

Claudinok szerepe az emlőrák prognózisának meghatározásában

Szász A. Marcell

Semmelweis Egyetem, Patológiai Doktori Iskola, Budapest

A vizsgálatot finanszírozó adatai: MKOT-GSK-2010 pályázat
Témavezető: Dr. Kulka Janina

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, e fehérjék lehetséges prognosztikus jelentőségét vizsgáltuk emlőcarcinoma esetekben. 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 expresszióját. 96 esetben a nyirokcsomóáttéteket is elemezni tudtuk. A claudinkifejeződés 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, az összetevőinél jelentősen erősebb prognosztikus információt hordoz ($p=0,029$). Független validációs vizsgálatban ezt megerősítettük, és multivariáns analízisben is erősnek mutatkozott a prognózis előrejelzésében. Nyirokcsomóáttétek vizsgálata során azt találtuk, hogy a claudin-1 csökkent és a claudin-4 emelkedett expressziója jelzi a rosszabb kimenetelt. Az általunk bemutatott claudin-cadherin index a rutinszerűen alkalmazható faktorok mellett további lehetőséget nyújt a rendszeres pontosítására, a kimenetel megjósolására. Vizsgálataink igazolták továbbá, hogy a nyirokcsomóáttétekben a claudinok kifejeződése további prognosztikus információt hordoz emlődaganatos megbetegedésben. Magyar Onkológia 209-212, 2012

Kulcsszavak: emlőrák, claudin, cadherin, prognózis

Different expression of claudins and E-cadherin has been described in the pathogenesis and progression of breast cancer. Changes in the expression of these junctional molecules have also been described as being of prominent importance in other cancers as well. Thus, we aimed at exploring the potential prognostic relevance of these cell junctional molecules in breast carcinoma cases. 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. Claudin expression bears prognostic information in itself. Based on bioinformatic data analysis, the meta-gene of claudin-3, -4, -7 and E-cadherin has proved the most powerful in predicting 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, a.k.a. CURIO), 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 lymph nodes. 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.

Szász AM. Claudins as prognostic factors of breast cancer. Hungarian Oncology 56:209-212, 2012

Keywords: breast cancer, claudin, cadherin, prognosis

Levelezési cím: Dr. Szász A. Marcell, Semmelweis Egyetem, II. sz. Patológiai Intézet,
1091 Budapest, Üllői út 93. Telefon: (06-1) 215-7300, fax: (06-1) 215-6921, e-mail: cac@korb2.sote.hu

Közlésre érkezett: 2012. június 26. • Elfogadva: 2012. július 2.

BEVEZETÉS

Az emlőrák a leggyakrabban diagnosztizált rosszindulatú daganat a nők körében, Magyarországon csakúgy, mint az egész világon. Az emlőrák miatti halálozás növekedése a 90-es években megfordult: a mortalitás csökkenni kezdett, amely a korai felismerésnek és a javuló terápiás eredményeknek tulajdonítható.

A betegség lefolyásának minél pontosabb megítélése a betegeket kezelő szakembereket is régóta foglalkoztatja. A tumor szövettani típusa mellett a betegek életkora, a daganat mérete, nyirokcsomóáttétek jelenléte prognosztikus jelentőséggel bír. A szövettani megjelenés alapján emlődaganatok esetén meghatározható szövettani grade, nyirokér- és érbe-törés, Nottingham Prognostic Index a mindennapokban jól alkalmazható, azonban korlátozott prognosztikus információval bíró faktorok. A diagnózis időpontjában felállított klinikai és patológiai stádium ma is elfogadott kezelési útmutató. A proliferációs index, S-fázis frakció és Ki67-kifejeződés ugyancsak további információt szolgáltat a daganatok várható viselkedéséről.

