

Connexinek és sejtkommunikációs csatornák szerepe az emlőrák progressziójában és prognózisában

Doktori tézisek

Dr. Teleki Ivett

Semmelweis Egyetem
Patológiai tudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Krenács Tibor, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Hivatalos bírálók:

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

Dr. Vörös Gábor, Ph.D., egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Schaff Zsuzsa, MTA levelező tagja, professzor emerita

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Simon Károly, egyetemi magántanár, osztályvezető főorvos

Dr. Langmár Zoltán, Ph.D., részlegvezető főorvos

Budapest
2015

1. BEVEZETÉS

Az emlőrák világszerte népegészségügyi problémát jelent. Magyarországon úgy, mint a gazdaságilag fejlett országokban is az egyik legnagyobb mortalitással járó megbetegedés. A halálozási ráta a 90-es években kezdett csökkenni, köszönhetően a szűrővizsgálatoknak, a korai diagnózisnak és a személyre szabott terápiának.

A daganat műtét előtti tipizálása ultrahang vezérelt vékonytű biopsziával (FNAB) vagy vastagtű biopsziával (core) történik. A diagnózist követően a beteg terápiáját egy több szakemberből álló csoport (radiológus, sebész, patológus, onkológus) az ún.: oncoteam határozza meg.

A mindennapi gyakorlatban számos prediktív és prognosztikus marker használatos a betegség kimenetelének és a terápiára adott válasz minél pontosabb megítéléséhez. A beteg életkora és a daganat mérete a diagnózis időpontjában fontos információval bír. Az egyik legfontosabb prognosztikus faktor a hónalji nyirokcsomó áttét hiánya vagy megléte a daganat felfedezésekor. A mindennapi gyakorlatban használható a szövettani grade mellett a Nottingham prognosztikus index (NPI), az érbetörés, a nekrosis, Ki67 és p53 kifejezésének meghatározása is. Azonban ezek sokszor csak korlátozott mértékben használhatóak. A hormonreceptor státusz (ösztrogén és progeszteron receptor) valamint a HER2 expresszió meghatározásával különböző fenotípusú daganatok különíthetők el, amelyek eltérő klinikai kimenettel is rendelkeznek.

A sejtek közvetlen, direkt sejt-sejt közötti kommunikációja rendkívül gyors és szabályozott jelátvitelt tesz lehetővé. Ez a mechanizmus az ún. gap junction csatornákon keresztül valósul meg, amely connexin (Cx) molekulákból formálódik a szomszédos sejtek között és szelektív permeabilitást tesznek lehetővé az 1,8 kDa-nál kisebb metabolitoknak, morfogéneknek, másodlagos hírvivőknek. A csatornák jelentőségét jól mutatja szerkezetük evolúciós konzerváltsága, szolid szövetekben való nagy mennyiségű előfordulásuk, valamint hogy már a kevesebb, mint 4 sejtés embrióban is kimutathatóak. Emberben összesen 21 connexin izotípust klónoztak. Ezek közül a legősibb és leggyakrabban előforduló a Cx43. A connexinek a sejtosztódás, a proliferáció és az apoptózis befolyásolása révén gap junction csatornaként és félcsatornaként egyaránt fontos szerepet játszanak a sejtek homeosztázisában. Csatornaként részt vesznek az akciós potenciál továbbításában, a szívben és az agyban. Félcsatornaként parakrin szignálok továbbítását végzik (cAMP, ATP, Ca²⁺). Ezen kívül intracelluláris fehérje-fehérje interakciót képesek létrehozni onkogén termékekkel, protein kinázokkal, citoskeletális fehérjékkel és tigh junction struktúrákkal (ZO1-2) egyaránt. Tehát

funkcionáló connexin molekulák kimutathatók a sejtmembránon kívül (csatorna-független funkciók) a citoplazmában is.

A mai napig ellentmondásos az irodalom mind a normál emlőszövet, mind az emlőrák connexin expresszióját illetően. Kifejeződését nehéz vizsgálni paraffinos metszeten a megfelelő antitestek limitált elérhetősége, valamint a gap junction plakkok igen kis mérete (<1 μ m) miatt.

