

**A DNS ploeditás és az enhancer of zeste homologue 2 (EZH2)
expresszió prognosztikai hatása synovialis sarcomában**

Doktori tézisek

Dr. Yi-Che William Chang Chien

Semmelweis Egyetem

Patológiai Tudományok Doktori Iskola



Témavezető: Prof. Dr. Sápi Zoltán M.D., Ph.D., D.Sc., egyetemi tanár

Hivatalos bírálók:

Dr. Tóth Erika M.D., Ph.D., főorvos

Dr. Terebessy Tamás M.D., Ph.D., egyetemi tanársegéd

Szigorlati bizottság elnöke:

Prof. Dr. Schaff Zsuzsa M.D., Ph.D., D.Sc., egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Lazáry Áron M.D., Ph.D., kutatás-fejlesztés vezető

Dr. Borka Katalin M.D., Ph.D., egyetemi adjunktus

Budapest, 2013

I. Bevezetés

A synovialis sarcoma egy agresszív növekedésű lágyrész daganat, amely feltehetőleg mesenchymalis őssejtekből ered. Mint jól ismert „transzlokáció-asszociált tumor”, jellemző rá a t(X; 18) (p11.2; q11.2), amely az esetek több mint 95%-ában jelen van. Az SYT fehérje egy transzkripciós koaktivátorként működik, melynek az SNH doménje interakcióba lép az SWI/SNF ATPáz-asszociált kromatin átrendező komplexszel. Azok a transzkripciós faktorok, mint amilyen az AF10, melyekben az SSX protein transzkripciós korepresszorként működik, rendelkeznek egy SSXRD alegységgel, amely a polycomb csoporttal lép interakcióba. Az SYT-SSX-fúziós fehérje, amely megtartja csaknem az egész SYT szekvenciát beleértve az SNH domént is, csak az utolsó 8 aminosavat veszíti el az N-terminális végen, és helyébe az utolsó 78 aminosavát tartalmazó, SSXRD-rel is rendelkező SSX kerül. Bizonyos target gének epigenetikai aktiválásával vagy csendesítésével a fúziós fehérje a sejtprogramozás általános változásait képes kiváltani. A synovialis sarcoma prognózisát illetően az 5 éves túlélési ráta 36-76% között változik. A prognosztikai faktorok (tumor méret, életkor, mitózisok és gyengén differenciált területek) is nehezen meghatározhatóak, ezáltal rámutatva új markerek azonosításának szükségességére.

Ellentétbe ütközik a ploiditás és a kariotípus meghatározottsága a prognózis tekintetében; másrészt, az EZH2 a polycomb represszáló komplex 2 (PRC2) egy központi tagja, amely egy hiszton metiltranszferázként működik, a karakterisztikus H3K27me3 epigenetikus jelet eredményezi. Továbbá fontos szerepet játszik a sejtciklus szabályozásában, a DNS-károsodás javításában, a sejt differenciálódás, öregedés és az apoptózis folyamatában. Az EZH2 overexpresszióját már több tumorban (pl. karcinómákban és limfómákban) kimutatták, valamint összefüggését írták le a

daganatok agresszív klinikai viselkedésével. Azonban az EZH2 a lágyrész sarcomák tekintetében ritkán kerül előtérbe, a gén expressziós profilja és a klinikai jelentősége, különösen a synovialis sarcomában, nagyrészt ismeretlen.

II. Célkitűzések

A munkám két részből állt. Az első részben korrelációt kerestem a ploiditás, a kariotípus komplexitásai és a klinikai kimenetel között. A második részben az EZH2 jelentőségét vizsgáltam meg a synovialis sarcomában. Ezt az alábbiakban foglaltam össze:

1. A DNS ploiditás vizsgálatára kép analízist használtam. Az ebből származó eredményeket összevettem a nagy felbontású komparatív genomiális hibridizációból (HR-CGH) származó eredményekkel valamint a klinikai kimenetellel.
2. A synovialis sarcomában az EZH2 diagnosztikus marker szerepének a vizsgálatára összehasonlítottam a szövettani altípusokban előforduló expressziójukat (mind mRNS, mind fehérje szinten), molekuláris jellemzőiket a klinikai adatokkal.
3. Vázoltam a funkcionális összefüggést az EZH2 és epigenetikai markere, a H3K27me3 között.
4. Kaplan-Meier görbén szemléltettem az EZH2, valamint a H3K27me3 és Ki-67 expresszió hatását a teljes túlélésre.

