

Ritka húgyhólyagdaganatok molekuláris vizsgálata

Habina-Nagy Nikolett

Semmelweis Egyetem

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. habil. Szarvas Tibor, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Hivatalos bírálók: Dr. Alpár Donát, Ph.D., tudományos főmunkatárs
Dr. Árvai Kristóf, Ph.D., biológus

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Ács Nándor, Ph.D., egyetemi tanár

Tagok: Dr. Papp Gergő, Ph.D., tudományos munkatárs
Dr. Füle Tibor, Ph.D., szaktanácsadó

Budapest
2022

1. Bevezetés

A húgyhólyag daganatos megbetegedéseiből világszerte évente mintegy 550.000 új esetet regisztrálnak. A húgyhólyagdaganatok szövettani szempontból az esetek túlnyomó többségében urothelsejtes megjelenést mutatnak. Egyéb hisztológiai variánsai, mint például az adenocarcinomai (ADC) jóval ritkábban, az esetek csupán mintegy 0,5% - 2%-ban fordulnak elő. Ezek a primer tumor lokalizációja alapján lehetnek a húgyhólyag primer hólyag adenocarcinomai (PBAC) vagy az urachális eredetű ún. urachus carcinomák (UrC).

Az urachus, a sinus urogenitalis fejlődési maradványa, mely a magzati élet során a köldököt köti össze a húgyhólyag kupolájával és a kiválasztásban játszik fontos szerepet. Az urachus csatorna azután fokozatos kötőszövetesedéssel degradálódik, mely a felnőttek körülbelül harmadában tökéletlenül megy végbe. A fennmaradó urachus maradványban rosszindulatú elváltozások is kialakulhatnak, melyet urachus carcinomának (UrC) nevezünk. Tünetei többnyire későn, a daganat hólyagra történő terjedése nyomán jelentkeznek, ezért a diagnózis felállításakor az UrC általában már előrehaladott stádiumban van.

A PBAC egy igen ritka malignus elváltozás, mely ugyan a húgyhólyag urotheliumából ered, ám tisztán mirigyes/glandularis fenotípust mutat. A PBAC legtöbb esetben a hólyag trigónumából, vagy a hátsó falából indul ki, de a húgyhólyagon belül bárhol

kialakulhat. A PBAC általában agresszív tumor, amely a diagnózis pillanatában jellemzően szintén előrehaladott stádiumban van és az esetek 25-40%-ban már a nyirokcsomókat is érinti.

A két betegség elkülönítése gyakran nagy kihívást jelent, melynek azonban - eltérő sebészi kezelési lehetőségeiket tekintve - jelentős terápiás következményei vannak. Kezelésüket tekintve eddig csupán sebészi terápiájukat illetően született konszenzus. Ritka előfordulásukból adódóan szisztémás kezelésükkel kapcsolatban nem készültek prospektív klinikai vizsgálatok, így a megfelelő gyógyszer megválasztása szükségszerűen egyéni döntéseken alapul. Klinikai vizsgálatok hiányában ígéretes alternatívát a célzott terápiás szerek alkalmazása jelentheti.

Molekuláris háttérüket tekintve is csupán csekély mennyiségű információ áll rendelkezésünkre. A genetikai profiljuk megismerése segíthetné a diagnózis és prognózis felállítását, valamint a genetikai eltérések egy része terápiás célpontként szolgálhat, így a molekuláris eltérések ismerete a betegség kezelése szempontjából is meghatározó lehet.