Normál emlőhámában ez idáig a Cx43-at és a Cx26-ot sikerült kimutatni *in vivo*. Emlőrákokban a Cx43-at, Cx26-ot, Cx32-t és a Cx46-ot mutatták ki. A legtöbb irodalmi adat csak leíró, kevés munkacsoport vetette eddig össze szerepüket a prognózissal. Egy tanulmányban a Cx43, Cx26 és Cx32 emelkedett kifejeződését találták emlőcarcinomák nyirokcsomó áttétjeiben a primer emlőtumorhoz képest. Más munkacsoport ugyanezen connexinek kifejeződését vizsgálták szöveti multiblokkon. Hasonló eredményre jutottak, azonban a connexin expresszió és a betegség prognózisa között nem találtak szignifikáns összefüggést. Mások pozitív korrelációt találtak a Cx26 expresszió és a tumor mérete, valamint a rosszabb differenciáltsági fok között. Egy munkacsoport új connexin izotípust talált emlőtumorokban, a Cx46-ot, amely úgy tűnik MCF-7 (ösztrogénreceptor pozitív) tumoros sejtvonal hypoxiához való adaptációját segítheti.

A connexinek szerepe emlőrák metasztázisaiban ugyanúgy számos kérdést vet fel. Nem világos, vajon a connexinek elősegítik vagy gátolják a tumorsejtek migrációját, intravasatióját. Ez idáig úgy tűnik, hogy a connexinek kifejeződése a metasztázisokban is dinamikusan változik, egyes connexinek elősegíthetik, mások gátolják a tumor metasztatizáló képességét. Több munkacsoport megerősíti, hogy a tumorsejt képes kapcsolatot kialakítani osteoblast sejtekkel és endothel sejtekkel egyaránt, ami segíthet a tumor metasztázis képzésében. Azt is tudjuk, hogy az emlőrák metasztázis-gátló BMRS1 (breast cancer metasztázis suppressor 1) gén csökkenti az emlőrák áttétképző hajlamát. Egy munkacsoport azt találta, hogy ha BRMS1 cDNS-t juttatják be MDA-MB-435 emlőrák sejtvonalba, képes csökkenteni annak metasztatizáló potenciálját és visszaállítani a homotípusos gap junction intercellularis kapcsolatokat. Egy munkában állatmodellen tanulmányozták emlőrák és melanoma sejtek agyi áttétképződését. A *twist* metasztázis gén aktiválása emlőrákban megnövelte a Cx43 expresszióját és a tumor agyi kolonizációját.

A legújabb irodalmi adatok azt mutatják, hogy a fehérjék kifejeződése dinamikusan változik a tumor fejlődése és progressziója során. Elképzelhető, hogy a primer tumor korai progressziója során bizonyos connexinek szintje csökken, hogy a tumorsejtek közötti fizikai kapcsolat ténylegesen megszűnjön. Majd a tumor újra kifejezheti a connexin fehérjéket, annak

érdekében, hogy terjedni tudjon akár a strómában, vagy be tudjon lépni az érpályába és a metasztázis képzés utolsó lépéseként kolonizálni tudjon egy új szövetben.

2. CÉLKITŰZÉS

Vizsgáltuk:

1. A normál emlőszövet connexin expresszióját a már leírt Cx26 és Cx43 mellett más izotípusokra is.
2. Hogy a primer emlőrákokban a Cx43, Cx26 Cx32 és Cx46 izotípusokon kívül kimutatható-e egyéb connexin.
3. Hogy van-e a connexin mRNS vagy fehérje szintek meghatározásának prognosztikus jelentősége adjuvánsan kezelt emlőrákokban.
4. Hogyan függ össze a connexinek szintje a ma használt prognosztikus markerekkel.
5. Hogy képes-e a connexin mRNS vagy fehérje szinten tovább finomítani az emlőrákok alcsoportjait.
6. Hogyan befolyásolja a connexinek expresszióját a neoadjuváns kemoterápia.
7. Hogy a connexin expresszió segít-e a neoadjuváns terápia eredményességét előre jelezni a klasszifikációs rendszerekbe illesztve.
8. Hogy van-e a connexin szinteknek önálló prognosztikus értékük neoadjuváns kemoterápiában.

