

***Nemzeti Onkológiai Kutatás-Fejlesztési Konzorcium  
a daganatos halálozás csökkentésére***

**1/48/2001**

**Zárójelentés: 2001. május 15.-2004. december 31.**

**RP4. Az emlőrákok molekuláris biológiai sajátosságai  
és felhasználásuk a diagnosztikában és terápiában**

**Dr. Csuka Orsolya  
Országos Onkológiai Intézet**

## ***RP4. Az emlőrákok molekuláris biológiai sajátosságai és felhasználásuk a diagnosztikában és terápiában***

***Témavezető: dr. Csuka Orsolya, Országos Onkológiai Intézet***

### **1. Sporadikus emlődaganatok kialakulásának mechanizmusa**

#### **1.1. A genetikai instabilitás szerepe az emlődaganatok kialakulásában**

#### **1.2. Epigenetikus gén-inaktiválás szerepe az emlődaganatok kialakulásában**

### **2. Hatékony biomarker készlet kialakítása az emlő tumorok prognózisára, terápiás érzékenységük predikciójára**

#### **2.1. Emlő tumorok molekuláris stagingje, residuális tumorsejtek azonosítása a keringésben, csontvelőben.**

#### **2.2. GnRH analógok direkt hatása tumorsejtekre.**

#### **2.3. DNS chip alkalmazása az emlő tumorok prognózisára és terápiás érzékenységének predikciójára.**

### **1. Sporadikus emlődaganatok kialakulásának mechanizmusa**

#### **1.1. A genetikai instabilitás szerepe az emlődaganatok kialakulásában**

A daganatok kialakulását genetikai instabilitás megjelenése kíséri, amely DNS mutációk megjelenéséhez, illetve bizonyos gének elvesztéséhez (LOH, AI) vezet. Vizsgálat sorozatunkban azt a hipotézist kívántuk tesztelni, hogy az emlődaganatok kialakulását kísérő gén inaktivációban az allel vesztés lényegi szerepet játszik-e.

Ennek érdekében az allel vesztés (LOH) gyakoriságát meghatároztuk:

1., DNS repair szabályozó génekben RAD51, RAD52, ATM, XRCC3

2., Szöveti homeosztatikus szabályozó génekben: APC, Cadherin E

Összefüggést kerestünk az LOH gyakoriság és az emlő tumorok szövettani típusa között annak igazolására, hogy az eltérő szövettani típusú tumorok kialakulását eltérő genetikai változások kísérik.

Vizsgálatainkban 244 emlő daganatból izolált 244 DNS mintában határoztuk meg az allel vesztés mértékét. A ductális emlő carcinomák száma 202, míg a lobuláris emlő daganatok száma 42 volt.

A lobuláris és ductális emlő carcinomák prognózisa, gyakorisága egymástól eltérő. A lobuláris emlő carcinomák előfordulási gyakorisága kisebb, prognózisa viszonylag kedvezőbb, mint a ductális carcinomáké. A microsatellita marker vizsgálatok tanúsága szerint a ductális carcinomákban a DNS repairben résztvevő gének esetében az LOH gyakorisága: 30% ATM, 20% XRCC3, 15% RAD52, 14%, RAD51 génekre vonatkozólag. A szöveti homeosztatikus szabályozó APC gén esetében az LOH gyakorisága 18%, míg az E-cadherin génnél az LOH gyakorisága 37%.

Eredményeink szerint a lobuláris és ductális carcinomák kialakulását kísérő gén inaktiváció nagy gyakorisággal allel vesztés útján történik. A lobuláris és ductális carcinomák LOH mintázata egymástól eltérő. A ductális carcinomákban az allel vesztés főleg a DNS repair géneket érinti, amelyek inaktiválása fokozott terápiás érzékenységet eredményezhet. Lobuláris emlő carcinomákban az allel vesztés az E-cadherin esetében a leggyakoribb (45%), a DNS repair génekben az LOH gyakorisága 5-20%, amely a terápiás érzékenységet modulálhatja. Vizsgálatainkban megállapítottuk azt is, hogy a ductális emlő carcinomák jól differenciált (grade I.) és dedifferenciált (grade III.) típusa eltérő allel vesztéssel jellemezhető.