A hormonreceptor-kifejeződés terápiás prediktív értéke a tumorok ösztrogénreceptor-pozitív (ER+) és -negatív (ER-) csoportjait képes elkülöníteni. Ezen altípusok biológiai viselkedése igen különböző lehet, amelyet az elmúlt évtizedben genetikai vizsgálatokkal is alátámasztottak. Perou cDNS-microarray profil alapján különböztette meg az egyes altípusokat, amelyek a mai kezelési csoportok meghatározásának alapját képezték. Az egyénre szabott terápia és a genomika térhódításával ma már elérhetőek további genetikai alapú eszközök is, amelyek a döntéshozásban nyújthatnak támpontot: Agendia Mammprint, Genomic Health Oncotype DX, Ipsogen Mapquant DX. Hátrányuk, hogy legtöbbjük fagyasztott tumorszövetet igényel, és csak igen drágán elérhető.

A sejtkapcsoló struktúrák fontosságát hangsúlyozza, hogy a genetikai állomány 10%-a ún. adhéziós molekulákat kódol. A sejt-extracelluláris mátrix és a sejt-sejt kapcsolatok alapvető fontosságúak a szöveti szerveződés kialakulásában és fenntartásában. Továbbá szerepük van a sejtek növekedésének és differenciációjának szabályozásában. A cadherineknél az adherens kapcsolatok felépítésében résztvevő molekulacsald, amelyek mindegyike Ca-ion-dependens módon működik. Az E-cadherin a patológiai diagnosztikában a ductalis és lobularis emlődaganat-csoportok rutinszerű elkülönítésére használatos immunhisztokémiai marker.

A claudin család első tagjainak leírására 1998-ban került sor. Kramer és munkacsoportja 2000-ben 96 emlőmintát vizsgált, és a claudin-1 fehérje csökkent kifejeződését találták carcinomában. Kominsky 2004-ben, 21 emlőtumor vizsgálata során a claudin-3 és -4 fokozott kifejeződését írta le, egyidejűleg a *Clostridium perfringens* enterotoxin

terápiás alkalmazásának lehetőségére is rámutatott. Tőkés 56 emlőmintán RNS- és fehérjeexpressziós vizsgálata alapján a claudin-1, -3 és -4 összefüggését látta a szövettani grade-del. 2006-ban Hewitt 47 emlőmintán elemzése során claudinok kifejeződésének mintázatát írta le, és ugyancsak a claudin-3 és -4 fokozott, valamint a claudin-7 enyhén emelkedett kifejeződését találta. 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. Herschkowitz alkalmazta első ízben a "claudin-low" típus megjelölést 2007-ben az emlődaganatok új csoportjának azonosítására, amelyet terápiarezisztens populációként azonosítottak. A prognosztikus információ kinyerésére törekvő elemzések eddig kis esetszámúak voltak, és előzetes megállapításokat tettek.

CÉLKITŰZÉSEK

Vizsgálatunkban elemeztük, hogy:

- 1) A claudinok és E-cadherin proteinszintű kifejeződése eltér-e a különböző szövettani típusú, grádusú és immunhisztokémiai profil által tükrözött emlődaganat-altípusokban?
- 2) Nyilvános genomikai adatbázisok vizsgálata során a claudinok és E-cadherin mRNS-szinten önmagukban vagy együttes mintázatként nyújtanak-e prognosztikus információt?
- 3) A genomikai adatbázisok vizsgálatából származó eredmény validálható-e független betegcsoporton a mindennapi gyakorlatban alkalmazható immunhisztokémiai technikával?
- 4) A nyirokcsomóáttétekben a claudin immunhisztokémiai módszerrel detektálható kifejeződése eltér-e a primer emlődaganatokétól?
- 5) A nyirokcsomóáttétekben a claudin fehérje kifejeződése hordoz-e prognosztikus információt emlődaganatos megbetegedésben?