III. Anyagok és módszerek

55 primer tumort választottam, melyek nem estek át preoperatív kemo- és/vagy radioterápián. Ezek között szerepelt 6 gyengén differenciált (PDSS) -, 39 monofázisos (MPSS) -, és 10 bifázisos (BPSS) - synovialis sarcoma, mind formalin fixált, paraffinba ágyazott formában. Ezen kívül 9 frissen fagyasztott minta: 2 gyengén differenciált (PDSS), 4 monofázisos (MPSS) és 3 bifázisos (BPSS) is rendelkezésre állt HR-CGH analízisre. A kép analízist Feulgen festés segítségével végeztem. Majd elkészítettem a hisztogramot, miután megmértem 30 referencia és a 200 tumor sejtet. Abnormális "stem line" (stem line= G1 fázis eloszlási görbéjének csúcspontja) esetén aneuploidiát, míg a "5c-t meghaladó eredményt" hordozó sejtek jelenléte vagy hiánya esetén komplex- vagy egyszerű diploidiát határoztam meg. Eközben HR-CGH-t is elvégeztem a korábban említett 9 mintán, pozitív és negatív kontrollok használatával. A ploiditás, a kariotípus és a klinikai kimenetel eredményeit összevettem.

A kiválasztott 55 mintából szövet microarray-t készítettünk, és ezen végeztük el az EZH2, a H3K27me3 és a Ki-67 immunfestést, majd az eredményeket előre meghatározott pontozási kritériumok alapján értékeltem. Összehasonlítottam a három immunfestés eredményeit, és különbségeket kerestem a szövettani altípusok, valamint betegcsoportok között, melyeket az alábbiak szerint kategorizáltam: nem, életkor, tumor méret, tumor helye, távoli áttétek jelenléte és a fúziós gén típusa. Kvantitatív valós idejű PCR-t is végeztünk az EZH2 expresszió mRNS szinten történő detektálására, valamint, hogy ez korrelál-e a fehérje szinten. Az EZH2 expresszió és a túlélés közötti összefüggést Kaplan-Meier görbén ábrázoltam.

IV. Eredmények

IV.1 Szignifikáns különbségek az aneuploid, egyszerű- és komplex diploid csoportok között

Kép analízis vizsgálattal 10 aneuploid, 12 komplex diploid és 33 egyszerű diploid csoportot azonosítottunk.

A HR-CGH analízis során azt találtuk, hogy az aneuploid csoport nagyszámú genetikai eltérést mutatott; átlagosan legalább 2 kromoszóma többletet. A komplex diploid csoport ugyan jelentős, de kevesebb számú aberrációt tartalmazott, míg az egyszerű diploid csoportban kromoszómális eltérés alig volt kimutatható.

Metasztázis az aneuploid csoport 80%-ában, a komplex diploid csoport 50%-ában és az egyszerű diploid csoport 39%-ában alakult ki. A Fisher-féle egzakt teszttel a három csoport szignifikánsan különbözönek bizonyult.

IV.2 Megemelkedett EZH2 expresszió és a H3K27me3 fokozott jelenléte a gyengén differenciált altípusban

Az EZH2 magas expressziója mind mRNS, mind fehérje szinten kifejezetten a gyengén differenciált synoviális sarcomában volt kimutatható. Az EZH2 immunhisztokémia eredményei korrelációt mutattak a Ki-67 és H3K27me3 markerekkel, utalva az asszociációra az emelkedett EZH2 expresszió és magasabb mitotikus aktivitás, valamint a funkcionálisan aktív PRC2 között.

IV.3 Az EZH2 mint a synoviális sarcoma potenciális prognosztikai markere

Mindegyik altípus esetében a magas EZH2 expressziójú esetekre jellemző volt a nagyobb tumor méret (≥ 5 cm), a távoli metasztázis és a rossz prognózis. Még a monofázisos és a bifázisos synoviális sarcoma esetekben is azt találtuk, hogy a magasabb fokú EZH2 expresszió magasabb proliferációs rátával, nagyobb tumormérettel, és korai távoli metasztázis kialakulásának kockázatával társul. Ezekben a szövettani csoportokban az EZH2 a Ki-67 markernél jobb prediktikai tényezőnek bizonyult a tumor növekedési ráta és a távoli metasztázis képzés előrejelzésében.