Ezek a vizsgálati adataink arra utalnak, hogy a dedifferenciált tumorok nem a grade I. stádiumon keresztül, hanem külön genetikai úton alakulnak ki, amely eltérő tumor biológiai sajátosságokkal társul.

Vizsgálataink igazolták, hogy az emlő tumorok esetében a genetikai instabilitás kialakulásához a DNS repair enzimek (ATM, XRCC, RAD51, RAD52) allel vesztese nagymértékben hozzájárulhat. A DNS repair gének inaktiválódása a daganatok terápiás érzékenységét is módosíthatja. Vizsgálataink adatokat szolgáltatottak arra vonatkozólag is, hogy az eltérő szövettani típusú emlő daganatok eltérő genetikai útvonalon alakulnak ki.

## **1.2. Epigenetikus gén-inaktiválás szerepe az emlődaganatok kialakulásában**

A carcinogenezis folyamatát a tumor szuppresszor gének inaktiválása kíséri. A gén inaktiválás epigenetikus úton is kialakulhat a gén-promoter régió hypermetilációjával. Ismerté vált, hogy a DNS mismatch repair gének (MMR) gének) és p16 gén hypermetilációja a vastagbél daganatok kialakulásának oki tényezője lehet. A vizsgálatsorozat célkitűzése az, hogy felderítsük az emlőtumorokra jellemző gén-hypermetilációs mintázatot. Az emlőtumorok kialakulásában az estrogen receptoroknak (ER) kitüntetett szerepe van. Bebizonyosodott az is, hogy az emlődaganatok kialakulása során az ER  $\beta$  mennyisége nő az ER  $\alpha$  szint egyidejűleg csökken. Feltételezhető, hogy az ER  $\alpha$  szint csökkenés a gén hypermetilációjával függ össze. A szöveti homeostasis szabályozásában, az invazív növekedés megakadályozásában az APC – Cadherin E – Catenin  $\beta$  rendszernek kitüntetett szerepe van. Ezen gének mutációja emlőtumorokban ritkán fordul elő, de epigenetikus inaktiválások hypermetilációval plauzibilisnek tűnik.

Vizsgálataink egyik lényeges célkitűzése az emlődaganatok tumorszuppresszor génjeinek metiláció inaktiválásának (BRCA1, APC) vizsgálata, valamint a szerreztenciában szerepet játszó MGMT és hMLH1 epigenetikus inaktivációjának meghatározása.

A vizsgálat sorozat egyik alapvető célkitűzése annak eldöntése, hogy a metilációs markerek keringő daganatsejtek, illetve szérumban megjelenő tumor DNS kimutatására is alkalmasak-e. A metilált gének MSP analízisét ennek értelmében a primer emlő daganatokban, keringő daganatsejtekben és szérumban DNS mintákon is elvégeztük.

Megállapítottuk, hogy az APC, p16 gének metilációs gyakorisága közel azonos a metasztázist adó, illetve in situ emlő daganatokban. Ezzel szemben a sejt adhéziót biztosító E-Cadherin gének metilációs gyakorisága a metasztázist adó emlő daganatokban megnövekszik.

Az emlő daganatok epigenetikus vizsgálata alapján bebizonyosodott, hogy a daganat sejtek metilációs mintázatának meghatározása elősegítheti a daganat progresszió nyomonkövetését, a terápia monitorizálását, a daganatok molekuláris stagingjét. A promoter region hypermetilációja 100%-os biztonsággal kimutatható, eloszlása nem random, költség hatékony és gyors eljárás, ezért a hypermetilált DNS ideális tumor markernek tekinthető.

