

**SEMMELWEIS EGYETEM**  
**DOKTORI ISKOLA**

**Ph.D. értekezések**

**2755.**

**HABINA-NAGY NIKOLETT**

**Urológia**  
című program

Programvezető: Dr. Nyirády Péter, egyetemi tanár

Témavezető: Dr. Szarvas Tibor, tudományos főmunkatárs

# Ritka húgyhólyagdaganatok molekuláris vizsgálata

Doktori értekezés

**Habina-Nagy Nikolett**

Semmelweis Egyetem  
Klinikai orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. habil. Szarvas Tibor, PhD., 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

<b>Tartalomjegyzék</b>	
<b>Rövidítések jegyzéke .....</b>	<b>4</b>
<b>1. Bevezetés.....</b>	<b>7</b>
<b>1.1 Urachus carcinoma.....</b>	<b>7</b>
<b>1.1.1 Kialakulása, patológiája, epidemiológiája .....</b>	<b>7</b>
<b>1.1.2 Tünetei és diagnosztikája.....</b>	<b>9</b>
<b>1.1.3 Kezelési lehetőségek.....</b>	<b>12</b>
<b>1.1.4 Az UrC molekuláris háttere.....</b>	<b>19</b>
<b>1.2 Primer hólyag adenocarcinoma .....</b>	<b>20</b>
<b>1.2.1 Epidemiológiája és patológiája.....</b>	<b>20</b>
<b>1.2.2 Tünetei, diagnosztikája és prognózisa .....</b>	<b>22</b>
<b>1.2.3 Kezelési lehetőségek.....</b>	<b>25</b>
<b>1.2.4 A PBAC molekuláris háttere .....</b>	<b>26</b>
<b>2. Célkitűzések .....</b>	<b>29</b>
<b>3. Módszerek .....</b>	<b>30</b>
<b>3.1 Minta- és klinikai adatgyűjtés .....</b>	<b>30</b>
<b>3.2 Minták feldolgozása, DNS izolálás .....</b>	<b>31</b>
<b>3.3 DNS minták minőségi és mennyiségi ellenőrzése.....</b>	<b>31</b>
<b>3.4 DNS szintű molekuláris vizsgálatok.....</b>	<b>31</b>
<b>3.4.1 Az Illumina MiSeq szekvenálás (6 gén) .....</b>	<b>32</b>
<b>3.4.2 Ion Torrent Oncomine szekvenálás (161 gén).....</b>	<b>32</b>
<b>3.4.3 DNS szintű mikroszatellita instabilitás (MSI) vizsgálat.....</b>	<b>35</b>
<b>3.5 Fehérje szintű vizsgálatok.....</b>	<b>36</b>
<b>3.5.1 A <math>\beta</math>-catenin és PTEN fehérjék IHC vizsgálata UrC kohorton .....</b>	<b>36</b>
<b>3.5.2 MMR fehérjék vizsgálata IHC analízissel UrC és PBAC kohorton .....</b>	<b>36</b>
<b>3.6 Statisztikai kiértékelés.....</b>	<b>37</b>

<b>4. Eredmények</b> .....	38
<b>4.1 Minta és klinikai adatgyűjtés eredményei</b> .....	38
<b>4.2 Betegkohortok karakterisztikája</b> .....	41
<b>4.3 DNS szintű molekuláris vizsgálatok eredményei</b> .....	45
<b>4.3.1 Illumina MiSeq 6 génes panel vizsgálat eredményei</b> .....	45
<b>4.3.2 Az Ion Torrent 161 génes panel vizsgálat eredményei</b> .....	47
<b>4.4 Fehérje szintű molekuláris vizsgálatok eredményei</b> .....	62
<b>4.4.1 A <math>\beta</math>-catenin és a PTEN fehérjék IHC vizsgálatának eredményei</b> .....	62
<b>4.4.2 Az MMR fehérjék IHC vizsgálatának eredménye PBAC mintákban</b> ....	63
<b>4.4.3 A MMR fehérjék IHC vizsgálatának eredménye UrC mintákban</b> .....	64
<b>5. Megbeszélés</b> .....	65
<b>6. Következtetések</b> .....	80
<b>7. Összefoglalás / Summary</b> .....	82
<b>8. Irodalomjegyzék</b> .....	84
<b>9. Saját publikációk jegyzéke</b> .....	100
<b>9.1 Az értekezés témájában megjelent közlemények</b> .....	100
<b>9.2 Egyéb témában megjelent közlemények</b> .....	100
<b>10. Köszönetnyilvánítás</b> .....	102

## **Rövidítések jegyzéke**

5-FP – fluoropirimidin

5-FU - 5-fluorouracil

ADC – adenocarcinoma

AMACR - alfa-metilacil-CoA racemáz

BNO – betegségek nemzetközi osztályozása

CA125 - cancer antigén 125

CA19-9 - cancer antigén19-9

CAPE – capecitabin

CBDCA – karboplatin

CD15 – Leu-M1

CEA - carcinoembrionális antigén

CK34βE12 – nagy molekulású citokeratin

CK7 – citokeratin 7

CM – citoplazma membrán

CNV: copy number variants - számbéli eltérések

COSMIC – Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer

CP – ciklofoszfamid

CRC – colorectalis carcinoma

CT – computer tomográfia

CTLA-4 - citotoxikus T-limfocita antigén-4

DDP – platina

DOX – doxorubicin

EGFR - epidermális növekedési faktor receptor

EMA – European Medicines Agency – Európai Gyógyszerügynökség

FDA – Food and Drug Administration

FFPE – formalin fixált paraffinba ágyazott

FOLFOX4 - fluorouracil, leucovorin, oxaliplatin

FOLFOX6 -folinsav, 5-fluorouracil, oxaliplatin

GATA3 – GATA kötő fehérje 3

GC - gemcitabin ciszplatin

GSK3β - glikogén szintáz kináz-3

HE – hematoxilin eozin  
HER2 - humán epidermális növekedési factor receptor 2  
HIPEC - hyperthermic intraperitoneal chemotherapy- hipertermális intraperitoneális kemoterápia  
IEG - immun-ellenőrzőpont gátló  
IHC - immunhisztokémia  
INDEL - inzerció és delécio  
MEK – mitogén aktivált protein kináz kináz  
MET - mezenchimális-epithéliális tranzicionális faktor  
MMR – mismatch repair – DNS hibajavító rendszer  
MR – mágneses rezonancia  
MSI – mikroszatellita instabilitás  
MSI-H – mikroszatellita instabil high  
MSI-L – mikroszatellita instabil low  
MSS – mikroszatellita stabil  
N.a - nincs adat  
NGS – új-generációs szekvenálás  
NKI - Netherlands Cancer Institute – Holland Rákkutató Intézet  
NOS - not otherwise specified –nem specifikus  
NR - Nemzeti Rákregiszter  
OCAv3 - Oncomine™ Comprehensive Assay v3  
PARP - poly (adenozin difoszfát [ADP]-ribóz) polimeráz  
PBAC - primer hólyag adenocarcinoma  
PCR – polimeráz lánreakció  
PD-1 - programozott sejthalál fehérje-1  
PET – pozitron emissziós tomográfia  
QCI - Qiagen Clinical Insight  
rHuPH20 – rekombináns humán hialuronidáz  
RTK – tirozin-kináz receptor  
RTU – ready to use – azonnal használható  
SNV - single nucleotide variants  
SRC - signet ring cell – pecsétgyűrűsejtes fenotípus

