

# Molekuláris és szövettani prognosztikus faktorok malignus pleurális mezoteliómában

Doktori tézisek

**Dr. Bilecz Ágnes**

Semmelweis Egyetem  
Patológiai Tudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Hegedűs Balázs, Ph.D, tudományos munkatárs

Hivatalos bírálók: Dr. Rajnai Hajnalka, Ph.D, egyetemi adjunktus  
Dr. Szőke János, Ph.D, központvezető főorvos

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Tordai Attila, D.Sc, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Tóth Erika, Ph.D, osztályvezető  
főorvos

Dr. Patócs Attila, D.Sc, osztályvezető

Budapest  
2020

# 1. BEVEZETŐ

A malignus pleurális mezotelióma (MPM) ritka, ám rendkívül rossz prognózisú betegség. A jelenlegi kezelési lehetőségek nem vezetnek a betegek hosszútávú túlélésének jelentős javulásához.

Az MPM három fő szövettani típusa ismert: epitelioid, bifázisos és szarkomatoid. Ezen típusok prognózist befolyásoló hatása ismert, emellett jelentős szerepet játszanak azon betegek azonosításában, akik alkalmasak lehetnek radikális, sebészi, kemo- és radioterápiás kombinált kezelésre. A tumor sebészi rezekciója azonban csupán az esetek kis hányadában kivitelezhető, a betegek túlnyomó többsége platinabázisú kombinált kemoterápiás kezelésben részesül. Szükség van további szövettani tulajdonságok azonosítására, melyek epitelioid mezoteliómában szenvedő betegek prognosztikus csoportokba sorolását elősegíthetik. A morfológiai tulajdonságok prognosztikus és prediktív szerepe ismert a tüdő adenokarcinómáiban. Epitelioid MPM esetében a pleomorf altípus mutat szoros összefüggést negatív prognózissal, a további epitelioid altípusok kimenetellel való összefüggése nem tisztázott. Az epitelioid MPM szövettani gradálása nem része a rutin patológiai leletezésnek, azonban az irodalomban nemrég két, a betegek prognózisának becslését elősegítő pontrendszer is megjelent.

Az MPM-ben megfigyelt leggyakoribb molekuláris eltérések tumorszuppresszor géneket érintenek, így a CDKN2A és BAP1, bizonyos esetekben a p53 funkciójának kiesésével járnak. A telomeráz

enzim reaktivációja a daganatok kialakulásában kulcsfontosságú esemény. A reaktivációnak számos mechanizmusa ismert, köztük a telomerázt kódoló TERT gén promóter régiójának pontmutációi, melyek a génátíródást fokozó faktorok számára hoznak létre új kötőhelyeket. A TERT promóter mutációi számos rosszindulatú tumor esetében kifejezetten rossz prognózissal társulnak, így például rosszindulatú pajzsmirigy- és húgyhólyagdaganatokban, gliomákban, azonban az MPM betegek túlélésével való összefüggéssel kapcsolatban korlátozott mennyiségű irodalmi adat áll rendelkezésre.

## 2. CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk során a malignus pleurális mezotelióma prognosztikus és prediktív szempontból jelentős molekuláris és szövettani jellemzőit kerestük. Célkitűzéseink a következők voltak:

1. A magi atípiára és mitózisszámra, valamint a mitózisszámra és nekrozis megítélésére épülő gradálási rendszerek, valamint a tumorok predomináns növekedési mintázatának prognosztikus jelentőségének vizsgálata, valamint ezen változók közti összefüggések kimutatása.
2. A trimodális kezelés hatásosságát előrejelző szövettani jellemzők azonosítása.
3. A TERT promóter mutációk gyakoriságának és klinikopatológiai jellemzőkkel való összefüggésének vizsgálata.
4. A TERT promóterének gyakori polimorfizmusa (rs2853669) és mutációi közti interakció jellemzése.
5. A TERT promóter mutációit hordozó mezoteliómák aggresszív klinikai viselkedését magyarázó mechanizmusok megismerése, így sejtvonalakban vizsgáltuk a mutációk és a tumorsejt-immortalizáció, TERT mRNS-kifejeződés és ciszplatinnal szembeni érzékenység viszonyát.
6. A TERT promóter mutációk és a BAP1 vesztéssel járó genetikai eltérések közötti összefüggés jellemzése.