2. Célkitűzés

1. Egy UrC és PBAC szövet- és adatgyűjtemény létrehozása:
 - A) Nemzetközi kooperáció keretében
 - B) Hazai gyűjtés a Nemzeti Rákregiszter (NR) segítségével (TUKEB eng.sz.: 74/2016).
2. DNS szintű vizsgálatok terápiás célpontok azonosítása és a PBAC és UrC molekuláris taxonoiájának pontosítása céljából:
 - A) 161 onkológiai szempontból releváns gén új-generációs szekvenálása (NGS) az Oncomine™ Comprehensive Assay v3 (OCAv3) panel segítségével.
 - B) 6 gén célzott vizsgálata beleértve a colorectalis carcinoma (CRC) patogenezisében fontos szerepet betöltő *APC* és terápiaerezisztencia előrejelzésében fontos *PTEN* gént.
3. Az OCAv3 panellel azonosított patogén eltérésekre javallt, illetve ellenjavallt hatóanyagok azonosítása a Qiagen Clinical Insight (QCI) bizonyítékokon alapuló, terápiás döntéshozatalt támogató szoftver segítségével.
4. A PTEN, β -catenin és mismatch repair (MMR) fehérjék vizsgálata IHC módszerrel.
5. Eredményeink irodalmi kontextusba helyezése, mind a PBAC, mind pedig az UrC esetében.

3. Módszerek

Munkánk során hazai és külföldi kooperációs partnerek bevonásával egy világviszonylatban is egyedülálló méretű UrC és PBAC gyűjteményt hoztunk létre. A hazai eseteket a NR segítségével, az európai eseteket pedig nemzetközi kooperációk által térképeztük fel.

A NR 2001-2016 között gyűjtött adataiban BNO és morfológiai kódokkal 3 szűrést hajtottunk végre: UrC (C67.7), húgyhólyag kupola (C67.1) daganatai, húgyhólyag és ADC (C67/81403) morfológiai kóddal kombinált szűrés. Az így azonosított betegek esetében a kezelő intézményeket írásos formában kerestük fel a diagnózis megerősítése céljából. A megerősített UrC, illetve PBAC diagnózisú betegek esetében az adott klinikáktól klinikopatológiai adatokat, valamint paraffinba ágyazott tumormentes és tumortartalmú szövetmintákat kértünk. A klinikopatológiai adatokat a kezelő intézmények egy általunk előre elkészített egységes adattáblázatba vezették be.

A nemzetközi mintagyűjtés során kooperációs partnereinktől azt kértük, hogy az elfogadott diagnosztikai kritériumoknak megfelelően azonosítsák az intézményeikben ellátott UrC és PBAC betegeket, majd töltsék ki számunkra ugyanazokat a standardizált adattáblázatokat, amelyeket a hazai esetgyűjtés során is használtunk. Ezen felül az UrC és PBAC betegek formalin-fixált, paraffinba ágyazott (FFPE) szövetmintáit

kaptuk meg, szövetblokkok vagy esetenként 10-20 natív 10 mikronos metszet formájában.

A különböző vizsgálatok részben a mintagyűjtéssel párhuzamosan zajlottak, ezért az egyes vizsgálatokhoz gyakran eltérő számú, ám részben/egészben átfedő betegek mintáit használtuk.

A DNS szintű vizsgálatainkat, az alábbiak szerint végeztük el:

- A) Illumina MiSeq (6 gén) vizsg.: 40 UrC beteg
- B) IonTorrent (161 gén) vizsg.: 54 beteg (UrC: n=41, PBAC n=13)
- C) MSI (mikroszatellita instabilitás) vizsg.: 63 UrC beteg.

A fehérje szintű vizsgálatainkat az alábbiak szerint végeztük el:

- A) PTEN és β -catenin IHC vizsg.: n=40 UrC
- B) MMR fehérjék IHC vizsg.: 82 beteg (UrC: n=63, PBAC: n=19)

Illumina MiSeq (6 gén) vizsgálat

Összesen 40 UrC beteg esetében célzott NGS eljárással vizsgálatokat végeztünk (*APC*, *DICER1*, *PRKARIA*, *PTEN*, *TSHR*, *WRN*). A patogenitás meghatározása, vagyis az annotálás nyílt adatbázisok felhasználásával történt.

A β -catenin fehérje IHC vizsgálatát 38 UrC beteg FFPE tumormintáin végeztük el, míg a PTEN fehérje IHC vizsgálatára 30 UrC beteg FFPE tumormintája állt rendelkezésünkre. A

vizsgálatokhoz minden esetben 3 µm vastag FFPE metszeteket használtunk, a festés pedig a Ventana Benchmark Ultra rendszeren történt. A megjelenítés PotiView DAB rendszeren keresztül zajlott.