TAX – paclitaxel

TERT -telomeráz reverz transzkriptáz

TNM – tumor node metastasis – tumor, nyirokcsomó, metasztázis

TURB – húgyhólyag transzurethrális reszekciója

TXT – docetaxel

UH – ultrahang

UHU – Urachus Hungaricus

UKE – Universitatsklinikum Essen

UrC – urachus carcinoma

VEGFR - vaszkuláris endothél növekedési faktor receptor

VEP – variant effect predictor

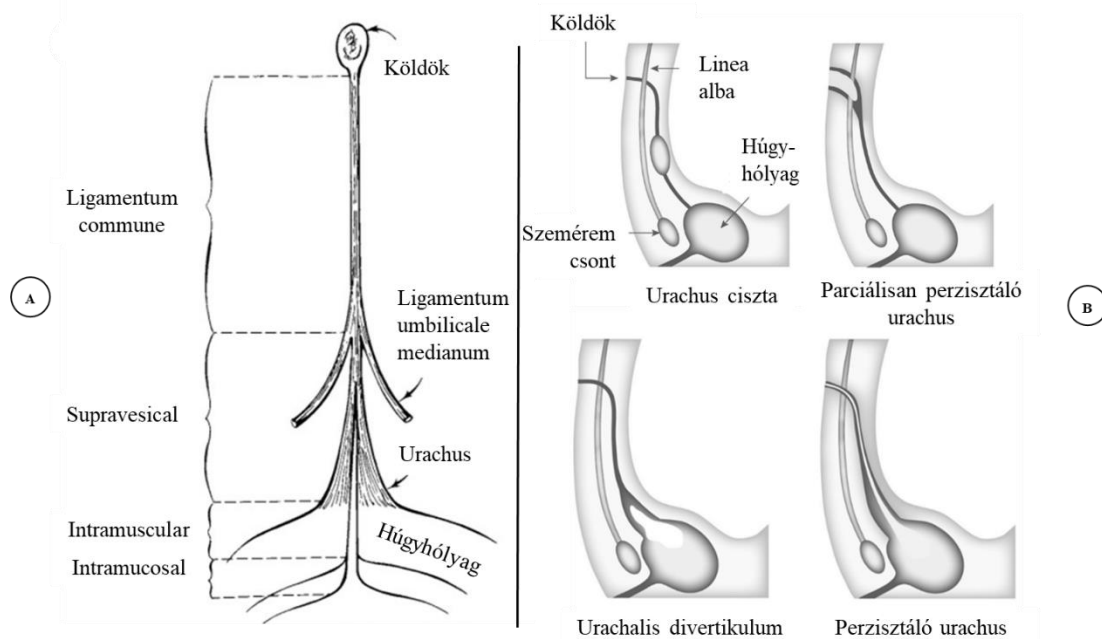
## 1. Bevezetés

### 1.1 Urachus carcinoma

#### 1.1.1 Kialakulása, patológiája, epidemiológiája

Az urachus, vagy ligamentum umbilicale medianum (középső umbilicalis szalag) a sinus urogenitalis fejlődési maradványa, mely a magzati élet során képződött struktúra. A sinus urogenitalis a köldököt köti össze a húgyhólyag kupolájával és a magzati élet során a nitrogén tartalmú vegyületek kiválasztásában játszik fontos szerepet. Az urachus három egymástól elkülönülő szövettani rétegből épül fel: egy ephitelialis csatorna, mely a húgyhólyagra is jellemző urotheliummal bélelt, egy submucosalis kötőszöveti réteg és egy simaizom réteg. Anatómiailag intramucosalis, intramuscularis és supravesicalis szegmensre különíthetjük el (1A. ábra) (1, 2).

A magzat fejlődésének korai szakaszában a sinus urogenitalis fokozatos kötőszövetesedéssel degradálódik, létrehozva a ligamentum umbilicale medianumot. Ez a visszafejlődés azonban a felnőttek körülbelül egyharmadában tökéletlenül megy végbe, mely esetekben urachus-maradvány marad fenn (1).



1. ábra - A.) Az urachus anatómiája (3) és B.) az urachus rendellenességeinek megjelenési formái (4).



Az urachus maradványnak több típusa is ismert (1B. ábra). Leggyakoribb formája az urachus ciszta, ekkor egy folyadéktartalmú kiöblösödés figyelhető meg, amelynek azonban végei zártak mind a köldök, mind pedig a húgyhólyag irányába. A parciálisan perzisztáló urachus és urachalis divertikulum esetében a maradvány, vagy csak a köldök felől, vagy csak a húgyhólyag felől marad nyitott, míg a perzisztáló urachus esetében teljes hosszúságában megmarad az urachus lumenes struktúrája (4).

A tökéletlen degradáció következtében fennmaradó urachus maradványban rosszindulatú elváltozások is kialakulhatnak. A maradvány bármely szövettani rétegéből kiinduló malignus elváltozást urachus carcinomának (UrC) nevezünk.

Az UrC-ák szövettani megjelenésüket tekintve az esetek túlnyomó többségében (~90%) adenocarcinómák (ADC), melyek igen változatos altípusok formájában jelenhetnek meg. Leggyakrabban mucinosus, vagy kolloidális altípust figyelhetünk meg (57%), majd az enterális, vagy intesztinális (15%) altípus következik, melynek morfológiai megjelenése meglehetősen hasonlít a colorectalis adenocarcinómák (CRC) megjelenésére. Ezt követi a nem specifikus (not otherwise specified – NOS) altípus (14%), a kevert altípus (8%), végezetül pedig a pecsétgyűrű sejtis szövettani altípus (6%) (5). Emellett az UrC az esetek kevesebb, mint 10%-ában egyéb nonglandularis szövettani típus formájában jelenik meg, melyek közül a leggyakoribb az urothelialis (47%) típusú, majd a szarkómák (27%), a laphám (21%) típusú daganatok, végül legritkábban a neuroendokrin (5%) típusúak fordulnak elő (1, 5).