## **3. MÓDSZEREK**

### **3.1. Betegkohort**

A vizsgálatainkba bevont MPM betegek diagnózisa és kezelése ezen öt nagy európai centrumban történt: Bécsi Orvostudományi Egyetem, Ausztria, Jordanovac Központ, Zágrábi Egyetem, Horvátország, Esseni Orvostudományi Egyetem, Németország, Országos Korányi Tbc és Pulmonológiai Intézet, Magyarország, Golnik Egyetemi Klinika, Szlovénia. A vizsgálatokat a Helsinkii Deklarációnak megfelelően, a résztvevő intézmények etikai bizottságainak engedélyével végeztük. A betegek IMIG stádiumát, Karnofsky életminőség, valamint ECOG prognosztikus pontszámát, kezelésük részleteit, diagnózisuk, illetve haláluk vagy az utolsó találkozás időpontját gyűjtöttük össze. Az epithelioid MPM szövettani altípusainak vizsgálata során validációs kohortként a Rákgenom Atlasz Projekt által gyűjtött, nyilvánosan elérhető 55 digitalizált MPM metszetet és kapcsolódó klinikai adatokat elemeztük.

### **3.2 Minták**

Az epithelioid típusú MPM szövettani grádusának és növekedési mintázatának elemzése során 192 formalinban fixált, paraffinba ágyazott mintát vizsgáltunk. A mintákat 106 esetben video-asszisztált mellkastükrözés, 28 esetben pleurektómia, 28 esetben perkután vastagtübiopszia révén nyerték. 30 esetben a pontos sebészi mintavételi módszer nem volt ismert.

A TERT promóter mutációit egy a fentivel részlegesen átfedő, 182 MPM mintából álló kohortban vizsgáltuk, melyek közt 127 epitelioid és 54 nem epitelioid szövettani típusú volt. A TERT promóter mutációk és a betegek túlélése közötti összefüggést a teljes kohortot egy 83 osztrák betegből álló teszt kohortra és 99 szlovén és horvát betegből álló validációs kohortra osztva vizsgáltuk, így a prognosztikus hatás különböző földrajzi és gazdasági helyzetű országokban és különböző egészségügyi rendszerekben kezelt betegeken is megfigyelhettük.

### **3.3 Szövettani altípusok vizsgálata**

Epitelioid MPM-ként diagnosztizált 192 hematoxylin-eosin festett metszetet vizsgáltunk, melyeket a tumorok predomináns szövettani mintázata alapján osztályoztunk. A szövettani mintázatokat a Világegészségügyi Szervezet (WHO) által közzétett tumorosztályozás alapján definiáltuk, és a tumorokat szolid, tubulopapilláris, trabekuláris, mikrocisztikus, mikropapilláris és pleomorf altípusokba soroltuk.

### **3.4 Szövettani grádus meghatározása**

A tumorok grádusának meghatározást két közelmúltban publikált pontrendszer alapján végeztük. Ezek egyike, a magi grádus a tumorsejtek magi atípiája és mitózisszám alapján létrehozott háromosztatú skála. A mitózis-nekrózis rendszer a mitózisszám alacsony és magas volta, valamint nekrozis jelenlétét figyelembe vevő skála 0 és 2 közötti értékekkel.

### **3.5 BAP1 immunhisztokémiai festés**

BAP1 elleni antitesttel (Clone C-4, sc-28383, Santa Cruz Biotechnology) 1:200 hígításban immunhisztokémiai reakciót végeztünk 4  $\mu\text{m}$  vastag metszeteken. A kiértékelés során a mintát BAP1 negatívnak tekintettük magi pozitív reakció hiányában, függetlenül attól, hogy citoplazmatikus festődés látható volt-e.