## **2. Hatékony biomarker készlet kialakítása az emlő tumorok prognózisára, terápiás érzékenységük predikciójára**

### **2.1. Emlő tumorok molekuláris stagingje, residuális tumorsejtek azonosítása a keringésben, csontvelőben.**

Az emlődaganatok kiújulása jórészt annak tulajdonítható, hogy u.n. micrometasztázisok vannak jelen a csontvelőben és a nyirokcsomóban. Az emlőtumoros betegek kezelési

stratégiájához ezért nélkülözhetetlen a micrometasztázisok azonosítása. Az emlő tumor sejtek azonosításának egyik lehetősége az epithel eredet igazolása citokeratin expresszió alapján. Vizsgálatainkban **320 emlő tumoros** betegből nyert csontvelő mintában és 42 őrszem nyirokcsomóban a daganat sejtek jelenlétét citokeratin 20, CEA és Mammoglobin RT-PCR segítségével vizsgáltuk. A daganatsejtek izolálását immunobead módszerrel végeztük. Megállapítottuk, hogy a csontvelő minták 30%-ában mikrometasztázisok jelenléte valószínűsíthető. Az őrszem nyirokcsomó minta 70%-ában citokeratin 20 pozitív volt kimutatható. A csontmetasztázis és a primer tumorok HER2 és p53 overexpressziója pozitív korrelációt mutatott. A csontmetasztázist adó primer tumorokban a HER2 és p53 szint háromszorosára emelkedik. A citokeratin pozitív (CK+) minták 45%-ában CEA mRNS is kimutatható. Mammoglobin (MAM) mRNS a CK+ minták 70%-ában detektálható. Nem tumoros kontroll mintákban sem CEA, sem MAM mRNS nem mutatható ki. Eredményeink arra utalnak, hogy az emlőtumor micrometasztázisainak azonosítására a CEA mRNS kevésbé alkalmas, mint a Mammoglobin. Több marker együttes vizsgálata elősegíti a tumorsejtek azonosítását és ezáltal hozzájárul a legoptimálisabb terápia kiválasztásához.

A micrometasztázisok azonosítására (MM) az emlő daganatsejtek kimutatására a mammoglobin RT-PCR módszert alkalmaztuk. Az azonosított daganatsejtek HER2, Topo II státusát real-time PCR módszerrel meghatároztuk. Ezek a vizsgálatok fontos információt szolgáltathatnak a beteg Taxán, illetve Antracyclin kezeléssel szembeni érzékenységre. A csontvelő metasztázis predikciójának érdekében összefüggést kerestünk a primer daganatok biomarkerei (ER status, HER2, nyirokcsomó status, nm23, c-met) között.

Vizsgálataink során megállapítottuk, hogy a hormon dependens tumorok kisebb gyakorisággal (26%) képeztek csontmetasztázist, mint az ER – tumorok (74%).

Mivel a csontmetasztázist adó betegek jelentős többsége hormon independens, ezért a hormon terápia alkalmazhatósága az ebbe a csoportba tartozó betegeknél korlátozott. A HER2 expresszió mértéke a csontvelő metasztázist adó tumorokban (B.M. Met +) megközelítőleg 2,5x magasabb, mint a metasztázist nem adó daganatokban. További prospektív tanulmányok döntik majd el, hogy a kimutatott csontvelő metasztázis esetén alkalmazott adjuváns kezelés valóban javítja-e a beteg túlélését, illetve megakadályozza-e a távoli metasztázis kialakulását.

## **2.2. GnRH analógok direkt hatása tumorsejtekre.**

A GnRH analógokkal való kezelés hatékonysága GnRH receptorok jelenlétének függvénye. Összefüggést kerestünk a daganatok steroid receptor státusa és GnRH receptor tartalma között.

Vizsgálataink szerint az emlődaganatok steroid receptor és GnRH receptor tartalmuk alapján az alábbi csoportba sorolhatók:

- 1., Steroid receptor negatív, GnRH receptor pozitív: 24%
- 2., Steroid receptor pozitív, GnRH receptor pozitív: 30%
- 3., Steroid receptor negatív, GnRH receptor negatív: 20%
- 4., Steroid receptor pozitív, GnRH receptor negatív: 26%