V. Megbeszélés

A synovialis sarcomák többsége, függetlenül a szövettani altípustól, a rájuk jellemző t(X; 18) transzlokáción kívül egyszerű kariotípust mutatnak. Másodlagos genetikai anomáliák néha előfordulnak, de ezek az eltérések nem állandóak és ellentmondásosak. A teljes DNS tartalom meghatározása nagy jelentőséggel bír a betegség prognózisának becslésében, és így a megfelelő terápia kiválasztásában. Munkám első részeként sikerült elkülönítenünk a diploid synoviális sarcomát komplex diploid és egyszerű diploid csoportokra, melyek eltérő kariotípussal és prognosztikus jellegekkel bírnak.

A kép analízissel nyert eredményeink összefüggést mutattak a HR-CGH analízissel és a tumor prognózissal. Ezek alapján a kép analízis egy gyors, egyszerűen kivitelezhető és olcsó eszköznek tekinthető a már diagnosztizált synoviális sarcoma további szűrésében. Azonban a synoviális sarcomákban bekövetkező EZH2 felülszabályozódás pontos patomechanizmusa még tisztázásra szorul. Mint háttérben álló lehetséges mechanizmus, szerepelhet a HIF1 α és a fúziós fehérje vagy a mikroRNS alulszabályozás által indukált Myc-asszociált felülreguláció. A túlermelődött EZH2 több olyan target gén inaktivációját okozhatja, melyek apoptotikus, mitotikus és tumor-szuppresszív folyamatokban vesznek részt, valamint angiogenetikus folyamatokban, ami abnormális proliferációhoz és agresszív viselkedéshez vezetnek. Lényeges a korrelációt megtalálni az EZH2 és a H3K27me3 között, mivel nem minden emelkedett EZH2-vel rendelkező tumor hozható kapcsolatba a H3K27me3 epigenetikus markerrel. A PRC2 célgének alulszabályozódása mögött a PRC2 tumor specifikussá alakulása állhat, mely komplex így különböző szubsztrát specificitással és foszforiláció kiváltotta konformáció

változással, stb. rendelkezhet. A vizsgálatainkban kimutatott magas EZH2 státusz a monofázisos és a bifázisos synoviális sarcomák esetén előrejelezheti a gyors tumor növekedést és a távoli metasztázisok kialakulását, mindez magyarázhatja a még jobban differenciált synoviális sarcomák változatos klinikai kimenetelét. Bár önmagában alkalmazva nem eléggé specifikus az EZH2, mégis a gyengén differenciált altípus kiegészítő immunhisztokémiai markereként használható a kétséges esetekben (pl. jobban differenciált szövettani morfológiához magas mitotikus ráta társul vagy fordítva). Az EZH2 státusz társulva a ploiditás prognosztikai hatásával, amit korábban megállapítottunk, tovább finomíthatja a monofázisos és a bifázisos synoviális sarcoma betegek jelenlegi felosztását alacsony és magas kockázatú alcsoportokra, ami hatással lehet a prognózisra és az esetleges terápiás stratégiákra.

VI. Következtetések

Vizsgálataink következetes összefüggést mutattak a DNS ploiditás, a kariotípus komplexitás és a klinikai kimenetel között. Az epigenetikus dereguláció tanulmányozása új betekintést nyit meg a tumor onkogenezis folyamatába. Munkacsoportunk vizsgálta elsőként az EZH2 expressziós profilját és annak klinikai jelentőségét synoviális sarcomákban. Az alábbiakban közlöm az eredményeiket:

1. A komplex diploid csoport komplex kariotípussal társul az "egyszerű sejtes aneuploidia" fenotípus alapján, és rosszabb a prognózisa, mint az egyszerű diploid csoportnak.
2. Az EZH2 diagnosztikai kiegészítéseként szolgálhat, mivel az expressziójának a foka segít megkülönböztetni a gyengén differenciált synoviális sarcomát a monofázisos és bifázisos synoviális sarcomától. Ezen kívül a túltermelése kedvezőtlen klinikai kimenetellel jár együtt.
3. Az EZH2 expresszió korrelál a H3K27me3 markerrel, ami a PRC2 funkcionális részvételét jelzi.
4. A magas EZH2 expresszió egy prediktív marker lehet a gyors tumor növekedési ráta és a korai metasztázis kialakulásának szempontjából, amely különösen hasznos a monofázisos és bifázisos synoviális sarcomák esetében.
5. Mind a DNS ploiditási és EZH2 expressziós vizsgálatok eredményeinek jelentős prognosztikai értéke van a synoviális sarcomák esetében, mivel kiegészítő adatokat kínálnak a klinikusok számára a megfelelő terápia kiválasztásához. Az EZH2 célpont lehet az epigenetikus terápiában, különösen más epigenetikai modulátorokkal és a hagyományos kemoterápiával kombinálva a maximalizált és szinergikus hatás eléréséhez.