### **3.6 Mezetelióma sejtvonalak**

Sebészi MPM mintákból alapított 22 primer sejtvonalat, valamint 5 nemzetközi MPM eredetű sejtvonalat használtunk vizsgálataink során.

### **3.7 DNS izolálás és a TERT promóter mutációinak kimutatása**

A genomi DNS izolálása FFPE minták esetében High Pure FFPE DNA Isolation Kit (Roche Diagnostics), sejtvonalak esetében DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen) alkalmazásával történt a gyártók ajánlásait követve. A TERT promóter az ATG start kodontól számított +65 és -278 bázispár közötti régiójának PCR amplifikációja után Sanger-szekvenálással történt a mutációk kimutatása Prof. Rajiv Kumar laboratóriumában, a Német Rákkutató Központban, Heidelbergben.

### **3.8 Kvantitatív PCR**

Totál RNS izolálást végeztünk 22 MPM sejtvonalon TRIzol reagens (Invitrogen) használatával. Az RNS-mintákat DNáz alkalmazásával tisztítottuk, reverz transzkripciót végeztünk, majd kvantitatív valós idejű

PCR segítségével meghatároztuk a sejtvonalak hTERT mRNS expresszióját.

### **3.9 Ciszplatin érzékenység vizsgálata**

24 MPM sejtvonalat különböző ciszplatinkoncentrációkkal (0, 0,5, 1, 3, 5, and 10 uM) kezeltük 24 órán át. A sejteket ezután fixáltuk és Sulforodamin B-vel festettük. A fehérjekötött SRB mennyiségét fotometriai módszerrel határoztuk meg.

### **3.10 Statisztikai analízis**

Fisher egzakt teszt alkalmazásával jellemeztük kategorikus változók, mint a szövettani jellemzők és klinikai paraméterek, valamint a TERT promóter mutációs státusz közti összefüggést. A medián túlélés számítása Kaplan—Meier-módszerrel történt. A túlélési görbék összehasonlítását log-rank teszttel végeztük. Az mRNS expresszió és a ciszplatinnal szembeni érzékenység elemzése kétoldali t-teszttel történt. A túlélést befolyásoló független faktorok vizsgálata Cox-modellben történt, a faktorok relatív kockázatát és annak 95% konfidenciaintervallumát határoztunk meg. Az eredményeket  $p < 0.05$  esetén tekintettük statisztikailag szignifikánsnak. A statisztikai elemzéseket GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc) és az SPSS Statistics 23.0 szoftverek használatával végeztük.



## 4. EREDMÉNYEK

### 4.1 Szövetteni altípusok, magi grádus és mitózis-nekrózis pontszám epithelioid mezoteliómában

A minták között a predomináns növekedési mintázat 52,1%-ban volt szolid, 28,6%-ban tubulopapilláris, 10,4%-ban trabekuláris. A mikrocisztikus, pleomorf és mikropapilláris altípusok 4,7, 3,1 és 1,0%-ban voltak megfigyelhetők. A magi atypia és mitotikus alakok számát értékelve, a minták 54,7% magi grade 1, 32,3%-a magi grade 2 és 13,0%-a magi grade 3 besorolású volt. Nekrózis a minták 49,0%-ában volt jelen. A mitózis-nekrózis pontszám 0 volt a minták 45,8%-ában, 40,1% esetében 1 valamint 14,1%-ban 2.

A szolid és trabekuláris szubtípusok és a magasabb magi grádus és mitosis-nekrózis pontszám között statisztikailag jelentős eltérét figyeltünk meg ( $p=0,000,8$  és  $p<0,0001$ , Khí-négyzet próba).