A statisztikai analízist SPSS szoftverrel végeztük (v24, IBM). A Kaplan-Meier túlélési elemzést log-rank teszttel kiegészítve alkalmaztuk. Az egyes paraméterek túléléssel való összefüggéseinek további vizsgálatára egyváltozós Cox regresszió analízist végeztünk. A $p \leq 0,05$ értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

Mikroszatellita instabilitás (MSI)-vizsgálat

Az MSI vizsgálatot multiplex PCR formában végeztük el 5 primerpárt alkalmazva összesen 56 UrC mintán. A fragment analízis kapilláris elektroforézis készülékek segítségével történt. Kettő, vagy több instabilnak értékelt mikroszatellita marker esetében az eredményt erősen instabilnak tekintettük (MSI-high).

A hazai és nemzetközi gyűjtésből származó 19 PBAC és 61 UrC mintán végeztük el a MMR fehérjék (MLH1, MSH2, MSH6 és PMS2) IHC vizsgálatát. Az IHC vizsgálat kiértékelése az egyes fehérjék tumorsejtek magi pozitivitása alapján történt. A küszöbértéket <10%-nak tekintettük, ezen érték fölött MMR-hiány/MMR-deficiencia áll fenn.

IonTorrent (161 gén) vizsgálat

Összesen 41 UrC és 13 PBAC esetében végeztük NGS-alapú szekvenálást az OCAv3 panel segítségével 161, onkológiai szempontból releváns gén esetében.

A kapott szekvenálási eredményeket az alábbi szelekciónak vetettük alá:

- A) Technikai minőségi kritérium alapú szűrés.
- B) Intronikus eltérések kizárása.
- C) Minimum 15%-os allélfrekvencia érték.

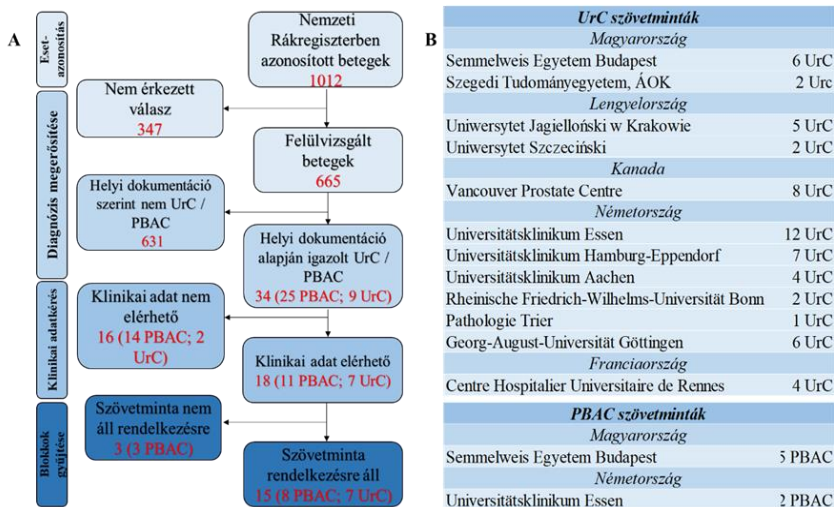
Az így azonosított eltérések patogenitásának megítélése az IonReporter 5.6 szoftver és szabadon hozzáférhető online adatbázisok segítségével történt. A patogén eltéréseket a QCI szoftverrel vizsgáltuk tovább. A QCI szoftver elemzi az adott genetikai eltérést, klinikai relevanciája alapján interpretálja azt, majd terápiás javaslatot, vagy ellenjavaslatot tesz az adott eltérés alapján, elősegítve a megfelelő terápiás döntéshozatalt. A program a genetikai eltéréseket patogenitás alapján csoportosítja (patogén vagy benignus), illetve az adott javaslatok evidencia szintjét (Tier 1-4) is megadja.