MÓDSZEREK

Betegek és adatbázisok

A szöveti vizsgálatokba két különböző, átfedés nélküli beteganyag – összesen 636 beteg tumoros szövetmintája – került bevonásra. 1) Tréning szett: 249 emlődaganatos beteg mintája a II. sz. Patológiai Intézet archívumából (1981–2008), átlagosan 111 hónapos követési adatokkal. 2) Validációs csoport: 387 beteg a Budai MÁV Kórház anyagából (1999–2002), átlagosan 102 hónapos követési adatokkal. A vizsgálatot a Semmelweis Egyetem Tudományos Kutatási és Etikai Bizottsága hagyta jóvá (IKEB #85/2007, #185/2007 és #7/2008). Bioinformatikai elemzéseinkhez tizenhárom nyilvánosan elérhető internetes adatbázisban található, összesen 1809 emlődaganatos beteg tumoráról és túléléséről megadott informá-

ciót használtuk. Az egyes adatbázisok Affymetrix HGU133A vagy HGU133Aplus2 microarray-k alapján készültek, amelyek próbaszettjei jelentős átfedést mutatnak.

Szöveti multiblokkok készítése

A daganatokat tartalmazó, formalinban fixált és paraffinba ágyazott (FFPE) blokkokból a tumoros szövethengereket egy erre a célra fejlesztett eszköz segítségével emeltük ki, és az előkészített TMA-blokkokba helyeztük. Minden beteghez tartozó reszekciós preparátumból 2 darab 2 mm átmérőjű szövethengert ültettünk át (3DHistech Kft., Budapest).

Immunhisztokémiai vizsgálatok

Az altípusok pontos meghatározásához ösztrogén-, progeszteronreceptor, HER2, Ki67 reakciókat végeztünk a metszeteken Ventana Benchmark készülékben. A sejtkapcsoló struktúrák immunhisztokémiai vizsgálatához 5 µm vastagságú metszeteket készítettünk a paraffinos TMA-blokkokból. Az immunhisztokémiai reakciókat Ventana ES immunfestő automatában futtattuk (Roche Diagnostics, Mannheim, Németország).

Fluoreszcens in situ hibridizáció (FISH)

A FISH-reakciókat HER2- és CE17-próbákat tartalmazó Poseidon kit felhasználásával végeztük (Kreatech Diagnostics, Amsterdam, Hollandia).

A metszetek digitalizálása és értékelése

Az elkészült metszeteket Mirax MIDI metszetskennerrel digitalizáltuk (3DHistech Kft.). A tumorokat két vizsgáló értékelt konszenzus eléréséig. Az ER-, PgR- és Ki67-reakciókat a magokban látható pozitív reakciók alapján, százalékos skálán értékeltük. A HER2 kifejeződését 0–3 kategóriákba soroltuk a rutin eljárásnak megfelelően. A FISH-reakciók értékelése során esetenként 50–50 sejtet elemeztünk Leica DM RXA mikroszkóp segítségével (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Németország). A génamplifikáció megállapításánál a HER2 és 17-es kromoszóma centromer (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). A sejtkapcsoló struktúrák vizsgált molekuláinak értékeléshez a TMA-modul szoftvert (Mirax Viewer v.1.11.49, 3DHistech Kft.) használtuk, és mind az intenzitás, mind az eloszlás tekintetében értékeltük az egyes reakciókat, amelyek összege képezte a végső „score”-t (0–11).

Adatbázisok elemzése, statisztikai értékelés

Az adatbázisok értékelését R statisztikai környezetben (R 2.10.1) végeztük. A nyers immunhisztokémiai adatokat SPSS 15.0 statisztikai programmal értékeltük (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

EREDMÉNYEK

A claudinok kifejeződése eltért a különböző szövettani típusú emlődaganatokban. Az emlődaganatok dedifferenciálódása során eltértek a különböző grádusú tumorokban kifejeződő claudinok: legjellemzőbb a claudin-1 és -2 csökkenése, valamint a claudin-4 és -7 emelkedése volt. A claudinok és E-cadherin kifejeződése eltért az immunhisztokémiai profil által tükrözött emlődaganat-altípusokban is: 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 jellemezte.