A tubulopapilláris és mikrocisztikus altípusok a betegek hosszabb medián túlélésével mutattak összefüggést (727 és 936 nap). A szolid és trabekuláris predomináns altípusokban a betegek medián túlélése rövidebb, 397 és 394 nap volt. A legrosszabb klinikai kimenetel a pleomorf altípusnál volt megfigyelhető, ahol a medián túlélés 173 nap volt, mely mind a tubulopapilláris, mikrocisztikus és szolid szubtípusokhoz viszonyítva is statisztikailag szignifikánsan rövidebb volt ( $p<0,0001$ , 0,0085 and 0,0277).

Figyelembe véve tubulopapilláris és mikrocisztikus, valamint a szolid és trabekuláris altípusok átfedő túlélési görbéit a további vizsgálatok során ezeket az altípusokat egyesítve vizsgáltuk. Az összevont szolid/trabekuláris és tubulopapilláris/mikrocisztikus csoportok között statisztikailag szignifikáns túlélésbeli különbségek voltak megfigyelhetők (medián túlélés: 397 és 732 nap,  $p=0,003$ ).

Mindkét kompozit grade rendszer alkalmasnak bizonyult a várható prognózis becslésére. A medián túlélés a mitózis-nekrózis rendszer 0, 1 és 2 csoportjaiban 720, 383 ( $p<0,0001$ ) és 165 nap ( $p<0,0001$ ) volt. A magi grade 1 és 2 csoport között nem mutatkozott szignifikáns eltérés (median túlélés: 555 és 486 nap,  $p=0,531$ ), míg a magi grade 3 csoport medián túlélése jelentősen rövidebb volt (123 nap,  $p=0,0002$ ).

Hasonló megfigyeléseket tettünk a validációs kohort elemzése során. A solid/trabekuláris altípusokban jelentősen rövidebb medián túlélés volt megfigyelhető a tubulopapilláris/mikrocisztikus altípusokkal összehasonlítva (406 és 795 nap,  $p=0,001$ ). A magi grade 3 szignifikánsan rövidebb túléléssel (232 nap) mutattak összefüggést az alacsonyabb grádusokkal összehasonlítva (823 és 459 nap). A mitózis-nekrózis pontszám 2 tumorok medián túlélése szintén rövidebb volt az alacsonyabb pontszámú tumorokhoz viszonyítva (330, 551 és 795 nap).

## **4.2 A trimodális kezelésre adott válasz és a szövettani altípusok**

A trimodális kezelésben részesült betegek túlélése jelentősen hosszabb volt mind a tubulopapilláris/mikrocisztikus, mind a szolid/trabekuláris altípusú tumorok esetében a nem trimodális kezelésben részesültekhez hasonlítva. A két kezelési mód közötti különbség azonban kifejezettebb volt a tubulopapilláris/mikrocisztikus tumorok esetén. A trimodális kezelést kapott betegcsoportokat vizsgálva, a tubulopapilláris és mikrocisztikus altípusok esetében hosszabb túlélés (1068 nap) volt megfigyelhető, mint a szolid/trabekuláris altípusokkal összefüggésben (580 nap, relatív rizikó: 2,29 [95% KI: 0,95-5,12],  $p=0,066$ ).

## **4.3 TERT promóter mutáció és klinikopatológiai paraméterek, valamint teljes túlélés**

A 182 MPM - köztük 69,8% epithelioid, 24,2% bifázikus és 4,9% szarkomatoid típusú - mintát tartalmazó kohortunk vizsgálata során 10,4% esetén azonosítottuk a TERT promóter mutációit. A TERT promóter mutációi gyakrabban fordultak elő nem epithelioid típusú tumorokban ( $p<0,001$ ) és az epithelioid MPM pleomorf altípusában ( $p=0,002$ ). A betegek túlélése statisztikailag jelentősen rövidebb volt a mutációt hordozó tumorok esetében (262 nap), mint a vad típusú tumorok esetében (469 nap,  $p<0,0001$ ). A prognózissal való összefüggés megfigyelhető volt mind az osztrák teszt kohort, mind a horvát-szolvén betegcsoport esetén. A TERT promóter mutációval összefüggő negatív kimenetel statisztikailag szignifikáns volt az epithelioid és a nem

epitelioid típusokon belül: az epithelioid csoportban a TERT promóter vad és mutáns tumorok esetén a medián túlélés 340 és 510 nap volt ( $p=0,011$ ), a nem epithelioid csoportban 199 nap a mutációt hordozók és 412 nap a vad típusú TERT promóter esetén ( $p=0,009$ ).