Az UrC-ADC kialakulására vonatkozóan két elmélet is létezik. Az egyik elmélet a gasztrointesztinális traktus ADC-ra való hasonlóságán alapul, mely szerint az UrC-ADC olyan glandularis sejtekből alakul ki, melyek a bélcsatornába történő migrációja az embriogenezis során elmaradt. Egy másik, alternatív hipotézis szerint pedig metaplasztikus átalakulás útján jönnek létre (6).

Az UrC-ák a húgyhólyagot érintő daganatok kevesebb, mint 1%-át (~0,35-0,70%) teszik ki, a betegség incidenciája 1:5 000 000. A publikált esetek alapján elmondható, hogy gyakrabban alakul ki férfiakban, mint nőkben, az előfordulási arány 1.4-1.6:1 és a páciensek jellemzően az 50-es éveikben járnak a diagnózis pillanatában. Az UrC esetében jelenleg nem ismert, hogy genetikai hajlam, családi halmozódás vagy környezeti faktorok szerepet játszanának a betegség patogenezisében (7, 8).

### 1.1.2 Tünetei és diagnosztikája

Rejtett anatómiai elhelyezkedéséből adódóan az UrC hosszabb ideig tünetmentes maradhat. A páciensek jellemzően akkor fordulnak orvoshoz, amikor a tumor már előrehaladott állapotban van, így az gyakran későn kerül felfedezésre. Mivel az urachus a húgyhólyaggal közvetlen kapcsolatban van, az első tüneteket éppen az UrC húgyhólyagra történő terjedése okozza (9). A daganat kialakulását követően először a Retzius-térbe terjed, növekedése nyomán a hasfalon keresztül ritkábban akár tapinthatóvá is válhat. Tovább terjedve eléri a húgyhólyagot, melynek falát áttörve okozza a leggyakoribban észlelt tünetet, a haematuriat (1, 9). Ritkábban előfordulhatnak olyan tünetek is, mint például a köldök körüli fájdalom, a köldökön keresztüli váladékozás (mely lehet vizelet, vér vagy nyák) vagy köldököt érintő antibiotikum rezisztens fertőzés. Leggyakoribb tünete a már említett makroszkópikus vagy mikroszkópikus haematuria (73%) mellett az alhasi fájdalom (14%), a vizelési nehézség, vagy dysuria (13%) és a mucosuria (10%) (10, 11). Mindezek mellett az általánosabb tünetek is megjelenhetnek, úgy, mint a hirtelen fogyás, láz, hányinger és hányás.

Amennyiben egy betegnél felmerül az UrC gyanúja, a kórelőzmény áttekintésén és a fizikai vizsgálat elvégzésén túl a legfontosabb eszköz a diagnózis felállításához a húgyhólyagtükrözés. A cisztoszkópia 89%-ban pozitív az UrC betegek esetében. Diagnosztikus jelentőségén túl a cisztoszkópia segítségével meghatározható a tumor lokalizációja, mely jellemzően a hólyagkupola. Amennyiben a cisztoszkópia során gyanús terület látszik, biopsziás mintavétel és szövettani vizsgálat szükséges (11).

A diagnózis felállításához nélkülözhetetlen a képalkotó eljárások alkalmazása is, úgy, mint az ultrahang (UH), a computer tomográfia (CT) vagy a mágneses rezonancia (MR). A mucinózus UrC-k gyakran tartalmaznak kalcifikációt, mely a fenti vizsgálatok segítségével könnyen detektálható. A CT és MR vizsgálatokkal képet kaphatunk a tumor helyi kiterjedtségéről, a nyirokcsomók érintettségéről és az esetleges távoli metasztázisok meglétéről. Pozitron emissziós tomográfiás (PET) CT eljárással akár már műtét előtt is pontos információt kaphatunk a tumor stádiumáról (9, 12). Néhány UrC-s beteg esetében beszámoltak emelkedett szérum tumormarker szintekről, úgy, mint a carcinoembrionális antigén - CEA (59%), cancer antigén 19-9 - CA19-9 (60%) és cancer antigén 125 - CA125 (44%). Mindamelllett, hogy UrC esetén csak limitált adatok állnak rendelkezésre ezen markerek szerepéről, a nyomon követésük minden bizonnyal hasznos lehet a diagnózis

felállításán kívül a kezelés hatékonyságának megállapítása és a tumor esetleges kiújulásának korai felismerése szempontjából is (13, 14).

Az UrC diagnosztizálása bonyolult feladat, hiszen amellett, hogy egy ritka kórképről van szó, elkülönítése más szervekről kiinduló ADC-tól klinikopatológiai kihívást jelent a kezelőorvosok számára. Az UrC diagnózisának felállítására több kritériumrendszer is kialakításra került, azonban egyelőre nem született konszenzus, hogy melyik rendszer erre a legalkalmasabb. Az egyes diagnosztikus rendszerek kritériumait az 1. táblázat foglalja össze.

**1. táblázat - Az ADC-UrC és nem ADC-UrC diagnosztikus kritériumrendszerei (3, 13, 15, 16, 17).**

	ADC-UrC				nem ADC-UrC
	<i>Sheldon és mtsai (3)</i>	<i>Herr és mtsai (15)</i>	<i>Gopalan és mtsai (16)</i>	<i>MD Anderson Cancer Center (13)</i>	<i>Paner és mtsai (17)</i>
Tumor lokalizációja	Húgyhólyag kupolájában	Az ADC a húgyhólyag kupolájában	A húgyhólyag kupolájában vagy elülső falán	A húgyhólyag kupolájában vagy a középvonalon	A húgyhólyag kupolájában, az elülső falában vagy a köldökhöz képest középvonalban
Tumor kiindulási helye / kiterjedtsége	A húgyhólyag izomszövetébe vagy mélyebb szöveteibe is betör A húgyhólyag felszíni epitheliumától élesen elhatárolódik, ott sem mirigyes, sem poliploid sejtburjánzás nem látható A húgyhólyag elülső falára, a Retzius-térbe vagy a köldökre terjed	-	A húgyhólyag falából	A húgyhólyag felszíni epitheliumától élesen elhatárolódik	Nem a húgyhólyag felszínéből
Tumor anatómiai kapcsolata az UrC maradvánnyal / szövettana	Az urachus maradvány fellelhető és összefügg a kóros szövetrel	-	-	Szövettana ADC-t igazol	Szoros kapcsolat az urachus maradvány struktúrájával Amennyiben az urachus maradvány szerkezete nem azonosítható, a tumor nem tör be az intakt húgyhólyag felszínébe Amennyiben az urachus maradvány szerkezete nem azonosítható, és a tumor beszövi a húgyhólyag felszínét: 1. csak urothelialis tumor esetén, üreges vagy cisztás tumor intraluminalis papilláris szerkezettel, vagy 2. minden nonglandularis UrC esetén, amennyiben fordított invazív front
Cystitis cysta / glandularis jelenléte	Cystitis glandularis és cystitis cysta jelenléte kizárható	-	Nagy kiterjedésű cystitis cysta/cystitis glandularis nem látható a húgyhólyag kupoláján vagy elülső falán kívül	Cystitis cysta/cystitis glandularis átmenete a tumorba nem igazolható	-
Urothelialis dysplasia	-	-	-	Urothelialis dysplasia nem igazolható	-
Egyéb primer tumor jelenléte	Egyéb primer tumor jelenléte kizárt	-	Egyéb primer tumor jelenléte kizárt	Egyéb primer ADC jelenléte kizárt	Nincs egyéb primer tumor vagy hasonló morfológia máshol, kivéve az urogenitális traktus urothelialis carcinomáját

