

**Aquaporin-1 expresszió jelentősége után melanoma
metasztatikus progressiója során**

Doktori tézisek

Dr. Imrédi Eleonóra

Semmelweis Egyetem

Patológiai Tudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Tímár József, DSc, egyetemi tanár
Hivatalos bírálók:

Dr. Méhes Gábor, DSc, egyetemi tanár

Dr. Kárpáti Sarolta, DSc, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Wikonkál Norbert, DSc, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Lakatos Péter, DSc, egyetemi tanár

Dr. Jäckel Márta, PhD, osztályvezető főorvos

Budapest
2019

Bevezetés

A melanoma malignum (MM) a pigmenttermelő melanocitákból kialakuló malignus tumor, melynek incidenciája világszerte emelkedő tendenciát mutat. 2011-ben a melanoma incidenciája 19,7:100 000 volt, míg a 2010 és 2014 közötti periódusban 33:100 000 lakosra emelkedett. Négy fő típusa ismert, a felszínesen terjedő melanoma (SSM), a nodularis melanoma (NM), a lentigo maligna melanoma (LMM) és az akrolentiginózus melanoma (ALM). A melanoma sokszínű előfordulási gyakoriságáért a különböző etnikai csoportokban és földrajzi területeken környezeti és genetikai rizikófaktorok kölcsönhatása felelős. A kután melanoma legfontosabb prognosztikus faktorai közé tartozik az életkor, a férfi nem, a Breslow-féle tumorvastagság, az ulceráció, a tumort infiltráló limfociták denzitása, a mikroszatelliták jelenléte, a mitotikus ráta, a vaszkuláris és/vagy limfatikus invázió.

A IV-es stádiumú melanomás betegek túlélése kezelés nélkül rendkívül alacsony. A kemoterápia alacsony hatékonysága új terápiás célpontok felderítését teszi szükségessé. Az elmúlt években két új terápiás stratégia

vált elérhetővé melanoma kezelésében, az immunterápia és a célzott terápia. Bár az új megközelítések a betegek progressziómentes és teljes túlélését egyaránt szignifikánsan javították, továbbra is széleskörű kutatások zajlanak a melanoma malignum tumorbiológiájának részletesebb megértése, és új terápiás célpontok meghatározása céljából.

Az aquaporinok kisméretű hidrofób transzmembrán fehérjék, melyek elsődleges szerepe a sejten keresztüli víztranszport szabályozása az ozmotikus grádiensnek megfelelően. Különböző eredetű tumorsejtek - emlődaganatok, colontumorok, tüdő- adenocarcinomák, epeúti daganatok és a központi idegrendszeri daganatok - kifejezett aquaporin-expressziót mutatnak. Az AQP1 génnel transzfektált B16F10 egér melanomasejtek kétszer, illetve háromszor gyorsabb migrációs képességet mutattak in vitro körülmények között a kontroll B16F10 sejtekhez képest, míg csökkent tumornövekedést és angiogenezist dokumentáltak az AQP1 knock-out egerekben. Az AQP1 inhibitor siRNAs intra-tumorális injekciója szintén csökkent tumornövekedést eredményezett állatmodellekben. Az experimentális evidenciák ellenére ezidáig nem volt elérhető klinikai

adat az AQP1 prognosztikai jelentőségéről humán melanomában.

Célkitűzések

- 1.) Az AQP1 fehérje expressziójának vizsgálata formalin fixált, paraffinba ágyazott primer kután melanoma mintákon immunhisztokémiai módszerrel.
- 2.) Az AQP1 fehérje expressziója és az AQP1 prognózisát befolyásoló standard hisztopatológiai paraméterek és a BRAF mutációs státusz összefüggésének vizsgálata.
- 3.) Az AQP1 fehérje kifejeződése és a melanoma klinikai kimenetele közötti korreláció vizsgálata.
- 4.) Az AQP1 fehérje expressziójának vizsgálata cerebralis áttétet adó primer kután melanomában.
- 5.) Az AQP1 fehérje expressziójának megfigyelése melanoma intracerebralis metasztázisaiban.

Módszerek

Kutatásunk során az Országos Onkológiai Intézet Onkodermatológiai Osztályán és a Semmelweis Egyetem Bőr-, Nemikórtani és Bőronkológiai Klinikáján a 2003 és 2014 közötti periódusban utánkövetett, összesen 121,

kután melanoma miatt kezelt beteg adatait és szövettani mintáit dolgoztuk fel.