A GnRH analógok a szteroid anti-hormon terápia mellett új lehetőséget kínálnak a hormondependens és independens daganatok kezelésére, gyógyítására. Közülük elsősorban az emlő- és prosztatatumorok terápiája válik lehetővé tartós hatású GnRH-analógokkal (Zoladex, Suprefact, Decapeptyl). Előnyük, hogy kasztrációs hatásuk reverzibilis, így nem terhelik pszichésen a beteget. A GnRH-analógok fokozott tumorgátló hatásúak, és hatása azzal is magyarázható, hogy direkt módon, szelektíven hatnak a GnRH-receptorral rendelkező daganatokra. Alkalmazásuk lehetővé teszi mind az ER pozitív, mind az ER negatív daganatok, elsősorban a nagy gyakoriságú emlő-, valamint prosztatadaganatok eredményes kezelését.

### **2.3. DNS chip alkalmazása az emlő tumorok prognózisára és terápiás érzékenységének predikciójára.**

A vizsgálat sorozat célja, hogy az emlő daganatok kialakulását és progresszióját kísérő genetikai utakat DNS chip technológiával feltérképezzük és ezáltal elősegítsük a daganatok molekuláris diagnózisát, prognózisát és az individuális terápiás terv kialakítását. A vizsgálat sorozat lehetővé teszi, hogy a daganatokat a genetikai lenyomat alapján alcsoportokba soroljuk és új terápiás célpontokat azonosítsunk.

Vizsgálatainkban célul tűztük ki, hogy a daganatok terápiás érzékenységét meghatározó gén expresszió mintázatát (DNS repair, apoptózis, rezisztencia gének) együttesen határozzuk meg. Ezen túlmenően a metasztázis és neovascularizációt kísérő gén expressziós mintázatot is meghatározzuk DNS chip technikával. A vizsgált DNS chip(ek) 100-200 gén kimutatását célozták meg, amely könnyű kiértékelhetősége miatt rutin diagnosztikai eljárássá fejleszthető.

Az emlő daganatos minták génexpressziós mintázatának meghatározására az alábbi cDNS chipeket használtuk 245 emlő daganatos betegből izolált RNS minta felhasználásával:

1. Growth Factor Gene Array,
2. Tumor Metastasis Gene Array,
3. Angiogenesis Gene Array,
4. Cancer Drug Resistance & Metabolism Gene Array,
5. DNA Damage Signaling Pathways Gene Array.

A vizsgálat sorozat alapvető célkitűzése olyan biomarkerek keresése, amelyek alkalmasak az emlő daganatok legjelentősebb biológiai sajátosságainak: a metasztázis képzés és a terápiás érzékenység jellemzésére.

A vizsgálat sorozat egyik alapvető célkitűzése a **metasztatizáló** és in situ emlő daganatok genetikai lenyomatának meghatározása azzal a céllal, hogy új terápiás targeteket azonosítsunk. A vizsgálatainkhoz használt "metasztázis" cDNS array 96 membránhoz kötött cDNS-t tartalmazott. A 65 in situ és 97 metasztatizáló ductális emlő carcinomákból előállított cDNS minták analízisét chemiluminescens módszerrel végeztük el.

15-15 azonos szövettani típusú azonos klinikai stádiumú poolozott mintát használtunk fel vizsgálatainkhoz.

A metasztázist adó daganatokban a sejtadhéziót biztosító Cadherin E (CDH1) szint alacsony. A metasztázist gátló tumor szuppresszor gének DCC és KAI1 PET expressziója szintén alacsony az áttétet adó daganatokban. Ezzel szemben az MMP9 proteáz a Cathepsin D hidroláz szint magasabb az áttétet adó daganatokban.

#### **2.3.1. DNS chip alkalmazása az emlődaganatok terápiás érzékenységének vizsgálatára**

Vizsgálataink arra irányultak, hogy a Taxoter kezeléssel szemben kialakuló rezisztencia mechanizmusát felderítsük. Vizsgálatainkban 65 Taxán rezisztens és 165 szenzitív emlő daganatos mintából RNS-t, DNS-t izoláltunk. A Taxoter transzportban szerepet játszó MDR1 gén polimorfizmust (Exon 12 C1236T) SSCR és DNS szekvencia analízissel vizsgáltuk.