Mivel az UrC kívülről terjed a húgyhólyagra, így a húgyhólyagdaganatok stádiumbeosztásában alkalmazott TNM (Tumor Node Metastasis- tumor-nyirokcsomó-metasztázis) kritérium rendszer ez esetben nem alkalmazható (6). Elsőként 1984-ben Sheldon és munkatársai fogalmaztak meg külön stádiumbeosztást az UrC-ra (2. táblázat). Ezt alkalmazva azonban a módszer azon hátrányát tapasztalhatjuk, hogy a különböző stádiumok közötti betegeloszlás meglehetősen egyenetlen, mivel a diagnózis felállításakor a legtöbb beteg a III. stádiumba kerül ( $91\% \geq \text{III A}$ ) (3, 11). Egy másik, a Mayo-féle stádiumbeosztás (2. táblázat) már egyenletesebb betegeloszlást tesz lehetővé a különböző stádiumok között (11, 18). Napjainkban mindkét stádiumbeosztás elterjedt és prognosztikus értékű.

**2. táblázat** - A Sheldon és Mayo kritériumrendszerek az UrC stádiumának meghatározásához (3, 18).

Sheldon kritériumrendszer (3)	
Stádium	Kritérium
I	A tumor urachalis mucosára korlátozódik
II	A tumor magára az urachusra korlátozódik, de a submucosa rétegeit beszűri
III A	A tumor kiterjed a húgyhólyagra
III B	A tumor kiterjed a hasfalra
III C	A tumor kiterjed a peritoneumra
III D	A tumor a húgyhólyagon kívül más parenchymás szervet is érint
IV A	Metasztázis a nyirokcsomókban
IV B	Metasztázis a távoli szervekben
Mayo kritériumrendszer (18)	
Stádium	Kritérium
I	A tumor az urachusra/húgyhólyagra korlátozódik
II	A tumor áttöri a húgyhólyag izomrétegét és kívülről a lumenbe nő
III	A tumor regionális nyirokcsomókat is érint
IV	A tumor a nem regionális nyirokcsomókban és/vagy távoli szervekben is megjelenik

### 1.1.3 Kezelési lehetőségek

Ritka előfordulásuk nyomán e tumorokkal kapcsolatos ismereteink hiányosak, így kezelésüket illetően sincsenek általánosan elfogadott irányelvek. A kezelés szempontjából alapvető jelentősége van, hogy lokális vagy pedig áttétes stádiumban kerül felfedezésre a betegség

### 1.1.3.1 Lokális UrC kezelése

Helyi kiterjedésű UrC esetén az elsődlegesen választandó terápia a kuratív céllal elvégzett műtéti eljárás, mely során eltávolítják a teljes urachus maradványt a köldökkel együtt, a húgyhólyag érintett részét (parciális cisztektómia), valamint a kétoldali kismedencei nyirokcsomókat. Esetenként előfordulhat, hogy parciális cisztektómia helyett a teljes húgyhólyag eltávolítása (radikális cisztektómia) szükséges. Ez akkor indikált, ha a tumor teljes kimetszése biztonsággal nem kivitelezhető, vagy ha nem marad elég szövet egy megfelelően funkcionáló vizelettároló kialakítására. A betegség onkológiai kimenetele (progresszió, túlélés) szempontjából nincs különbség a parciális és radikális cisztektómia eredményessége között, ám a parciális cisztektómia jobb életminőséget biztosít a betegek számára, így elsődlegesen ez az eljárás választandó (9). Mivel a pozitív sebészi szél az egyik legerősebb kockázati tényező az UrC kiújulására nézve, az urachus maradvány és a köldök en block reszekciója elengedhetetlen a hosszabb túlélés érdekében (11). A regionális nyirokcsomók érintettsége a távoli metasztázisok meglétéhez hasonló erősségű rizikófaktor, így a műtét során a kismedencei nyirokcsomók eltávolítása szintén ajánlott (19, 13).

Eddig csupán néhány közlemény számolt be olyan nagyobb esetszámú vizsgálatokról, melyek lehetővé teszik a prognosztikus tényezőkre vonatkozó következtetések levonását. A bizonyítottan kedvezőtlen prognózist befolyásoló független tényezők: Sheldon tumor stádium  $\geq$  IIIB, Mayo stádium  $\geq$  II, pozitív nyirokcsomók vagy távoli metasztázisok megléte és a pozitív sebészi szél (18-22).

Az 5 éves túlélés lokalizált betegség esetén is csupán 50% körüli (11).

### 1.1.3.2 Előrehaladott UrC kezelése

Az UrC-t általában előrehaladott állapotban fedezik fel; a betegek viszonylag nagy aránya (>20%) rendelkezik távoli metasztázisokkal a diagnózis pillanatában, valamint a műtét utáni kiújulás és a metasztatikus progresszió is igen gyakori. Hatásos sugárterápia hiányában az elsődlegesen választandó kezelés előrehaladott UrC esetében a kemoterápia. Az 5 éves túlélési arány metasztatikus UrC esetében kevesebb, mint 20%, mely jól mutatja, hogy ezen betegek kezelésének hatékonysága további javításra szorul (18, 19). Az áttétek leggyakrabban a csontokban (22%), tüdőben (22%), májban (16%),

nyirokcsomókban (11%) és a hashártyán (11%) jelennek meg. Gyakran előfordul, hogy egy időben akár több szerven is áttét képződik (15).

Alacsony incidenciája miatt nem állnak rendelkezésünkre nagy esetszámot felölelő tanulmányok, így az UrC betegek kemoterápiás kezelésére vonatkozóan sem fogalmazódtak meg általánosan elfogadott irányelvek, így a terápiás döntések a kezelőorvos egyéni döntésein alapulnak és igen nagy változatosságot mutatnak.