3. MÓDSZEREK

Beteganyagok és adatbázisok. Szöveti fehérje vizsgálatokhoz egy hazai és egy külföldi beteganyagot használtunk. A hazai, 127 adjuvánsan kezelt emlődaganatos beteg mintája a Budai MÁV Kórház archívumából (1999-2002) származik, átlagosan 102 hónap követési idővel. A külföldi, 96 neoadjuvánsan kezelt emlőrákos eset Svájc-ból, az Institute of Surgical Pathology anyagából származik (1998-2009), 2-10 év túlélési idővel. Bioinformatikai elemzéshez nyilvánosan elérhető adatbázisban található összesen 1809 (Affymetrix) valamint a 1899 (Illumina) emlőrákos beteg adatait és túlélési információit használtuk fel. Normál emlőszövet vizsgálatához 3, menopausa előtti nő emlőmintáit használtuk.

Szöveti multiblokk készítése. A hazai és külföldi beteganyag formalinban fixált és paraffinba ágyazott mintáiból TMA blokkokat készítettünk. Minden beteghez 2 darab szövethenger tartozott. A hazai beteganyag szövethengerei 2mm, míg a külföldi beteganyag szövethengerei 0,6mm átmérőjűek voltak.

Immunhisztokémia. A magyar esetek altípusának meghatározása a TMA mintákon, a külföldi beteganyag ER, PgR és HER2 vizsgálata a rutin diagnosztika során történt, mindkét anyag a Ventana Benchmark készülékben iVIEW DAB detektáló kit segítségével. A connexinek és a proliferáció immunhisztokémiai vizsgálata 4µm vastag TMA metszeteken történt. Egész éjszakán át tartó primer antitesttel való inkubálás után fluoreszcensen jelölt másodlagos antitesteket használtunk.

Metszetek digitalizálása és értékelése. Az elkészült metszeteket Panoramic Scan metszetszkennelrel digitalizáltuk. A digitalizálás több optikai szinten (3-7) és több csatornán végeztük. A reakciókat két független vizsgáló értékelte TMA modul szoftver segítségével a megegyezésig. A connexinek kifejeződését 4 fokozatú skálán (0:<5%, 1+:5-20%, 2+:20-60%, 3+:>60%) végeztük. A proliferáció értékelése 10 fokozatú skálán (0: 0, 1: 0-1%, 2: 1-5%, 3: 5-10%, 4: 10-15%, 5: 15-20%, 6: 20-33%, 7: 33-50%, 8: 50-66%, 9: 66-80%, 10: 80-100%) történt.

Neoadjuváns terápia regressziós hatásának mérése. A primer szisztémás terápia hatásának méréséhez 5, napjainkban is használt klasszifikációs rendszert használtunk (NSABP, Sataloff, Miller-Payne, EWGBSP, CPS EG), amelyek a reziduális tumorszövet meglétét vagy hiányát illetve klinikai és patológiai paramétereket vesz figyelembe.

Adatbázisok elemzése, statisztikai értékelés. A gén chip mRNS expressziós eredményeket R statisztikai környezetben (R version 2.10.1) vizsgáltuk. A fehérje expressziós adatokat SPSS 15.0 statisztikai szoftverrel értékeltük.

4. EREDMÉNYEK

Munkánk során az alábbi új megállapításokat tettük:

1. A normál emlőszövet a Cx26 és Cx43 fehérjén kívül Cx30, Cx32 és Cx46 fehérjét is expresszál.
2. Primer emlőrák a Cx26, Cx32, Cx43 és Cx46 fehérjén kívül Cx30 fehérjét is kifejezhet.
3. Adjuvánsan kezelt emlőrákokban a Cx43 önmagában pozitív, míg Cx30 fehérje expressziója önmagában negatív prognosztikus faktornak bizonyult, összhangban az mRNS szintekkel.
4. Neoadjuvánsan kezelt emlőrások connexin expressziója és a konvencionális prognosztikus markerek közötti összefüggések:
 - Cx32: pozitív korreláció HER2-vel terápia előtt, negatív korrelációt a pT-vel és Ki67-tel terápia után.
 - Cx43: pozitív korreláció a hormonreceptor (HR) státusszal terápia előtt és után és negatív korreláció a terápia előtti HER2-vel.
 - Cx46 pozitív korreláció a pN-nel, bár ez utóbbi a túléléssel nem függött össze.Adjuvánsan kezelt emlőrások connexin expressziója és a konvencionális prognosztikus markerek közti összefüggések:
 - Cx26: negatív korreláció a Nottingham Prognosztikus Indexszel (NPI).
 - Cx32: pozitív korreláció a grade-del, a nekrozissal, NPI-vel és Ki67-tel, negatív korreláció a HR státusszal.
 - Cx43: pozitív korreláció a HR státusszal, negatív korreláció a grade-del.
 - Cx46: negatív korreláció a grade-del.
5. Nyilvános genomikai adatbázisban vizsgálva az emelkedett Cx43 mRNS szint jobb túlélést mutatott ER pozitív, luminalis A, valamint grade 2-es tumorokban és rosszabb túlélést mutatott ER negatív valamint tripla negatív tumorokban.
Az emelkedett Cx30 mRNS jobb túlélést mutatott ER negatív, HER2 pozitív és tripla negatív tumorokban, rosszabb túlélést pedig ER pozitív és luminalis A illetve B alcsoportban. A két mRNS valószínűleg ellentétesen szabályozódik.
6. Neoadjuváns kemoterápiát követően a connexin szintek dinamikusan változtak. A Cx26 és Cx32 fehérje szintje csökkent, a Cx46 szintje emelkedő tendenciát mutatott, a Cx43 kifejeződése nem mutatott érdemi változást.
7. A Cx26 és Cx46 jó és rossz prognózisú csoportra bontja a közbülső, bizonytalan alcsoportokat az NSABP pINV, Miller-Payne G, Sataloff T, EWGBSP TR és CPS EG klasszifikációs rendszerekben.