#### **4.4 A gyakori polimorfizmus rs2853669 és a TERT promóter mutációk közti együttműködés vizsgálata**

A TERT promóter mutáns eseteket vizsgálva nem találtunk jelentős eltérést a polimorfizmust hordozó és nem hordozó betegek túlélésében ( $p=0,935$ ). Így MPM betegeinkben nem volt kimutatható a gyakori polimorfizmus TERT promóter mutációt ellensúlyozó hatása.

#### **4.5 A TERT mRNS kifejeződése és a TERT promóter mutációi**

A TERT mRNS kifejeződését a konstitutívan aktív RPL41 gén kifejeződéséhez viszonyítva vizsgáltuk, és a mutáns státuszú sejtvonalak ( $n=9$ ) esetében szignifikánsan magasabb átíróadási aktivitást azonosítottunk a TERT promóter mutációt nem hordozó sejtvonalakkal ( $n=13$ ) összehasonlítva.

#### **4.6 TERT promóter státusz és tumorsejt-immortalizáció**

Primer sejtvonal alapítását kíséreltük meg 45 MPM sebészi mintából. A sejtvonal-alapítás 22 esetben volt sikeres, melyek között 9 sejtvonal bizonyult TERT promóter mutációt hordozónak. A 23 sikertelen kísérlet egyikében sem volt kimutatható mutáció a primer tumorban. A TERT promóter mutáns státusz és a sejtvonal-alapítás sikere között szignifikáns összefüggés volt kimutatható ( $p<0,001$ ). Sem a primer tumorok IMIG

stádiuma sem szövettani típusa esetén nem volt kimutatható hasonló, az tumorsejt-immortalizáció létrejöttével való statisztikai összefüggés (rende:  $p=0,539$ ,  $p=0,206$ ).

#### **4.7 TERT promóter státusz és in vitro ciszplatin rzékenység**

A ciszplatinnal szembeni érzékenység meghatározására életképességi vizsgálatokat végeztünk 24 MPM sejtvonalon. A sejtvonalak közt 7 hordozta a TERT promóter mutációit, 17 rendelkezett vad típusú TERT promóterrel. Noha a mutáns és vad típusú sejtvonalak ciszplatin érzékenysége között nem találtunk statisztikailag szignifikáns különbséget, a mutáns sejtvonalak tendenciája megfigyelhető volt az alacsonyabb félmaximális hatásos (IC50) ciszplatin koncentrációk felé ( $p=0,097$ ).

#### **4.8 TERT promóter státusz és BAP1 kifejeződés**

A TERT promóter mutációk és a BAP1-vesztés között erős negatív korrelációt figyeltünk meg ( $p=0,0002$ ). A TERT promóter mutációit hordozó tumorminták mindegyike megtartott magi BAP1 kifejeződést mutatott, azaz a TERT promóter mutáns státusz és a BAP1 elvesztése egymást kizáró genomi eseményeknek tekinthetők vizsgálataink alapján.