Nyilvános genomikai adatbázisok vizsgálata során a claudinok és E-cadherin mRNS-szinten önmagukban is, azonban együttes mintázatként (legerősebben a claudin-3, -4, -7 és E-cadherin együttes mintázata) kifejezetten robusztus prognosztikus információt nyújtottak. A claudinok és E-cadherin fehérjeszintű kifejeződése prognosztikus információt hordozhat primer emlőtumorokban: a claudin-2, -4 és E-cadherin rendelkezett legerősebb előrejelző képességgel a relapszusmentes túlélést tekintve.

A genomikai adatbázisok és a tréning szett vizsgálatából azonosított claudin-cadherin indexet (CC index) immunhisztokémiai technikával validáltuk független betegcsoporton: uni- (HR=1,51, 95% CI: 1,04–2,19, p=0,029) és multivariáns (HR=1,50, 95% CI: 1,02–2,21, p=0,040) összehasonlításban is megállta a helyét. Tehát a claudin-4 és E-cadherin közös expressziója további prognosztikus információt nyújt a rutinszerűen alkalmazható faktorok mellett, prospektív vizsgálatuk megfontolandó.

A nyirokcsomóáttétekben a claudin-1, -2, -3, -4, -5, -7 és E-cadherin kifejeződését 97 esetben tudtuk megvizsgálni. A nyirokcsomóáttétek claudinexpressziója eltért a primer emlődaganatokétól, jellemzően a claudin-5 magasabban, a claudin-3, -4 és -7 alacsonyabban fejeződött ki mind a ductalis, mind a lobularis típusú tumorok esetében összehasonlítva az áttétekkel.

A nyirokcsomóáttétek claudinkifejeződése prognosztikus információval bírhat emlődaganatos megbetegedésben, mert az áttétben a claudin-1 alacsonyabb kifejeződése (p=0,036) és a claudin-4 fokozott kifejeződése (p=0,045) kedvezőtlenebb kimenetelt sugallt.

KÖVETKEZTETÉSEK

1. A claudinok kifejeződése eltért a különböző szövettani típusú, differenciáltsági fokú és az immunhisztokémiai profil által tükrözött emlődaganat-altípusokban.

2. 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 kombinációja messze meghaladta az alkotórészek és az összes vizsgált sejtkapcsoló molekula segítségével kialakított profil prognosztikus előrejelző képességét.

3. 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 ún. 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 kimutattuk, hogy a CC index multivariáns analízisben képes előre jelezni a prognózist az immunfenotípus és érinvázió 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. őssejtmakerek) figyelembevételével lehetséges. E tumorok további karakterizálása csak igen nagy esetszámú vizsgálatban lesz lehetséges.

4. Nyirokcsomóáttétek claudinkifejeződése 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 claudinkifejeződési mintázat elemzése ebben is további lehetőségeket hordozhat.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Kulka Janina egyetemi tanárnak, témavezetőmnek, akitől a klinikopatológiai szemléletet elsajátíthattam, munkámat lehetővé tette és mindenben támogatta.

Hálás köszönetemet szeretném kifejezni türelméért és feltétlen odaadásáért Dr. Tőkés Anna-Máriának, akinek laboratóriumi technikai tudásomat köszönhetem.

Prof. Dr. Schaff Zsuzsa akadémikus és Prof. Dr. Tímár József egyetemi tanár intézetvezetése idején mindenben segítségemre volt, és Prof. Dr. Szendrői Miklós egyetemi tanárral munkámat nemcsak támogatták, de több ízben előre is lendítették.

Hálás vagyok a betegeknek, akik segítik a munkámat, valamint családomnak, akik biztos hátteret adnak álmaim megvalósításához.

Köszönöm Dr. Schönfeld Tibornak, hogy munkámat akkor és most mindenben segíti, az általa nyújtott támogatásnak köszönhetően nyílt minden nap lehetőségem a betegek részére átfordítható kutatási eredmények létrehozására.