Az AQP1-expresszió általános prognosztikai jelentőségét vizsgáló tanulmányunk alapját a Semmelweis Egyetem Bőr-, Nemikórtani és Bőronkológiai Klinikájának 78, primer kután melanomával diagnosztizált és kezelt betegének hosszú távú klinikai utánkövetése jelentette. A primer kután melanomát valamennyi betegnél 2003 és 2004 között diagnosztizálták és távolították el sebészileg a Klinikán. A betegeket retrospektíven két csoportba soroltuk a műtétet követő 5 éves utánkövetésben dokumentált progressziójuk alapján. Az alacsony rizikócsoportba tartozó betegeknél a kutatásba való bevonás idején nem volt igazolható áttét, szemben a magas rizikójú csoporttal. Az agyi áttétre fókuszáló vizsgálatunkba a két intézményben kezelt, összesen 67 metasztatikus melanomában szenvedő beteg került bevonásra. Két csoportra osztottuk a követett betegeket, a kizárólag extracranialis metasztázissal (EC) rendelkező 23 beteg esetében agyi metasztázist kizártunk, míg a 44 beteget számláló intracranialis áttétes csoportban (BR) kontrasztanyagot MRI-vizsgálattal igazolódott az agyi áttét. 5 betegnél került sor az agyi metasztázisok

idegsebészeti eltávolítására az Országos Klinikai és Idegtudományi Intézetben, ezekből a daganatokból szövettani mintát nyertünk.

Formalinban fixált, paraffinba ágyazott (FFPE), primer tumort tartalmazó blokkokból 5 mikrométer vastag metszeteket készítettünk. Deparaffinálást követően 7D11 típusú, egér monoklonális anti-AQP1 primer antitesttel inkubáltuk a metszeteket. A másodlagos antitest kimutatására a Novolink Polymer Detection System detektációs rendszert használtuk 60 percig szobahőmérsékleten. Az előhíváshoz AEC Peroxidase Substrate Kit rendszert alkalmaztunk a protokollnak megfelelően. A primer antitest optimális hígítását manuálisan határoztuk meg, majd immunfestő automatával végeztük el a metszetek immunhisztokémiai jelölését.

A metszetek kiértékelésére a H-score 0-tól 300-ig terjedő pontozási rendszert alkalmaztunk. A jelölt sejteket a jel erőssége alapján enyhe (1+), közepes (2+) és erősen (3+) pozitív jelölődésű kategóriákba soroltuk, majd az egyes kategóriákba tartozó sejtek százalékos arányát meghatároztuk a tumorsejtek összesített számához

viszonyítva, végül az így kapott számot megszoroztuk a kategória számmal és összeadtuk a kapott értékeket. A maximális érték így 300, amennyiben valamennyi tumorsejt maximális intenzitással jelölt.

A betegek formalinban fixált, paraffinba ágyazott melanoma mintáiból BRAF V600 mutáció meghatározást is végeztünk polimeráz láncreakció (PCR) és restrikciós fragment hossz polimorfizmus (RFLP) segítségével. A melanoma mintákból a DNS-izolálásához High Pure PCR Template Preparation Kitet alkalmaztunk. A PCR reakció kivitelezése a standard protokolloknak megfelelően történt a kereskedelemben elérhető BRAF V600 primerekkel. A PCR reakciót Swift Max Pro Thermal Cycler készülékkel végeztük el. A PCR termékek szétválasztására 3%-os agarózgél, míg detektálásukra ethidium-bromid festést követően Gel-Doc 2000 rendszert használtunk (Bio-Rad, Life-Science, Hercules, California, USA). A PCR amplifikációval egy 224 bázispárnyi terméket kaptunk, melyet TspRI restrikciós endonukleázzal emésztettünk. A TspRI restrikciós enzim hatására a 224 bázispárnyi termékből keletkezett egy 212 bázispárnyi termék, mely a mutáns

allélt, míg a reziduális rész a vad típust reprezentálta. A mutációk igazolására Sanger-szekvenálást alkalmaztunk.