8. A klasszifikációs rendszerek közbülső csoportjaiban (EWGBSP TR2b, Sataloff TB, Miller-Payne G3) a kemoterápia előtti Cx46 expresszió az egyetlen potenciális prognosztikus faktor, amely szignifikánsan összefügg a túléléssel.

5. KÖVETKEZTETÉSEK

A connexinek és az általuk formált gap junction csatornák kifejeződése dinamikusan változik a carcinogenesis és a tumor progressziója, metasztázis képzése során. Emlőrákokban betöltött szerepük a mai napig tisztázatlan és ellentmondásos.

Munkánkban megállapítottuk, hogy a connexineknek önmagukban is van prognosztikus értékük. Bioinformatikai elemzés kapcsán a legerősebb tényezőnek az ellentétes regulációt mutató Cx43 és Cx30 mRNS bizonyult. Az emelkedett Cx43 szint szignifikánsan jobb túlélést mutatott ER pozitív, nyirokcsomó negatív és grade 2-es tumorokban, viszont a rosszabb túléléshez kapcsolódott ER negatív esetekben. Az emelkedett Cx30 expresszió jobb túlélést mutatott ER negatív, HER2 pozitív és tripla negatív daganatokban, de a rosszabb túléléshez kapcsolódott ER pozitív tumoroknál. Az eredményeket adjuvánsan és neoadjuvánsan kezelt emlőrákokon fluoreszcens immunhisztokémia segítségével validáltuk. A fehérje szintű vizsgálataink eredményei a Cx26 és a Cx32 esetében csak részben fedtek át az mRNS profillal, amit a connexinek komplex, poszttranszlációs, epigenetikai és degradációs változásai mellett a tumor kezelése is befolyásolhat.

Fehérje szinten legmegbízhatóbbnak adjuváns kezelés kapcsán a Cx43 és Cx30 bizonyult, amely önálló pozitív illetve negatív prognosztikus faktorként is megállja a helyét. Ezen felül a Cx43 tovább finomította a grade 2-es daganatokat, a Cx30 pedig a grade 3-as daganatokat jó és rossz prognózisú alcsoportokra.

Neoadjuváns kezelés kapcsán a connexinek kifejeződése dinamikus változást mutat. A terápia hatékonyságát jelzi a Cx26 és Cx32 csökkenése valamint a Cx46 szintjének emelkedése. A terápia hatására lecsökkenő Cx26 szintje szignifikánsan jobb túléléshez kapcsolódott beteganyagunkban. Legfontosabb megfigyelésünk, hogy a kemoterápia előtti és utáni Cx46 expresszió illetve a kemoterápia utáni Cx26 expresszió tovább finomítja a klasszifikációs rendszerek által meghatározott közbülső kategóriákat, létrehozva ezzel egy prognosztikailag kedvezőbb alcsoportok a Miller-Payne G2-3-ban, a Sataloff TB-ben, az EWGBSP TR2b-ben illetve a CPS EG 4-ben. Ráadásul a kemoterápia előtt a Cx46 fehérje expresszió volt az egyetlen paraméter, amely korrelált a teljes túléléssel.