Köszönöm Dr. Bérces Attila, Dr. Dank Magdolna, Dr. Nyirády Péter, Dr. Andrea L. Richardson, Dr. Charles Swanton és Dr. Szállási Zoltán energiát nem kímélő támogatását, amellyel a transzlációs kutatást és a mindennapi klinikai gyakorlati hasznot hozó szemléletet átadták nekem.

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁVAL KAPCSOLATOS KÖZLEMÉNYEK

1. Kulka J, Szász AM, Németh Z, et al. Expression of tight junction protein claudin-4 in basal-like breast carcinomas. *Pathol Oncol Res* 15:59–64, 2009
2. Szász AM, Tőkés AM, Micsinai M, et al. Prognostic significance of claudin expression changes in breast cancer with regional lymph node metastasis. *Clin Exp Metastasis* 28:55–63, 2011
3. Szász AM, Németh Z, Gyórfy B, et al. Identification of a claudin-4 and E-cadherin score to predict prognosis in breast cancer. *Cancer Sci* 102:2248–2254, 2011

EGYÉB VÁLOGATOTT ONKOLÓGIAI TÉMÁJÚ KÖZLEMÉNYEK

1. Jakab C, Halász J, Szász AM, et al. Expression of claudin-1, -2, -3, -4, -5 and -7 proteins in benign and malignant canine mammary gland epithelial tumours. *J Comp Pathol* 139:238–245, 2008
2. Németh Z, Szász AM, Tátrai P, et al. Claudin-1, -2, -3, -4, -7, -8, and -10 protein expression in biliary tract cancers. *J Histochem Cytochem* 57:113–121, 2009
3. Tőkés AM, Szász AM, Farkas A, et al. Stromal matrix protein expression following preoperative systemic therapy in breast cancer. *Clin Cancer Res* 15:731–739, 2009
4. Németh J, Németh Z, Tátrai P, et al. High expression of claudin-1 protein in papillary thyroid tumor and its regional lymph node metastasis. *Pathol Oncol Res* 16:19–27, 2010
5. Szász AM, Nyirády P, Majoros A, et al. β -catenin expression and claudin expression pattern as prognostic factors of prostatic cancer progression. *BJU Int* 105:716–722, 2010
6. Székely B, Langmár Z, Somlai K, et al. A várandósság alatti emlőrák kezelése. *Orvosi Hetilap* 151:1299–1303, 2010
7. Székely B, Madaras L, Szentmártoni G, et al. A fiatal- és időskori emlőrák összehasonlítása klinikopatológiai jellemzők alapján. *Magyar Onkológia* 54:19–26, 2010
8. Valastyan S, Reinhardt F, Benaich N, et al. A pleiotropically acting microRNA, miR-31, inhibits breast cancer metastasis. *Cell* 137:1032–1046, 2009
9. Tung N, Miron A, Schnitt S, et al. Prevalence and predictors of loss of wild type BRCA1 in estrogen receptor positive and negative BRCA1-associated breast cancers. *Breast Cancer Res* 12:R95, 2010
10. Stoddard FR, Szász AM, Székely B, et al. Molecular genetic tests in the prediction of the prognosis of breast cancer. *Magazine of European Medical Oncology* 4:158–162, 2011

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ IDÉZHETŐ ABSZTRAKTOK

1. Szász AM, Micsinai M, Tőkés AM, et al. Tripla-negatív emlőrákok alcsoportjainak azonosítása claudinkifejeződés alapján. *Magyar Onkológia* 53 (Suppl):119–120, 2009
2. Szász AM, Micsinai M, Tőkés AM, et al. Proteomic profiling of breast carcinomas based on claudin expression pattern. *Cancer Res* 69(Suppl):6123, 2009
3. Szász AM, Jakab C, Székely B, et al. Proposal of claudin-low breast carcinoma model to understand its aggressive biological properties. *Acta Clin Croat* 49:228, 2010
4. Szász AM, Gyórfy B, Németh Z, et al. Claudin-4/E-cadherin index to predict prognosis in breast cancer. *Eur J Cancer* 47(Suppl):181, 2011