A statisztikai értékeléseket Statsoft 10 Software segítségével végeztük el. A különböző betegkohorszok klinikai és patológiai jellemzőinek összehasonlítására Mann–Whitney U-tesztet, χ^2 -tesztet és Fischer's egzakt tesztet használtunk. Az egyes paraméterek közötti összefüggések igazolására Spearman-féle rangkorrelációt alkalmaztunk. Kaplan-Meier módszerrel becsültük meg a túlélési valószínűségeket, míg a különbségek értékelésre a log-rank teszt szolgált. Az AQP1- expresszió túlélésre és metasztatikus progresszióra gyakorolt független prognosztikus értékének meghatározására a Cox proportional hazards modellt alkalmaztuk. A teszteket kétoldali (two-tailed), 95%-os konfidenciaintervallummal értékeltük, szignifikánsnak tekintettük az eredményt, amennyiben a p értéke kisebbnek adódott, mint 0,05.

Eredmények

Az alacsony rizikócsoportba tartozó páciensek (AR) (n=50) nem mutattak progressziót a műtétet követő öt évben, míg a magas rizikójú betegeknél (MR)(n=28) korai áttétek kialakulását dokumentálták. A betegek

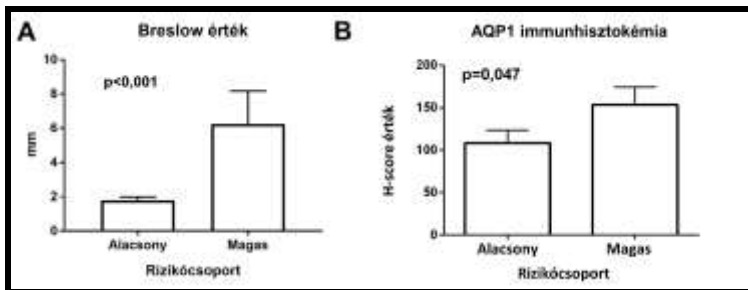
életkorának tekintetében nem volt szignifikáns különbség ($p=0,63$) a két csoport között. A kután melanoma validált prediktív faktorainak tekintetében a két rizikócsoportcsoport szignifikáns különbségeket mutatott. A mitotikus index, a Clark szint, az ulceráció és a Breslow vastagság egyaránt szignifikánsan magasabb volt a magas rizikójú csoportban

Az MR csoportba sorolt betegek várható prognózisa a jelentős számú központi-idegrendszeri (21%), hasi-belsőszervi (21%) és tüdő áttét (19%) kialakulása miatt jóval rosszabb volt, és szignifikánsan ($p=0,00$) alacsonyabb teljes túlélést dokumentáltunk az utánkövetés során.

Az AQP1 immunhisztokémiai kifejeződését 78, primer kután melanomában szenvedő beteg esetében értékeltük, akik két különböző becsült prognózissal rendelkező kohorszot alkottak. A pozitív AQP1-reakció esetén az endothelsejtek piros membránfestődést, míg a tumorsejtek citoplazmatikus és membránfestődést egyaránt mutattak. A vizsgált betegpopuláció 66,7%-a (52 eset) expresszáta az aquaporin-1-et, a median H-score 124,24 (0-300) volt.

Legfontosabb megfigyelésünk szerint szignifikánsan magasabb AQP1 H-score ($p=0,047$) jellemezte a magas rizikójú melanomás betegek csoportját az alacsony rizikójú betegekkel összehasonlítva (1.ábra).

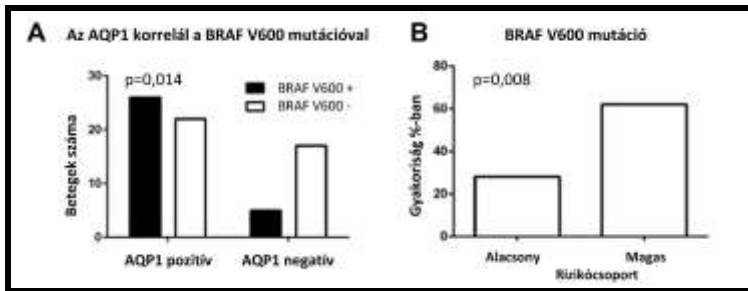
A Spearman-féle rangkorreláció során az AQP1 H-score-t a melanoma progressziójában szerepet játszó prognosztikai faktorokkal hasonlítottuk össze, azonban nem találtunk szignifikáns összefüggést a mitotikus indexszel ($p=0,42$), a Clark szinttel ($p=0,95$) és a Breslow-féle tumorvastagsággal sem ($p=0,51$).