Ezen felül normál emlőhámában elsőként mutattuk ki a Cx30, Cx32 és Cx46 fehérjét, illetve primer emlőrákban a Cx30 kifejeződését mi írtuk le elsőként.

A DISSZERTÁCIÓHOZ KAPCSLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK

- 1) Krenacs T, Zsakovics I, Diczhazi Cs, Ficsor L, Varga V S, Molnar B: The Potential of Digital Microscopy in Breast Pathology.
Pathol. Oncol Research 2009;15:55-58. IF= 1,152

- 2) Teleki I, Krenacs T, Szasz MA, Kulka J, Wichmann B, Leo C, Papassotiropoulos B, Riemenschnitter C, Moch H, Varga Z: The potential prognostic value of connexin 26 and 46 expression in neoadjuvant-treated breast cancer.
BMC Cancer 2013;13:50. IF=3,319

- 3) Teleki I, Szasz AM, Maros ME, Gyorffy B, Kulka J, Meggyeshazi N, Kiszner G, Balla P, Samu A, Krenacs T: Correlation of differentially expressed gap junction Cx26, Cx30, Cx32, Cx43, Cx46 with breast cancer progression and prognosis.
PLos One 2014;9(11) IF=3,534

A DISSZERTÁCIÓTÓL FÜGGETLEN KÖZLEMÉNYEK

- 1) Tamás L, Szentkúti G, Eros M, Dános K, Brauswetter D, Szende B, Zsákovics I, Krenács T. Differential biomarker expression in head and neck cancer correlates with anatomical localization.
Pathol Oncol Res 2011;17(3):721-7 IF=1,366
- 2) Rác G, Csenki Z, Kovács R, Hegyi A, Baska F, Sujbert L, Zsákovics I, Kis R, Gustafson R, Urbányi B, Szende B. Subacute toxicity assessment of water disinfection byproducts on zebrafish.
Pathol Oncol Research 2012;18(3):579-84 IF=1,555
- 3) Krenacs T, Kiszner G, Stelkovics E, Balla P, Teleki I, Nemeth I, Varga E, Korom I, Barbai T, Plotar V, Timar J, Raso E: Collagen XVII is expressed in malignant but not in benign melanocytic tumors and it can mediate antibody induced melanoma apoptosis.
Histochem Cell Biol 2012;138(4):653-67 IF=2,613
- 4) Riemenschnitter C, Teleki I, Tischler V, Guo W, Varga Z: Stability and prognostic value of Slug, Sox9 and Sox10 expression in breast cancers treated with neoadjuvant chemotherapy.
Springerplus 2013;2:695 IF=2,851
- 5) Meggyeshazi N, Andocs G, Balogh L, Balla P, Kiszner G, Teleki I, Jeney A, Krenacs T. DNA fragmentation and caspase-independen programmed cell death by modulated electrohyperthermia.
Strahlenter Onkol 2014;190(9):815-22 IF=2,733
- 6) Kiszner G, Wichmann B, Nemeth IB, Varga E, Meggyeshazi N, Teleki I, Balla P, Maros ME, Penksza K, Krenacs T. Cell cycle analysis can differentiate thin melanomas from dysplastic nevi and reveals accelerated replication in thick melanomas.
Virchows Arch 2014;465(5):603-12 IF=2,560

- 7) Andocs G, Meggyeshazi N, Balogh L, Spisak S, Maros ME, Balla P, Kiszner G, Teleki I, Kovago C, Krenacs T. Upregulation of heat shock proteins and the promotion of damage-associated molecular pattern signals in a colorectal cancer model by modulated electrohyperthermia.
Cell Stress Chaperones 2015;20(1):37-46 IF=2,537

- 8) Rajnai H, Teleki I, Kiszner G, Meggyeshazi N, Balla P, Vancsik T, Muzes Gy, Csomor J, Matolcsy A, Krenacs T. Connexin 43 communication channels in follicular dendritic cell development and in follicular lymphomas.
J Immunol Res. 2015 IF=2,934

- 9) Bánfi G, Teleki I, Nyírádi P, Keszthelyi A, Romics I, Fintha A, Krenács T, Szenda B. Changes of protein expression in prostate cancer having lost its androgen sensitivity.
Int Urol Nephrol 2015 May 8. (Epub ahead of print) IF=1,293