4. Eredmények

Mintagyűjtés

Szűrési kritériumaink a NR-ben 1012 beteget azonosítottak, akiket összesen 86 különböző magyarországi intézményben kezeltek. A diagnózis egyeztetés 665 beteg esetében valósult meg, mely végső soron 9 UrC és 25 PBAC-s esetet igazolt (5%, 34/665) (1A. ábra).

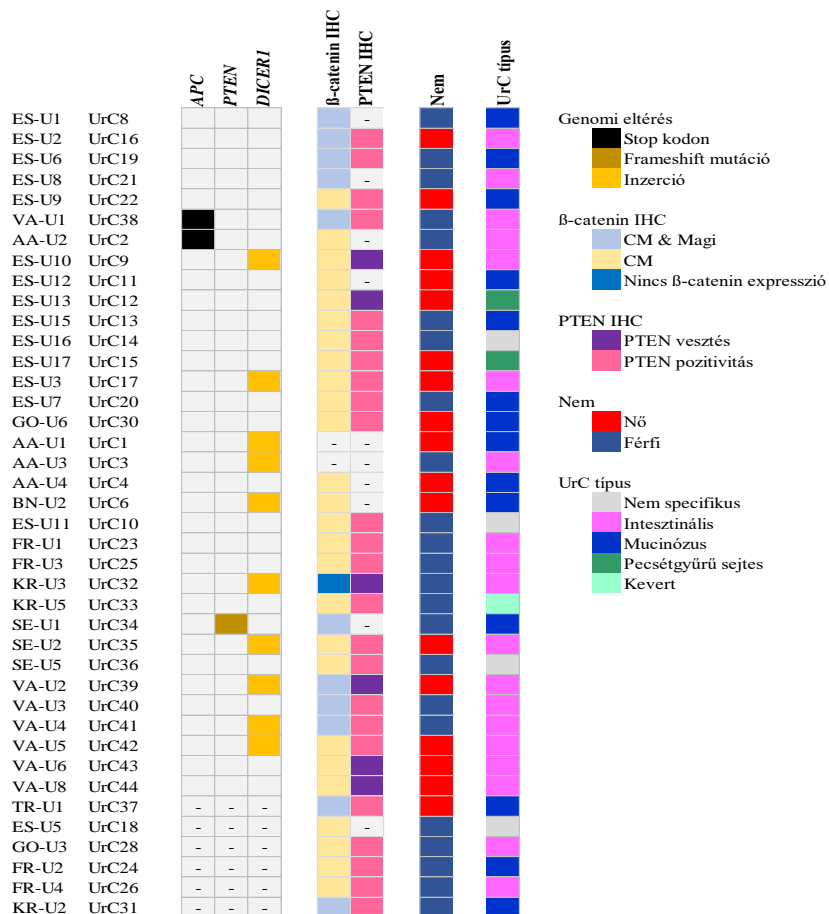
A nemzetközi mintagyűjtéshez Magyarország mellett további 4 ország összesen 10 intézménye csatlakozott, ennek eredményeként 59 UrC és 17 PBAC eset anyagait gyűjtöttünk össze (1B. ábra).



1. ábra: A) Hazai és B) nemzetközi minta és klinikai adatgyűjtés folyamata és eredményei.

Illumina MiSeq (6 gén) vizsgálata

DNS szintű vizsgálataink során a 40 UrC mintából 34 esetében sikerült elegendő mennyiségű és minőségű DNS mintát kinyerni a DNS szekvenáláshoz.



2. ábra: Az Illumina MiSeq DNS és a kapcsolódó IHC vizsgálatok eredményei. CM: citoplazma membrán

Az *APC* gén esetében két csonkoló mutációt találtunk, melyek működésképtelen APC fehérjét eredményeztek, így ezen eltéréseket patogén mutációknak tekintettük. A *PTEN* génben azonosított eltérés egy frameshift inzerció volt, mely szintén működésképtelen fehérjét eredményez, így ez is patogén eltérésnek tekintendő (2. ábra).