#### **1.1.3.2.1 Kemoterápiás kezelési lehetőségek**

A húgyhólyag érintettsége miatt sokan az urothel sejtes daganatoknál elsődlegesen alkalmazott ciszplatin-alapú terápiákat részesítik előnyben, míg mások a CRC-hoz való klinikai és szövettani hasonlóságából kiindulva az ezen daganatok esetében alkalmazott 5-fluorouracil (5-FU) alapú kezeléseket alkalmazzák (9). A leghatékonyabb szisztémás kezelés azonosítása érdekében 2016-ban elvégzett meta-analízis szerint az 5-FU-platina kombinált kezelés hasonlóképpen magas arányban vált ki terápiás választ, mint az 5-FU monoterápia (43% és 44%), ám a progrediáló esetek aránya a kombinált kezelésnél jóval alacsonyabbnak bizonyult az 5-FU monoterápiához képest (14% és 31%). A legkedvezőtlenebb eredményt az 5-FU nélkül alkalmazott platina-alapú kezelések adták (11). Ezek alapján az 5-FU-platina kombinációja tűnik a leghatékonyabb gyógyszeres kezelésnek, ezt követi az 5-FU monoterápia, míg a platina alapú kezelések bizonyultak a legkevésbé hatékonyak.

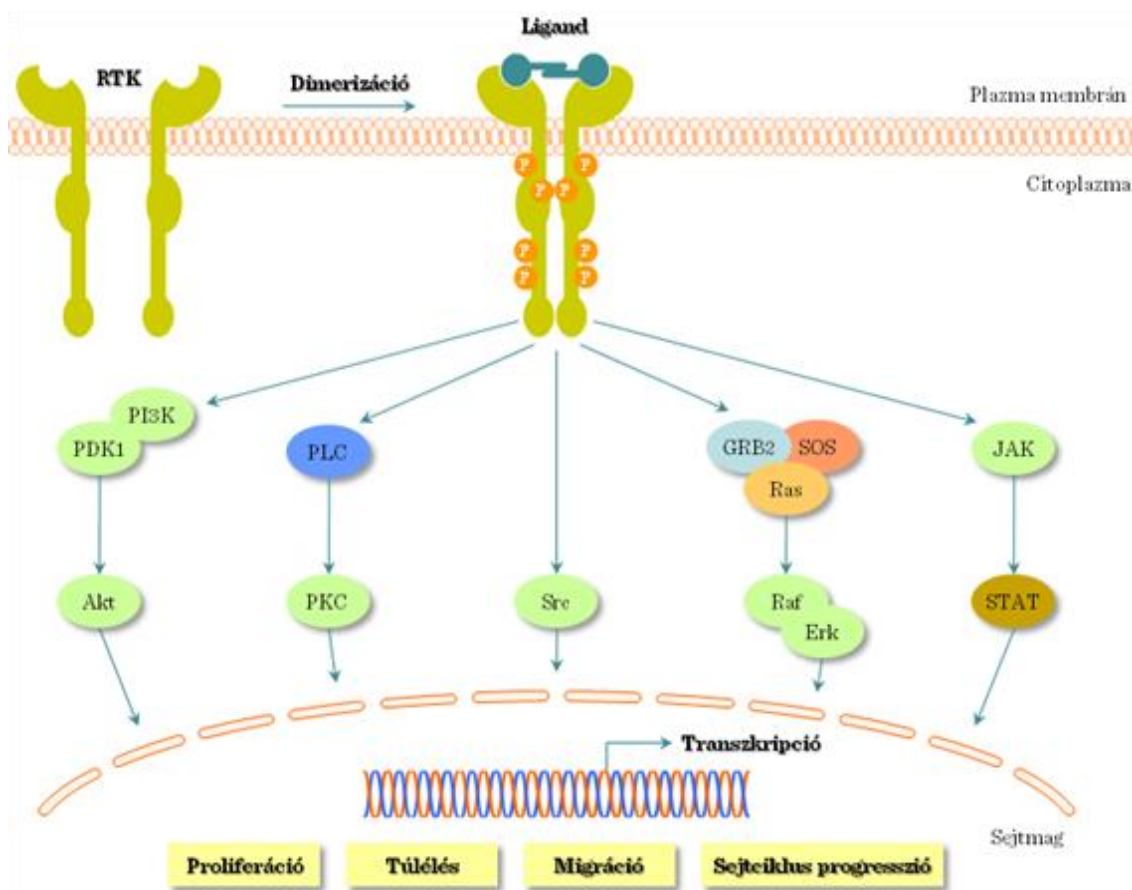
Ezek mellett a hashártyát is érintő tumorterjedés kockázata indikálhatja egy alternatív kezelést, az ún. HIPEC (hyperthermic intraperitoneal chemotherapy) terápia alkalmazását, mellyel kapcsolatban biztató eredményeket publikáltak UrC kapcsán. A 2017-ben megjelent retrospektív tanulmányba 36 UrC-s beteget vonata be, melyben vizsgálták a posztoperatív komplikációkat, a hosszú távon elért eredményeket és a fő prognosztikus faktorokat egyaránt. A kutatók arról számoltak be, hogy a citoreduktív sebészet és HIPEC terápia alkalmazása növelheti a hosszú távú túlélését azon UrC betegek esetében, akiknél a diagnózis felállításakor már hashártya metasztázist is leírtak (23).

#### **1.2.3.2.2 Célzott terápiás kezelési lehetőségek**

A legmegfelelőbbnek tűnő adjuváns kemoterápiás kezelés alkalmazása ellenére is az előrehaladott stádiumú UrC-ban szenvedő betegek prognózisa továbbra is kedvezőtlen.

Ritka tumorok esetében a különböző szerek hatásosságát vizsgáló, nagy esetszámú, prospektív klinikai vizsgálatok nem állnak rendelkezésre, így a célzott terápiás szerek alkalmazása ígéretes alternatívát jelenthet az előrehaladott UrC-ban szenvedő betegek számára. Az irodalomban csupán néhány publikáció lelhető fel, melyben UrC-s betegek célzott terápiás kezelését írják le.

A CRC-hoz való klinikai, hisztológiai és molekuláris hasonlósága alapján felmerül, hogy a CRC-ban használt célzott terápiás készítmények hatékonyak lehetnek UrC-ban is. Ezen megfontolás alapján potenciális célpont lehet az epidermális növekedési faktor receptor (EGFR) (2. ábra).



**2. ábra** – Az EGFR receptor tirozin-kináz által indukált jelátviteli útvonalak és azok sejtműködésre gyakorolt hatásai (24) (<https://adoc.pub/jelatvitel-orvosi-biotechnologia.html>).

Az EGFR jelátviteli útvonal aktiválódása a ligand (növekedési faktor) a receptor extracelluláris részéhez való bekötődésével indul, melynek hatására a receptor



dimerizálódik, majd az intracelluláris doménjének tirozin-kináz aktivitása révén foszforilálódik és elindítja a jelátviteli kaszkádot (2. ábra). Az EGFR kóros aktivációja több mechanizmuson keresztül is megtörténhet: a.) overexpresszió, b.) autokrin hurok aktiválódása által, c.) mutációkon keresztül. Az EGFR útvonal kulcsfontosságú szerepet játszik számos rosszindulatú daganat növekedésének elősegítésében. Ezen tulajdonsága annak köszönhető, hogy képes fokozni a tumorsejtek proliferációját és csökkenti azok apoptózisát, valamint elősegíti a tumorinváziót és angiogenezist. Aktivált EGFR jelút mellett a tumor rezisztenssé válhat a sugár-, és kemoterápiára (24).

