF=1.398
- 12) Németh Z, Szász AM, Tátrai P, Németh J, Gyorffy H, Somorác A, Szíjártó A, Kupcsulik P, Kiss A, Schaff Z: Claudin-1, -2, -3, -4, -7, -8, and -10 Protein Expression in Biliary Tract Cancers. *J Histochem Cytochem*. 2009;57:113-21.
IF=2.372
- 13) Valastyan S, Reinhardt F, Benaich N, Calogrias D, Szász AM, Wang ZC, Brock JE, Richardson AL, Weinberg RA: A Pleiotropically Acting microRNA, miR-31, Inhibits Breast Cancer Metastasis. *Cell*. 2009;137:1032-46. IF=31.152
- 14) Németh J, Németh Z, Tátrai P, Péter I, Somorác Á, Szász AM, Kiss A, Schaff Zs: High expression of claudin-1 protein in papillary thyroid tumor and its regional lymph node metastasis. *Pathol Oncol Res*. 2010;16:19-27. IF=1.483

- 15) Szász AM*, Nyirády P*, Majoros A, Szendrői A, Szűcs M, Székely EJ, Tőkés AM, Romics I, Kulka J: Beta-catenin expression and claudin expression pattern as prognostic factors of prostatic cancer progression. *BJU Int* 2010;105:716-22.
IF=3.190
- 16) Németh Z, Szász AM, Somorác A, Tátrai P, Németh J, Gyórfy H, Szíjártó A, Kupcsulik P, Kiss A, Schaff Z: Zonula Occludens-1, Occludin, and E-cadherin Protein Expression in Biliary Tract Cancers. *Pathol Oncol Res* 2010;16:19-27
IF=1.152
- 17) Szendrői A, Dinya E, Kardos M, Szász AM, Németh Z, Ats K, Kiss J, Antal I, Romics I, Szendrői M: Prognostic Factors and Survival of Renal Clear Cell Carcinoma Patients with Bone Metastases. *Pathol Oncol Res.* 2010;16:29-38.
IF=1.483
- 18) Baranyai Zs, Josa V, Szász AM: A műtői hatékonyság javítása (Improving operating room efficiency). *IME* 2009;9:15-21
- 19) Kulka J, Tőkés AM, Tóth AI, Szász AM, Farkas A, Borka K, Járay B, Székely E, Istók R, Lotz G, Madaras L, Korompay A, Harsányi L, László Zs, Rusz Z, Molnár BA, Molnár IA, Kenessey I, Szentmártoni G, Székely B, Dank M: Az emlődaganatok primer szisztémás kemoterápiára adott válasza az immunhisztokémiai fenotípus tükrében. *Magy Onkol.* 2009; 53:335-43
- 20) Székely B, Madaras L, Szentmártoni G, Szász AM, Baranyák Z, Szittyá L, Torgyík L, Zergényi E, Borbényi E, Kenessey I, Korompay A, Langmár Z, Bánhidly F, Kulka J, Dank M: Comparison of breast cancer in young and old women based on clinicopathological features. *Magy Onkol.* 2010;54:19-26.
- 21) Székely B, Langmár Z, Somlai K, Szentmártoni Gy, Szalay K, Korompay A, Szász AM, Kulka J, Bánhidly F, Dank M: A várandósság alatti emlőrák kezelése - Treatment of pregnancy associated breast cancer. *Orv Hetil.* 2010;151:1299-303.

- 22) Tung N, Miron A, Schnitt SJ, Gautam S, Fetten K, Kaplan J, Yassin Y, Buraimoh A, Kim J, Szász AM, Tian R, Wang ZC, Collins LC, Krag K, Legare RD, Sgroi D, Ryan PD, Silver D, Garber JE, Richardson AL: Prevalence and Predictors of Loss of wild type BRCA1 in Estrogen Receptor Positive and Negative BRCA1-associated Breast Cancer. *Breast Cancer Res* 2010;12:R95. IF=5.785
- 23) Szász AM, Szendroi A, Szucs M, Idan R, Tokes AM, Kardos M, Szekely B, Szabo Gy, Kulka J, Szendroi M, Romics I, Timar J: A hypoxia hatása a gének kifejeződésére és azok prognosztikus szerepe veserákban. *Uroonkológia* 2010;3:74-81
- 24) Kulka J, Szirtes I, Szász AM, Kupcsulik P, Kenessey I, Lotz G, Tímár J: II. rész. A gyógyszeres kezelés patológiai alapjai és háttere, minőségbiztosítás a patológiában *Magy Onkol.* 2010;54:343-50.
- 25) Kiss A, Sulya B, Szász AM, Romics I, Kelemen Z, Tóth J, Merksz M, Kemény S, Nyirády P: Long-term psychosexual consequences of hypospadias repair. *J Sex Med* 2011;8:1529-39. IF= 3.957
- 26) Baranyai Zs, Mersich T, Dede K, Besznyak I, Zarand A, Teknos D, Nagy P, Salamon F, Nagy P, Nagy Zs, Kotai Zs, Szasz AM, Lukacs LV, Szallasi Z, Josa V, Jakab F: Projektalapú mintagyűjtéstől a biobankig. *Orv Hetil.* 2011;152:606-9.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Azumah Erzsébet
Baranyai Zsolt
Baranyák Zsuzsanna

CSALÁDOM

Dank Magdolna
Dede Kristóf
Fillinger János
Glasz Tibor
Györffy Balázs
Györffy Hajnalka
Hargitai Dóra
Harsányi László
Hegedűs Balázs
Jaczó Csilla
Jakab Csaba

Kardos Magdolna

Kiss András

Kiss Orsolya

Krenács Tibor

KULKA JANINA

László Zsolt

Lotz Gábor

Lukács Lilla Vanda

Madaras Lilla

Majoros Attila

Mersich Tamás

Micsinai Mariann

Molnár Béla Ákos

Molnár István Arthur

Németh Júlia

Németh Zsuzsanna

Nyirády Péter

Pekár Zoltánné

Rácz Zsuzsanna

Schaff Zsuzsa

Somoráczy Áron

Sklánitzné Samodai Erika

Szállási Zoltán

Szendrői Attila

Szendrői Miklós

Székely Borbála

Szijártó Attila

Sztupinszki Zsófia

Tímár József

Tőkés Anna-Mária