1. ábra Breslow érték és AQP1 protein expresszió az alacsony és a magas rizikójú betegcsoportokban. Az oszlopok az ábra bal oldalán szignifikánsan ($p=0,000$) magasabb Breslow értéket mutattak a magasabb rizikójú betegek esetében (A), ugyanezen betegcsoportok AQP1 H-pontszáma is szignifikánsan magasabb volt ($p=0,047$).

Az oszlopok az átlagokat, a hibajelek az átlag szórását jelenítik meg.

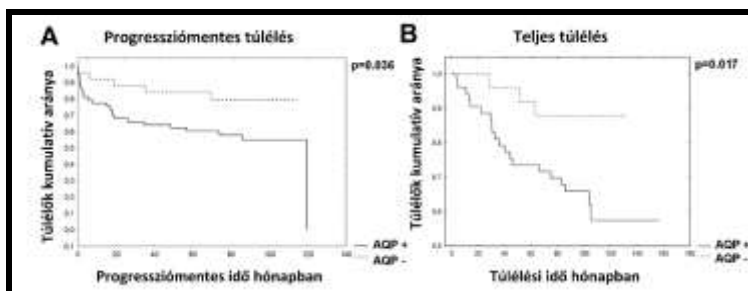
Sikeres BRAF V600 mutáció analízist 70 mintából sikerült kivitelezni, mely az immunhisztokémiai esetek 89,4%-t jelentette. A mutáns allél 31 mintában fordult elő, így a vizsgált betegpopulációban a BRAF V600 mutáció előfordulása 44,29%-os volt. A mutáns allél jelenléte szignifikánsan alacsonyabb volt ($p=0,008$) az alacsony rizikójú kohorszban ($n=14/45$; 31%), mint a magas rizikójú betegek esetében ($n=16/25$; 64%) (2. ábra B). Fontos megjegyezni, hogy szignifikáns összefüggést detektáltunk az AQP1 fehérje kifejeződése és a BRAF V600 mutáció között ($p=0,014$) (2. ábra A).



2. ábra A BRAF V600 mutációk előfordulási gyakorisága az alacsony és magas rizikójú betegcsoportokban (B), valamint a mutáció előfordulásának összefüggése az AQP1- expresszióval. A

magas rizikócsoportokban szignifikánsan magasabb volt a *BRAF* V600 mutáció előfordulási gyakorisága ($p=0,008$), és a mutáció előfordulása szignifikáns korrelációt mutatott az *AQP1* protein expresszióval ($p=0,014$)

Az *AQP1* expressziójának metasztatikus progresszióra és túlélésre kifejtett hatását Kaplan-Meier módszerrel és log rank teszttel vizsgáltuk. Az *AQP1*-pozitív kután melanomás eseteknél mind a progressziómentes túlélés ($p=0,036$), mind a teljes túlélés ($p=0,017$) szignifikánsan alacsonyabb volt (3. ábra A, B).



3. ábra Az *AQP1*-pozitív (*AQP+*) és az *AQP1*-negatív (*AQP-*) kután melanomás betegek progressziómentes és teljes túlélésének ábrázolása Kaplan-Meier görbékkel: szignifikáns különbség látható a progressziómentes

túlélés (A) ($P=0,038$) és a teljes túlélés (B) ($P=0,017$) tekintetében egyaránt.

Az AQP1 független prognosztikus értékét is vizsgáltuk a betegpopulációban, melyhez Cox-féle hazard modellt alkalmaztunk lépcsőzetes logisztikus regresszióval. A modell számítása során bevonásra kerültek az ulceráció, a mitotikus index, a Breslow-féle tumorvastagság, az életkor, a férfi nem az AQP1-expresszió mellett. Az analízis során nem igazolódott az AQP1 független prediktor szerepe sem a progressziómentes, sem a teljes túlélésre vonatkozóan.

Az AQP1-expresszió és az intracranialis progresszió összefüggését két konszekutív, extracranialis (EC) ($n=23$), illetve intracranialis (BR) ($n=44$) metasztatikus betegcsoporton vizsgáltuk. A két betegcsoport a kiindulási komorbiditásokban és a standard prediktív markerek tekintetében nem különbözött szignifikánsan.