Az anti-EGFR terápia alkalmazása során egy, a receptorhoz specifikusan kötődő antitestet alkalmaznak, mely a jelátviteli útvonal blokkolása révén fejt ki hatását. Fontos azonban figyelembe venni, hogy az EGFR útvonalon számos egyéb gén is aktiváló mutációt szenvedhet (pl. *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *PIK3CA*), mely esetben az EGFR-inhibitor már nem képes a szignálutat gátolni, hiszen az a ligand bekötődése nélkül, receptorfüggetlenül is aktiválódik. Tehát míg az *EGFR* gén aktiváló mutációi és amplifikációja indikálják az anti-EGFR terápiát, úgy az útvonal alsóbb szintjein álló gének aktiváló mutációja kontraindikálja azt (25).

A legkorábbi publikált tanulmány 2005-ben jelent meg, melyben egy fázis 1-es klinikai vizsgálat során 7 különböző szolid daganattípus esetében vizsgálták az anti-EGFR terápia (gefitinib) hatásosságát, összesen 28 betegben. A betegek közül 1 szenvedett UrC-ban és éppen ez a beteg mutatta a legerősebb terápiás választ a kezelésre; a tumor mérete 55%-kal zsugorodott és ezzel párhuzamosan a Ki67 proliferációs index is szignifikáns mértékben csökkent (26).

Collazo-Lorduy és munkatársai 2016-ban publikáltak egy esettanulmányt, melyben 1 metasztatikus UrC-ban szenvedő fiatal férfi esetét írták le. Sikertelen többvonalbeli kemoterápiás kezelést követően a beteg primer tumor szövetmintájából célzott exom szekvenálást végeztek, mely *EGFR* amplifikációt és vad-típusú *KRAS*-t írt le, így a kezelőorvosok anti-EGFR terápia (cetuximab) megkezdése mellett döntöttek. A beteg a kezelést jól tolerálta és egy 8 hónapon át tartó parciális regresszióval reagált a kezelésre (27).

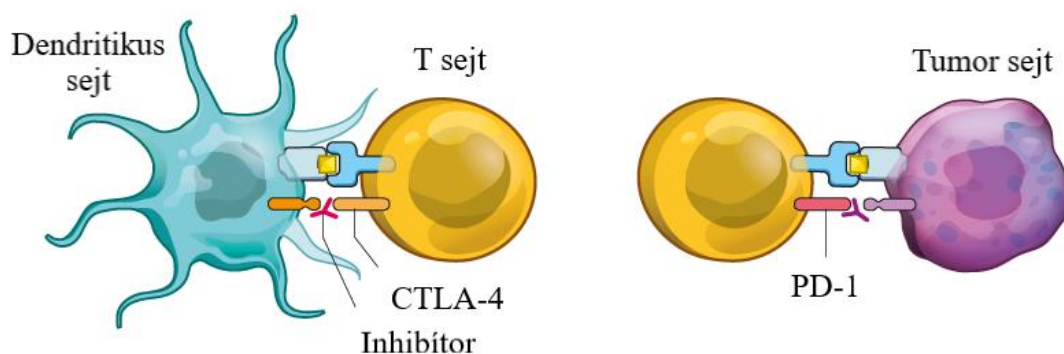
Néhány további publikáció egyéb tirozin-kináz receptor (RTK)-gátló kezelések alkalmazásáról számol be UrC betegek esetében (3. táblázat).

**3. táblázat** – Tirozin-kináz gátló kezelések alkalmazása UrC betegek esetében (28-31). Rövidítések: RTK: tirozin-kináz receptor, MEK: mitogén-aktivált protein kináz kináz, MET: mezenchimális-epithéliális tranzicionális faktor, VEGFR: vaszkuláris endothél növekedési faktor receptor.

Referencia	Kor	Nem	Terápia	Célpont	Eltérés	Állapot	Hatásosság	Időtartam	Túlélés
Loh és mtsai (28)	42	Nő	Trametinib	MEK	<i>GNAS</i> mutáció	metaszt.	ismeretlen, a kezelést leállították	1 hónap	-
	60	Nő	Sorafenib	multi RTK	<i>FLT3</i> amplifikáció	metaszt.	ismeretlen, a kezelést leállították	4 hét	
			Trametinib	MEK	<i>MAP2K1</i> mutáció	metaszt.	stabil állapot	10 hónap	
			Sunitinib	multi RTK	<i>MAP2K1</i> mutáció	metaszt.	vegyes eredmények	2 hónap	
Testa és mtsai (29)	33	Nő	Sunitinib	multi RTK	-	metaszt.	stabil állapot, csökkent fájdalom	5 hónap	5 hónap
Shitara és mtsai (30)	-	Férfi	Tepotinib	MET	MET státusz nem értékelhető	metaszt.	stabil állapot	>12 hét	12,9 hónap progresszió mentes túlélés
Jia és mtsai (31)	-	-	Bevacizumab (+ kemoterápia)	VEGFR	vad típusú <i>BRAF, ALK, EGFR, NRAS, MET</i>	metaszt.	stabil állapot	-	-
	-	-	Afatinib (+ TS-1)	VEGFR	PD-1 (-) + PD-L1 (-)	metaszt.	stabil állapot	-	-
	-	-	Bevacizumab (+ kemoterápia)	VEGFR	vad típusú <i>BRAF, ALK, EGFR, NRAS, MET</i>	metaszt.	progreál	-	15 hónap a műtétet követően (10 hónappal a metasztázis felfedezését követően)

Jól ismert, hogy a tumorsejtek a felszínükön különböző antigéneket expresszálnak, amelyek tumorellenes immunreakciót váltanak ki. A daganat az emberi szervezetben immunszuppresszív mikrokörnyezetet indukál, amely korlátozza a megfelelő immunválaszt ezen antigének ellen. Évek óta próbálnak olyan immunterápiás eljárást kifejleszteni, mely képes egy potenciális tumorellenes immunválaszt indukálni, mely ideális esetben végül a daganat elpusztításához vezet. Az egyik ilyen ígéretes terápia az immunrendszer ellenőrző-pontjainak blokkolása révén képes elérni a tumorsejtek immunrendszer általi eliminációját. Immunellenőrzési pontoknak tekintjük azon kostimulátor molekulákat, melyek negatívan szabályozzák az immunrendszert (32).