Az MRP1-MRP5, valamint HER2 és EGFR expresszió mértékét cDNS chip segítségével határoztuk meg.

Megállapítottuk, hogy a Taxoter rezisztens daganatokban az MDR1 és MRP1 szint magasabb, mint a Taxoter szenzitív daganatokban.

Az EGFR és HER2 expresszió mértéke szintén magasabb a Taxoter rezisztens daganatokban. Figyelemre méltó, hogy az EGFR és HER2 overexpresszió együttesen fordul elő, amely arra

hívja fel a figyelmet, hogy a tirozin kináz gátlók és Herceptin kezelés együttes alkalmazása mellett a gyógyulás esélye megnövekedhet.

Az MDR1 gén polimorfizmus kimutatásának SSCP és DNS szekvenálásos analízise alapján a Taxán rezisztens mintákban a mutáns allél frekvenciája 57%, míg a szenzitív daganatokban 16%.

Vizsgálataink szerint a Taxoter rezisztencia kialakulásához a transzport fehérjék polimorfizmusához (MDR1) transzport gének közül az MDR1, MRP1 emelkedett expressziója, valamint az EGFR, HER2 gének overexpressziója járul hozzá.

Az általunk végzett génpolimorfizmus és cDNS chip vizsgálatok elősegítik a Taxán rezisztencia mechanizmus megismerését és a hatékonyabb kombinációs terápiás eljárások kifejlesztését.

Bebizonyosodott, hogy az emlő daganatok 25-30%-ában a HER2 gén amplifikálódik. A HER2 overexpressziót mutató daganatok sugár- és kemoterápiás kezeléssel szemben általában rezisztensek, prognózisuk kedvezőtlen. Ennek alapján feltételezhető, hogy a HER2 pozitív és HER2 negatív emlő daganatok tumor biológiai sajátosságai: áttétképződés, angiogenezis, proliferációs képességük egymástól jelentős mértékben eltérnek.

Eredményeink szerint a HER2 pozitív daganatokban az ErbB1 és ErbB2 szint magasabb, mint a HER2 negatív daganatokban. Az ErbB4, az IGFR1 szint viszont a HER2 negatív daganatokban megemelkedik.

Bebizonyosodott, hogy egyedül a HER2 status meghatározása nem alkalmas az emlődaganatok kemoszenzitivitásának jellemzésére. Az ErbB családba tartozó receptorok (ErbB1-4) egymással heterodimereket képezve alternatív növekedési szignálokat közvetítenek. Ennek alapján az ErbB receptorok gátlására alapozó terápiás stratégia akkor megfelelő, ha mind az ErbB1, mind az ErbB2 receptorokat kombináció terápia alkalmazásával gátoljuk (pl. Herceptin + tirozin kináz gátlók).

A HER2 pozitív daganatok fokozott metasztatizáló képességének egyik oka, hogy ezen daganatokban a matrix metalloproteázok (MMP2, MMP9, MMP14), valamint az urokináz típusú plazminogén aktivátor szint (Plau) magasabb, mint a HER2 negatív daganatokban.

#### **Az elvégzett munkából készült publikációk:**

Csuka O., Péley G., Dubecz S., Hargitai Á., Tóth K., Kámory E., Köves I., Doleschall Z., Péter I., Tóth J.: Emlődaganatok prognosztikai faktorai. Magyar Onkológia 44, 53-60, 2000

Dubecz S Jr, Csuka O, Torok K, Vasas N, Peley G, Doleschal Z, Sulyok Z, Lang I, Koves I.: [Clinical significance of bone marrow micrometastases of breast tumors] [Article in Hungarian]. Magy Seb. 2003 Aug;56(3-4):108-12.

Peley G, Toth J, Csuka, Sinkovics I, Farkas E, Koves I.: Immunohistochemistry and reverse transcriptase polymerase chain reaction on sentinel lymph nodes can improve the accuracy of nodal staging in breast cancer patients. Int J Biol Markers. 2001 Oct-Dec;16(4):227-32.