Összesen 38 UrC esetében végeztük el a β -catenin fehérje IHC vizsgálatát, amely az esetek 29%-ban detektált citoplazmatikus és magi expressziót. A *PTEN* fehérje hiánya az esetek 20%-ában (6/30) volt megfigyelhető (2. ábra). Egyik eltérés sem mutatott összefüggést a rövidebb túléléssel, azonban ezeket az eredményeket az alacsony esetszám miatt körültekintéssel szabad csak kezelni.

Mikroszatellita instabilitás (MSI)-vizsgálat

A vizsgált 19 PBAC szövetmintából 18-ban (94%) mind a négy MMR fehérje kimutatható volt, míg UrC esetében a vizsgált 61 mintából 60-ban (98%) sikerült normális (megtartott) MMR fehérje expressziót kimutatni. A DNS szintű MSI-analízis 56 UrC minta esetében volt elérhető, egyetlen esetben sem detektáltunk MSI-t.

Az UrC betegek 97%-a (32/33), míg a PBAC betegek 83%-a (10/12) hordozott legalább egy patogén eltérést. UrC és PBAC esetében a leggyakrabban érintett gének a *TP53* (79%, 42%), *KRAS* (33%, 25%), *MYC* (18%, 25%) voltak (3. ábra).

Az UrC és PBAC mintákat együttvéve összesen 19 gén esetében detektáltunk amplifikációt, melyből 7 gén esetében egyéb eltérések is jelen voltak. Mindkét csoportban a *MYC* gén amplifikációja bizonyult a leggyakoribbnak: UrC: 15% (5/33), PBAC: 25% (3/12) (3. ábra).

A teljes kohortot tekintve 38 gén eltérése (mutáció és amplifikáció) rekurrensnek bizonyult, tehát adott eltérés legalább 2 beteg esetében kimutatható volt (3. ábra).

Két eset kiemelkedően magas számban hordozott genetikai eltéréseket. Az egyik a FR-U-T1 kódszámú eset, melyben a vizsgált 161-ből 22 génben (14%) találtunk valamilyen patogén eltérést, a másik pedig a FR-U-T4 eset, mely az összes minta közül a legmagasabb számú eltérést hordozta (52/161, 32%) (3. ábra).

Figyelembe véve, hogy az egyes eltéréseket útvonalakba osztva funkcionális szempontból pontosabb információhoz juthatunk a szabályozási útvonalak érintettségéről, a vizsgált géneket szignálútvonalak szerint rendeztük.

Mind UrC-ban, mind pedig PBAC-ban a leggyakrabban érintett mechanizmus a sejtciklus/DNS hibajavítás volt. Ezen kívül

még a MAPK/PIK3 szignálútvonalban detektáltunk magas számban eltéréseket.

A mutációs mintázat terápiás szempontból történő értékeléséhez a QCI szoftver segítségével célzott és kemoterápiás javaslatokat és ellenjavallatokat kerestünk. A szoftver szenzitív és rezisztens gyógyszer-mutáció kapcsolatokat azonosít és ezek alapján három kategóriát különít el; szenzitív, rezisztens és nem ajánlott.

Ezzel az eljárással az összes azonosított patogén eltérést hordozó génből (n=68) 15-höz (22%, 15/68) sikerült potenciálisan alkalmazható szert azonosítani. Továbbá, a 19 amplifikálódott génből 10-hez (53%) találtunk FDA/EMA engedéllyel rendelkező célzott terápiás szert.

Az érintett géneket funkciójuk szerint szignálútvonalakba is beosztottuk, így jól láthatóvá vált, hogy az egyes útvonalak érintettsége esetén milyen szerek alkalmazhatók (4. ábra). Ennek eredményeként azt tapasztaltuk, hogy mind az UrC, mind pedig a PBAC csoporton belül a RTK/RAS útvonal eltéréseire kaptuk a legtöbb terápiás javaslatot.