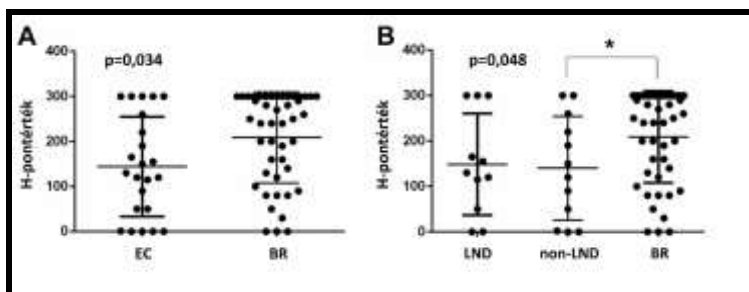
A részletes klinikai utánkövetés median ideje 66,5 hónap (minimum 3,8 hónap; maximum 186,7 hónap) volt az extracranialis csoportban, míg mindössze 40,4 hónap (minimum 4 hónap, maximum 227 hónap) az intracranialis csoportban.

Az AJCC (American Joint Committee on Cancer) legújabb ajánlása szerint osztályozva az extracranialis terjedést mutató melanoma eseteket: a betegek 48 %-a (n=11) az M1a kategóriába tartozott, mivel kizárólag subcutan illetve nyirokcsomó áttétet hordozott, míg 26%-nál (n=6) tüdő áttétet (M1b) és 26%-nál (n=6) viscerális metasztázist detektáltunk (M1c).

Az intracranialis áttétet hordozó betegek (M1d) teljes túlélése vizsgálatunkban szignifikánsan alacsonyabb volt a többi extracranialis áttétes melanómában szenvedő beteggel összehasonlítva (55,1 vs 83,0 hónap a primer tumor detektálását követően, $p=0,03$).

Az intracranialis áttétet adó primer melanomák AQP1-expressziója magasabb az extracranialis áttétet adó melanomáknál. A pozitív AQP1-jelölődés esetén az endothelsejtekben vörös membránfestődést észleltünk, míg a tumorsejtek citoplazmatikus és membránpozitivitást egyaránt mutattak a primer tumorban. Agyi metasztázisban a korábbi közleményekkel összhangban a kapilláris endothelsejtek nem expresszálták az AQP1-et.

Az AQP1-jelölődést mutató melanomasejteket a primer tumorok 89.56%-ában (60 eset) detektáltunk. A H-score median középértéke 187,00 (0; 300) volt a vizsgált populációban. Az intracranialis csoportban szignifikánsan magasabb AQP1 H-score-t észleltünk az extracranialis csoporthoz képest ($p = 0.019$), míg szignifikáns eltérést nem találtunk a standard hisztopatológiai marker Breslow tumorvastagság tekintetében (4. ábra).

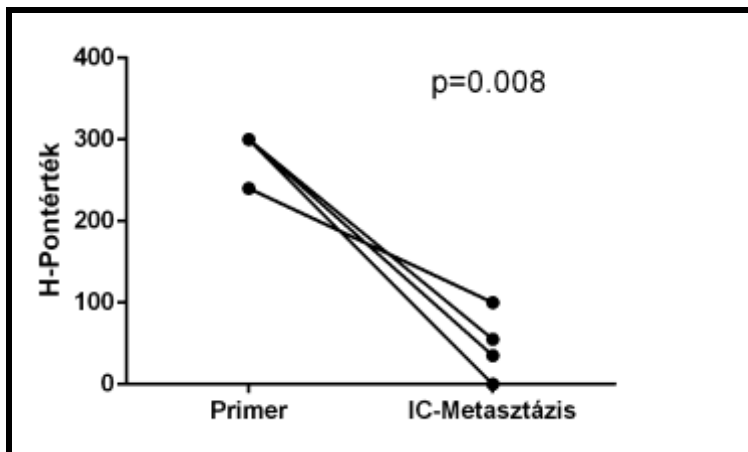


4. ábra Az AQP1-expressziója az extracranialis (EC) és az intracranialis (IC) metasztatikus melanomás betegek csoportjaiban (A). Az AQP1 expressziója a nyirokcsomó áttéteket (LND-EC), a viszcerális áttéteket (non-LND-EC) és az agyi áttétes (IC) csoportokban (B). Az intracranialis progressziót mutató primer tumorok AQP1 expressziója magasabb az extracranialis csoportokénál.

Az egyes eseteket pontok jelölik, míg a vonalak az átlagot és a standard deviációt mutatják.