VII. Publikációs lista

A tézisek témájához szorosan kapcsolódó publikációk

1. Changchien YC, Tátrai P, Papp G, Sápi J, Fónyad L, Szendrői M, Pápai Z, Sápi Z. (2012) Poorly differentiated synovial sarcoma is associated with high expression of enhancer of zeste homologue 2 (EZH2). *J Transl Med*, Oct 30;10:216.

IF:3,47

2. Balogh Z, Szemlaky Z, Szendroi M, Antal I, Pápai Z, Fónyad L, Papp G, Changchien YC, Sápi Z. (2011) Correlation between DNA ploidy, metaphase high-resolution comparative genomic hybridization results and clinical outcome of synovial sarcoma. *Diagn Pathol*, Nov 3;6:107.

IF:1,64

3. Changchien YC, Katalin U, Fillinger J, Fónyad L, Papp G, Salamon F, Sápi Z. (2012) A challenging case of metastatic intra-abdominal synovial sarcoma with unusual immunophenotype and its differential diagnosis. *Case Rep Pathol*, 2012:786083.

Egyéb publikációk

1. Papp G, Changchien YC, Péterfia B, Pecsenska L, Krausz T, Stricker TP, Khor A, Donner L, Sápi Z. (2013) SMARCB1 protein and mRNA loss is not caused by promoter and histone hypermethylation in epithelioid sarcoma. *Mod Pathol*, Mar;26(3):393-403.

IF: 4,792

2. Changchien YC, Haltrich I, Micsik T, Kiss E, Fónyad L, Papp G, Sápi Z. (2012) Gonadoblastoma: Case report of two young patients with isochromosome 12p found in the dysgerminoma overgrowth component in one case. *Pathol Res Pract*, Oct 15;208(10):628-32.

IF: 1,213

VIII. Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, Prof. Dr. Sági Zoltánnak, a Semmelweis Egyetem I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet patológusának, a lehetőséget, hogy egyik kedvelt szakterületemen, a lágyszövet patológia témakörében végezhettem el a PhD munkámat, valamint a segítségét és támogatását, amit a munkám során nyújtott.

Szeretném továbbá megköszönni Prof. Dr. Matolcsy Andrásnak, az intézet vezetőjének, hogy lehetőséget biztosított intézetében munkám elvégzéséhez.

Nagyon hálás vagyok Prof. Dr. Kovalszky Ilonának, aki rendelkezésemre bocsájtotta biokémiai laborját, munkatársait és szaktudásukat a kutatásaim kivitelezése során.

Szeretném kifejezni külön köszönetemet kollégáimnak, Dr. Papp Gergőnek, a Semmelweis Egyetem I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, valamint Dr. Tátrai Péternek, a Budapest Creative Cell Laboratórium biológusainak, akik rengeteg technikai segítséget nyújtottak, és szigorúan felülvizsgálták az írásos anyagaimat.

Szeretném kifejezni nagyrabecsülésemet Prof. Dr. Szendrői Miklósnak és Dr. Terebessy Tamásnak, a Semmelweis Egyetem Ortopédiai osztály orvosainak, hogy mintát biztosítottak a kutatásaimhoz.

Köszönöm Polgár Ilonának, a lágyszövet- és csont patológiai labor dolgozójának a technikai segítségét, és mindenkinek a Semmelweis Egyetem I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetben, akikhez bátran fordulhattam szakmai és nyelvi kérdésekben.

Szeretnék köszönetet mondani az intézetben dolgozó rezidens kollégáknak, hogy a kutatási munkám során nyújtott segítség mellett a szakmai tudásom szinten tartásában is közreműködtek.

Köszönettel tartozom Laczik Cecéliának az adminisztrációs dolgokban nyújtott segítségéért.

Végül, de nem utolsó sorban, szeretnék köszönetet mondani feleségemnek, Dr. Pintye Mariannnak és a családomnak a folyamatos támogatásért.

Ezt a tudományos munkát nemcsak a téma iránt tanúsított személyes érdeklődésből végeztem, de abból a célból is, hogy tapasztalatra tegyek szert az orvosbiológiai kutatások terén, ami egy gyakorló patológus számára hasznos tudást jelent.