4. ábra: UrC és PBAC betegek esetében javallt és ellenjavallt célzott terápiás szerek útvonalankénti bontásban. Az ábra felső részén, az oszlopdiaagrammokon az összes ajánlottnak (zöld), nem ajánlottnak (narancssárga) és rezisztensnek (piros) ítélt eltérés-szer interakció látható. Feltüntetettük továbbá, hogy az adott mutáció funkciónyerést (G-gain) vagy funkcióvesztést (L-loss) okoz a fehérjében, illetve, hogy az adott génben milyen és mennyi eltérést találtunk, amelyre volt terápiás javaslat. Az ábra plot részén a szereknél csupán azokat az ajánlott és rezisztens szereket tüntettük fel, melyek a betegek legalább 30%-nál megjelentek.

5. Következtetések

Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy bár a NR számára rendelkezésre bocsátott adatok a kódolás minőségére nézve hagynak kívánni valót maguk után, azonban a NR ezen korlátok ellenére is alkalmas a ritka daganatok magyarországi eseteinek (adatainak és szövettani mintáinak) összegyűjtésére.

Molekuláris vizsgálataink alapján az APC mutációja jóval ritkábban fordul elő UrC-ban (10%), mint CRC-ban (80%), valamint a MSI sem jellemző az UrC-ra, mely eredmények arra utalnak, hogy a jelentős hasonlóság ellenére karakterisztikus különbségek is kimutathatóak a két betegség között, tehát fontos különbségekre hívja fel a figyelmet az UrC és a CRC patogenezisére vonatkozóan.

Mind UrC-ban, mind CRC-ban a *PTEN* gén mutációs gyakorisága igen alacsony (4-6%), ám a PTEN fehérje elvesztése ennél gyakrabban fordul elő mindkét tumortípusban (20% és 40%), mely arra enged következtetni, hogy mind UrC-ban, mind CRC-ban a *PTEN* gén epigenetikai szabályozás alatt áll.

Eredményeink kiemelik az UrC, valamint PBAC közötti molekuláris szintű hasonlóságot, mely a leggyakrabban érintett szignálútvonalak nagyfokú átfedésében nyilvánul meg (sejtciklus/DNS hibajavítás és MAPK útvonalak). Ez arra utal,

hogy a két betegség patomechanizmusa sok tekintetben hasonló lehet.

Az anti-EGFR terápia - mely potenciálisan hatékony kezelés lehet UrC betegek számára - megkezdése előtt eredményeink alapján szükséges a *KRAS*, és *MET* gének, valamint a PTEN fehérje vizsgálata, mivel ezek eltérései gyakoriak UrC-ban és érintettségük az anti-EGFR terápiával szembeni rezisztenciával járhat.

Az Oncomine (OCAv3) génpanellel elvégzett vizsgálat eredményeinek kiértékeléséhez használt adatbázis alapú terápiapredikciót alkalmazva személyre szabott terápia tervezést szimuláltunk és azonosítottuk az UrC és PBAC betegek számára leggyakrabban ajánlható gyógyszereket. Eredményeink alapján számos célzott terápiás szer potenciálisan hatékony lehet, hiszen az UrC betegeink 98%-ának, míg a PBAC betegeink 67%-ának sikerült potenciálisan alkalmazható, FDA/EMA engedéllyel bíró terápiát ajánlani, amelyeknek eddigi, UrC/PBAC-ban történő alkalmazásáról alapos irodalomkutatást végeztünk. Ennek eredményei segítséget nyújthatnak azon célzott szerek kiválasztásában, melyekkel kapcsolatban már elérhető UrC/PBAC-ban szerzett tapasztalatok.

Vizsgálatunk retrospektív jellege miatt még kérdéses, hogy valójában milyen terápiás értékkel bírnak az általunk azonosított szerek. Kutatócsoportunk egy prospektív munka kereteiben a

klinikánkhoz UrC/PBAC diagnózissal forduló betegek daganatszövetének mutációs mintázata alapján keres potenciálisan hatékony gyógyszereket a betegek hatékonyabb kezelése érdekében. E munka során a jelen dolgozatban felvázolt analitikai és kiértékelési módszereket a gyakorlatban is alkalmazzuk.

6. Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés témájában megjelent közlemények

1. Nagy N, Reis H, Hadaschik B, Niedworok C, Módos O, Szendrői A, Bíró K, Hager T, Herold T, Ablat J, Black PC, Okon K, Tolkach Y, Csizmarik A, Oláh C, Keresztes D, Bremmer F, Gaisa NT, Kriegsmann J, Kovalszky I, Kiss A, Tímár J, Szász MA, Rink M, Fisch M, Nyirády P, Szarvas T. Prevalence of APC and PTEN Alterations in Urachal Cancer. Pathol Oncol Res. 2020;26(4):2773-2781. **IF: 3,201**
2. Reis H, Mairinger F, Ting S, Nagy N, Witzke KE, Kohl M, Sitek B, Niedworok C, Hadaschik B, Nyirády P, Szarvas T. Das Urachuskarzinom: Ein Update aktueller molekularer Ergebnisse [Urachal Cancer: an update of current molecular findings]. Pathologe. 2019;40(Suppl 3):239-243. **IF: 0,617**
3. Reis H, van der Vos KE, Niedworok C, Herold T, Módos O, Szendrői A, Hager T, Ingenwerth M, Vis DJ, Behrendt MA, de

Jong J, van der Heijden MS, Peyronnet B, Mathieu R, Wiesweg M, Ablat J, Okon K, Tolkach Y, Keresztes D, **Nagy N**, Bremmer F, Gaisa NT, Chlosta P, Kriegsmann J, Kovalszky I, Timar J, Kristiansen G, Radzun HJ, Knüchel R, Schuler M, Black PC, Rübben H, Hadaschik BA, Schmid KW, van Rhijn BWG, Nyirády P, Szarvas T. Pathogenic and targetable genetic alterations in 70 urachal adenocarcinomas. *Int J Cancer*. 2018;143(7):1764-1773. **IF: 4,982**

Egyéb témában megjelent közlemények

1. Csizmarik A, Keresztes D, **Nagy N**, Bracht T, Sitek B, Witzke K, Pühr M, Tornyai I, Lázár J, Takács L, Kramer G, Sevcenco S, Maj-Hes A, Jurányi Z, Hadaschik B, Nyirády P, Szarvas T. Proteome profiling of enzalutamide-resistant cell lines and serum analysis identified ALCAM as marker of resistance in castration-resistant prostate cancer. *Int J Cancer*. 2022 Epub ahead of print **IF: 7,316**
2. Keresztes D, Csizmarik A, **Nagy N**, Módos O, Fazekas T, Bracht T, Sitek B, Witzke K, Pühr M, Sevcenco S, Kramer G, Shariat S, Küronya Z, Takács L, Tornyai I, Lázár J, Hadaschik B, Lászik A, Szűcs M, Nyirády P, Szarvas T. Comparative proteome analysis identified CD44 as a possible serum marker

for docetaxel resistance in castration-resistant prostate cancer. *J Cell Mol Med.* 2022;26(4):1332-1337. **IF: 5,295**

3. Olah C, Hahnen C, **Nagy N**, Musial J, Varadi M, Nyiro G, Gyorffy B, Hadaschik B, Rawitzer J, Ting S, Sjö Dahl G, Hoffmann MJ, Reis H, Szarvas T. A quantitative polymerase chain reaction based method for molecular subtype classification of urinary bladder cancer-Stromal gene expressions show higher prognostic values than intrinsic tumor genes. *Int J Cancer.* 2022;150(5):856-867. **IF: 7,316**

4. Szarvas T, Csizmarik A, **Nagy N**, Keresztes D, Váradi M, Küronya Z, Riesz P, Nyirády P. Az áttétes kasztrációrezisztens prosztatarák gyógyszer-rezisztenciájának molekuláris vonatkozásai [Molecular underpinnings of systemic treatment resistance in metastatic castration-resistant prostate cancer]. *Orv Hetil.* 2020;161(20):813-820.