Mivel az EC csoport heterogénen tartalmazott vizszerális és nyirokcsomó metasztázisokat, összevetettük a nyirokcsomó áttéteket (LND) a vizszerális (non-LND) és cerebrális metasztázist (BR) hordozó csoportokkal. Statisztikai analízisünk azt mutatta, hogy a nyirokcsomó és a vizszerális metasztázis esetei AQP1 expressziójukban nem különböztek egymástól, míg a vizszerális metasztázist mutató esetek AQP1 expressziója szignifikáns mértékben különbözött az agyi áttétesektől ($p=0,048$) (4.B ábra).

Az AQP1 H-score tekintetében szignifikánsan alacsonyabb értékeket találtunk az agyi áttétekben a primer tumorok immunhisztokémiai értékeivel összehasonlítva ($p=0,01$): a primer tumorok AQP1 H-pont középértéke 300,0, a metasztázisokban a H-középérték mindössze 35,0 volt (5. ábra).



5. ábra Az összetartozó primer és metasztatikus daganatok összehasonlító elemzése során az AQP1-expresszió szignifikánsan alacsonyabbnak mutatkozott az intracranialis metasztázisokban, mint a primer tumorokban ($p=0,01$).

Az AQP1 fehérje tumoron belüli eloszlását vizsgálva az intracranialis metasztatikus mintákban azt találtuk, hogy az AQP1-pozitív tumorsejtek a mikroerektől távolabbi területeket foglalták el, míg a vaszkuláris struktúrákkal szomszédos melanomasejtek kevésbé expresszálták az AQP1 fehérjét.

Következtetések

1. Kimutattuk az AQP1 immunhisztokémiai kifejeződését primer kután melanómában szenvedő betegek két különböző becsült prognózissal rendelkező csoportjában. Szignifikánsan magasabb AQP1 H-score értékeket detektáltunk a magas rizikójú melanomás betegek csoportjában az alacsony rizikójú betegekkel összehasonlítva.
2. A BRAF V600 mutáció jelenléte szignifikánsan alacsonyabb volt az alacsony rizikójú kohorszban, mint a magas rizikójú betegek esetében. Szignifikáns összefüggést detektáltunk az AQP1 kifejeződés és a BRAF V600 mutáció megjelenése között.
3. Az AQP1-pozitív kután melanomás eseteknél mind a progressziómentes túlélés, mind a teljes túlélés szignifikánsan csökkent az AQP1-negatív kután melanomás esetekkel összehasonlítva.
4. Az intracranialis áttétet hordozó betegek (M1d) teljes túlélése szignifikánsan alacsonyabb volt a többi áttétes melanómában szenvedő beteggel összehasonlítva.
5. Az AQP1-pozitív melanoma sejtek egyenlőtlen eloszlást mutattak az intracerebrális metasztázis mintákban, az AQP1-pozitív tumorsejtek a mikroerektől távolabbi területeket foglalták el, míg a vaszkuláris struktúrákkal

szomszédos melanoma sejtek kevésbé fejezték ki az AQP1 fehérjét.

6. Az intracranialis áttétet adó primer tumorok AQP1-kifejeződése szignifikánsan magasabb az extracranialis áttétet adó primer melanomákénál.
7. Az összetartozó primer és metasztatikus melanomák összehasonlító elemzése során az AQP1-fehérje expresszió szignifikáns csökkenését dokumentáltuk az intracranialis progresszió során

Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

Imrédi E, Liskay G, Kenessey I, Plotár V, Gödény M ;
Tóth B, Fedorcsák I, Tímár J.

Aquaporin-1 Protein Expression of the Primary Tumor
May Predict Cerebral Progression of Cutaneous
Melanoma.

PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH

DOI: 10.1007/s12253-018-0513-6 6p. (2018)

IF:1,935

Imrédi E, Toth B, Doma V, Barbai T, Raso E, Kenessey
I, Timar, J

Aquaporin 1 protein expression is associated with BRAF
V600 mutation and adverse prognosis in cutaneous
melanoma.

MELANOMA RESEARCH 26:3pp. 254-260. (2016)

IF:2,615

Az értekezés részét nem képező közlemények:

Imrédi E, Plotár V, Szavcsúr P, Pánczél G, Melegh K,
Schlachter K, Liskay G.

Metasztatikus progresszió kezelése primer cutan és
ocularis melanoma szinkrón előfordulását követően.

ORVOSI HETILAP 159: 16 pp. 642-647. 6 p. (2018)

IF:0,322