Az immunellenőrző-pontok közül a két legfontosabb a CTLA-4 (citotoxikus T-limfocita antigén-4) és a PD-1 (programozott sejthalál fehérje-1) útvonalak (3. ábra). Összehasonlítva a kettőt mindkét folyamat a T-sejtek aktivációját, proliferációját és citokintermelését gátolja, ám míg a CTLA-4 az immunválasz kezdeti „priming” fázisában a nyirokcsomókban hatnak, addig a PD-1 az immunválasz későbbi „effektor” fázisában a perifériás szövetekben, a tumor mikro környezetében gátolja a T-sejteket (33).



### 3. ábra - Immunellenőrzőpont útvonalak

(forrás: <https://www.punnettssquare.com/2018/11/cancer-immunologists-scoop-medicine.html?m=0>).

Az immunellenőrzőpont gátló (IEG) kezelések forradalmasították a terápiás lehetőségeket jónéhány daganat, így a húgyhólyagdaganatok esetében is. UrC betegek IEG szerekkel történő kezelésével kapcsolatban eddig csupán néhány esetleírás áll rendelkezésünkre.

Kardos és munkacsoportja 2017-ben publikálták tanulmányukat, melyben 1 metasztatikus UrC beteget PD-L1 gátló atezolizumabbal kezeltek. A beteg *MSH6* génjében inaktiváló mutációt detektáltak. A kezelés megkezdését követően elsőként progressziót figyeltek meg, majd stabilizálódott a beteg állapota, mely felvetheti egyes UrC betegek esetében az IEG kezelések alkalmazhatóságát (34).

Egy másik cikkben egy fázis 2-es klinikai kísérlet eredményeit taglalják, melyben ritka urogenitális daganatos betegeket kezeltek nivolumab és ipilimumab kombinációjával. A vizsgálatba 4 UrC beteget vontak be, melyből 1 beteg jól reagált a kezelésre (teljes/részleges választ adott), 2 betegnek stabilizálódott az állapota, míg 1 beteg progrediált (35).

Jia és munkacsoportja 2020-ban publikálta 2 UrC-s betegük esetét, akik PD-1 inhibitor, nivolumab kezelést kaptak. A betegek mintáit szekvenálással és IHC (immunhisztokémia) eljárással vizsgálva azt találták, hogy a tumorokra mikroszatellita instabilitás (MSI) volt jellemző, valamint *MSH6* génvesztés és a PD-L1 expressziót is sikerült kimutatni. Mindkét beteg stabil állapotba került a kezelés hatására (31).

Egy 2021-ben megjelent tanulmányban 24 metasztatikus UrC beteget vizsgáltak, akik közül 5 beteg kapott valamilyen immunterápiás kezelést. Az ötből két beteg már elsővonalban IEG (tislelizumab) kezelésben részesült az egyik monoterápiában, míg a másik kemoterápiával kombinálva. A kizárólag tislelizumab terápiával kezelt beteg progrediált, így másodvonalban kemoterápia (capecitabine, paclitaxel) és IEG terápia (tislelizumab) kombinációját kapta. Esetében a progressziómentes túlélés 5,2 hónap volt (36).

#### 1.1.4 Az UrC molekuláris háttere

Az UrC genetikai hátterét tekintve a mai napig csekély információ áll rendelkezésünkre, valamint a publikált adatok is csupán kis esetszámot felelő tanulmányokból származnak, mely eredmények szinte kizárólag az ADC-ra vonatkoznak, míg a nem ADC típusú UrC-val kapcsolatos ismereteink a mai napig igen hiányosak.

Az UrC genetikai hátterét vizsgálva a legtöbb publikált tanulmány a MAPK/PIK3 szignálútvezetékben szerepet játszó gének érintettségéről számol be. Bár az *EGFR* mutációját nem detektálták egyik tanulmányban sem, illetve az amplifikációja is igen ritka eseménynek számít (4% 8/184) (27, 37-41, 43, 45-48), addig a szignálút alsóbb részein álló gének közül több esetben is leírtak mutációt. A *KRAS* gén érintettsége az összes megjelent publikációt számításba véve 30%-os (69/230). Emellett, az *NFI* 12%-ban (6/49), a *GNAS* 10%-ban (12/115), az *NRAS* 2%-ban (4/171), a *BRAF* 3%-ban (5/190) és a *PIK3CA* 5%-ban (8/159) hordozott mutációt a vizsgált esetekben. A *KRAS*, *NRAS*, *GNAS* és *NFI* szerepet játszanak az anti-EGFR terápia elleni rezisztenciában, így vizsgálatukat érdemes megfontolni a terápia megkezdése előtt (27, 28, 34, 37-49).

A Wnt/TGF $\beta$  szignálútvezeték érintettségét szintén vizsgálták UrC-ban, főképp az *APC* és *SMAD4* gének mutációját írták le. Összesítve az *APC* érintettsége 9% (15/132), míg a *SMAD4* gén az esetek 14%-ban (13/91) mutálódik (27, 34, 38, 39, 43, 45-49).

A mismatch repair (MMR) útvonal létfontosságú szerepet tölt be a DNS replikáció és genetikai rekombináció során bekövetkező hibás bázisbeépülés felismerésében és javításában. A MMR rendszer biztosítja a genomi integritást és stabilitást, megakadályozza a DNS mikroszatellita régióiba történő abnormális inzerciót vagy delécióit. A MMR rendszer fehéjének hibás működése, és az ebből következő MSI a mutációk fokozott felhalmozódásához, és az ún. neoantigének létrejöttéhez vezet, melyeknek egy részét az immunrendszer idegenként felismer, ezáltal tumorellenes immunválaszt indukál a szervezetben (50). A daganatok mikroszatellita-régióik érintettsége alapján három csoportba sorolhatók: az MSI-high (MSI-H) fenotípus esetén a mikroszatellita-régiók legalább 30%-a instabilitást mutat, míg az MSI-low (MSI-L) esetében ez az arány 30%-nál kevesebb. Mikroszatellita stabilnak (MSS) tekintjük azokat a tumorokat melyek nem hordoznak MSI-t (51).

A MMR rendszer érintettségének előfordulásáról UrC-ban született néhány tanulmány az elmúlt évek során. Sirintrapun és kutatócsoportja 7 UrC mintán végzett IHC vizsgálatot az esetleges MSI kimutatására, és mintáik 43%-ban (3/7) találtak MSI-t (42). Egy 2017-ben megjelent cikkben a vizsgált minták 25%-ban (3/12) detektáltak inaktiváló mutációkat a MMR génekben (34). Egy, a tavalyi évben megjelent újabb tanulmányban 17 UrC mintát vizsgáltak, melynek eredményeként 82%-ban (14/17) MSI-t detektáltak, melyeknek 35%-a (6/17) MSI-H volt és 47%-a (8/17) MSI-L, míg csupán a minták 18%-a (3/17) bizonyult MSS-nak (39).

Az itt bemutatott adatok ellenére az UrC molekuláris háttere továbbra is kevésbé ismert. A célzott terápiák megválasztásához az UrC-ban gyakori mutációk átfogóbb vizsgálata továbbra is szükséges.