## 5. KÖVETKEZTETÉSEK

1. Az epithelioid MPM szövettani altípusai, magi grádusa és mitózis-nekrózis pontszáma fontos prognosztikus faktorok.
2. A szolid/trabekuláris altípusok szignifikáns összefüggést mutatnak a magasabb grádussal.
3. A trimodális kezelést kapott betegek között tubulopapilláris/mikrocisztikus altípusú tumorok esetén nagyobb mértékű terápiás válasz figyelhető meg a szolid/trabekuláris altípusokhoz viszonyítva.
4. A TERT promóter mutáns státusz erős, független előrejelzője a negatív kórjóslatnak.
5. A TERT promóter mutációi jelentősen gyakrabban fordulnak elő nem epithelioid MPM-ben, valamint az epithelioid MPM pleomorf altípusában.
6. Az rs2853669 C>T gyakori polimorfizmus – ellentétben a húgyhólyagrákok és glioblasztóma esetében közölt irodalmi adatokkal – nem befolyásolta a TERT promóter mutáció hatását a kórjóslatra.

7. A TERT promótert hordozó tumorsejtekből jelentősen magasabb valószínűséggel történt sikeres sejtvonal-alapítás, mint vad típusú tumorokból.
8. A TERT gén kifejeződése jelentősen fokozott volt a TERT promóter mutációit hordozó sejtvonalak esetén.
9. A TERT promóter mutáns sejtvonalak erős tendenciát mutattak a fokozott ciszplatinnal szembeni érzékenység felé.
10. A TERT promóter mutációi és a BAP1 elvesztésével járó genetikai elváltozások egymást kizáró történések MPM-ben.

## 6. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

### 6.1 Disszertációhoz kapcsolódó publikációk:

Bilecz A, Stockhammer P, Theegarten D, Kern I, Jakopovic M, Samarzija M, Klikovits T, Hoda MA, Dome B, Oberndorfer F, Muellauer L, Fillinger J, Kovacs I, Pirker C, Schuler M, Plones T, Aigner C, Klepetko W, Berger W, Brcic L, Laszlo V, Hegedus B. (2020) Comparative analysis of prognostic histopathologic parameters in subtypes of epithelioid pleural mesothelioma. *Histopathology*. 77: 55-66. IF=3.626

Pirker C, Bilecz A, Grusch M, Mohr T, Heidenreich B, Laszlo V, Stockhammer P, Lotsch-Gojo D, Gojo J, Gabler L, Spiegl-Kreinecker S, Doeme B, Steindl A, Klikovits T, Hoda MA, Jakopovic M, Samarzija M, Mohorcic K, Kern I, Kiesel B, Brcic L, Oberndorfer F, Mullauer L, Klepetko W, Schmidt WM, Kumar R, Hegedus B, Berger W. (2020) Telomerase reverse transcriptase promoter mutations identify a genomically defined and highly aggressive human pleural mesothelioma subgroup. *Clin Cancer Res*. 26:3819-3830. IF=10.107



## 6.2 Disszertációhoz nem kapcsolódó publikációk:

Laengle J, Stift J, Bilecz A, Wolf B, Beer A, Hegedus B, Stremitzer S, Starlinger P, Tamandl D, Pils D, Bergmann M. (2018) DNA damage predicts prognosis and treatment response in colorectal liver metastases superior to immunogenic cell death and T cells. *Theranostics*, 8: 3198-3213. IF= 8.063

Hegedus L, Garay T, Molnar E, Varga K, Bilecz A, Torok S, Padanyi R, Paszty K, Wolf M, Grusch M, Kallay E, Dome B, Berger W, Hegedus B, Enyedi A. (2017) The plasma membrane Ca(2+) pump PMCA4b inhibits the migratory and metastatic activity of BRAF mutant melanoma cells. *Int J Cancer*, 140: 2758-2770. IF=7.360

Bridgeman VL, Vermeulen PB, Foo S, Bilecz A, Daley F, Kostaras E, Nathan MR, Wan E, Frentzas S, Schweiger T, Hegedus B, Hoetzenecker K, Renyi-Vamos F, Kuczynski EA, Vasudev NS, Larkin J, Gore M, Dvorak HF, Paku S, Kerbel RS, Dome B, Reynolds AR. (2017) Vessel co-option is common in human lung metastases and mediates resistance to anti-angiogenic therapy in preclinical lung metastasis models. *J Pathol*, 241: 362-374. IF= 6.253