## **1.2 Primer hólyag adenocarcinoma**

### **1.2.1 Epidemiológiája és patológiája**

A húgyhólyag daganatos megbetegedése egy igen gyakori rosszindulatú elváltozás, melyből világszerte évente mintegy 550.000 új esetet regisztrálnak (52). A húgyhólyag daganatok szövettani szempontból a mi éghajlati viszonyaink között az esetek túlnyomó többségében urothelsejtes megjelenést mutatnak. Egyéb hisztológiai variánsai, mint például az adenocarcinómái jóval ritkábban, az esetek csupán mintegy 0,5% - 2%-ban fordulnak elő (53). A húgyhólyag ADC-ái lehetnek elsődleges (primer)

vagy másodlagos, egyéb primer szövetből a hólyagra szekunder módon ráterjedő ADC-k (54). A betegségben szenvedők általában a hatvanas, hetvenes éveikben járnak és többségében férfiak (55). Az esetek körülbelül harmadában a betegek már nyirokcsomó áttétekkel rendelkeznek az első diagnózis idején (56).

Bár a primer hólyag adenocarcinoma (PBAC) patogenezise még nem teljesen tisztázott, néhány kockázati tényezőt már sikeresen azonosítottak. Szembetűnő adat, hogy a húgyhólyagtumorok 90%-a ADC azon betegek körében, akik egy bizonyos húgyhólyag fejlődési rendellenességben – hólyag extrófiában szenvednek (57). Szintén magasabb az ADC-k előfordulási aránya (10%) schistosomiasis sújtotta endémiás területeken, bár az itt előforduló squamosus forma a domináns (58, 59). Ezekon kívül kockázati tényezőnek tekinthető a húgyhólyag krónikus irritációja, obstrukciója, és a hólyagsérv (60). Cystitis glandularis és intestinalis metaplasia gyakran található a PBAC mellett, de tanulmányok kimutatták, hogy a jelenlétük nem jár együtt az ADC fokozott kockázatával (61).

A PBAC egy igen ritka malignus elváltozás, mely valószínűleg a húgyhólyag urotheliumából ered, ám tisztán mirigyes/glandularis fenotípust mutat. A PBAC legtöbb esetben a hólyag trigónumából, vagy a hátsó faláról indul ki, de a húgyhólyagon belül bárhol kialakulhat (57). Az urotheliális carcinomától eltérően, amely általában multifokális megjelenésű, a PBAC leginkább egygócú soliter lézióként jelentkezik (62, 63).

Szövettanilag a PBAC különböző típusokba sorolható: a.) enterális vagy intesztinális típus, b.) mucinózus vagy koloidális, c.) pecsétgyűrűsejtes, d.) NOS és e.) kevert típus (55). Az enterális szövettani típus intesztinális-típusú mirigyeket tartalmaz többsejtmagsoros hengerhám sejtekkel és nukleáris atípiával, mely megtévesztően hasonlít a CRC képéhez. Előfordulhat, hogy intracelluláris vagy extracelluláris mucint termel, emellett gyakran figyelhető meg nekrozis ezen szövettani típusban. A mucinózus vagy koloidális szövettani típusban nagy mennyiségű extracelluláris nyák figyelhető meg, melyben a tumorsejtek mintegy lebegnek. A pecsétgyűrűsejtes szövettani csoport diffúzan beszivárgó, rosszul differenciálódott sejtekből áll, amelyekben intracelluláris nyák és független excentrikus sejtmag tűnik fel. Ezen tumorok jellemzően előrehaladott állapotban kerülnek diagnosztizálásra, és rosszabb prognózissal rendelkeznek, mint az egyéb variánsok. A NOS szövettani típusra nem specifikus, mirigyes növekedés jellemző.

Azon tumorok, amelyeknél több, mint egy mintázat figyelhető meg, kevert típusba sorolandók (64, 55).

### **1.2.2 Tünetei, diagnosztikája és prognózisa**

Primer hólyag adenocarcinomában szenvedő betegek esetén a vezető tünet a haematuria, de előfordul a húgyhólyag irritációja és mucosuria is (55).

A PBAC diagnózisának felállítása gyakran nehezített, hiszen differenciáldiagnosztikai markerek hiányában nehéz megmondani, hogy a daganat a húgyhólyagból indul ki vagy pedig kívülről szűri be azt. Ennek eldöntése pedig a kezelést alapvetően befolyásoló szempont (65, 66). A húgyhólyagot érintő leggyakoribb másodlagos ADC a CRC, mely szövettanilag gyakran nagyon hasonló a PBAC enterális típusához, így csupán szövettani képe alapján a két tumorféleséget megkülönböztetni nem lehet (54, 67). A diagnózis felállításához ezért a kórelőzmény ismerete és a beteg képalkotó eljárásokkal (CT, PET-CT), valamint kolonoszkópiával történő vizsgálata is fontos támpontot szolgáltathat.

A PBAC, UrC és CRC elkülönítése nagy tapasztalatot igénylő feladat, amihez nem állnak rendelkezésünkre differenciáldiagnosztikai markerek. Egy, ezzel a témával foglalkozó irodalomkutatáson alapuló tanulmány összesítette a potenciális immunhisztokémiai markerek listáját. Az UrC elkülönítését a PBAC-tól és a CRC-től segítheti az AMACR (alfa-metilacil-CoA racemáz) és CK34 $\beta$ E12 (nagy molekulásúlyú citokeratin) markerek vizsgálata. Míg az AMACR leginkább UrC-ban negatív, és mutat némi reaktivitást PBAC-ban és CRC-ban, addig a CK34 $\beta$ E12 leginkább UrC-ban mutat pozitivitást, a másik két daganatos megbetegedésre pedig kevésbé jellemző. A CK7 (citokeratin 7), magi  $\beta$ -catenin és CD15 (Leu-M1) IHC markerek vizsgálata a CRC-t segíthet elkülöníteni az UrC-tól és PBAC-tól, míg a CEA és GATA3 (GATA kötő fehérje 3) markerek vizsgálati eredményei a PBAC-t segíthetnek elkülöníteni a másik két entitástól (4. táblázat) (5).

A vizsgálat korlátai közül azonban ki kell emelni a módszertani heterogenitást (egyazon fehérjére más antitesteket használtak, a kiértékelés szubjektivitása mellett a szerzők gyakran a pozitívitas kritériumát sem adták meg). Ezen tényezők és a különböző IHC markerek részben átfedő pozitívítási szintjeit figyelembe véve nehéz egy csupán biomarkereken alapuló differenciáldiagnosztikai szabályrendszert felállítani, mégis ezen

értékes eredmények részben hozzájárulhatnak az UrC, a PBAC és a CRC elkülönítéséhez (5).

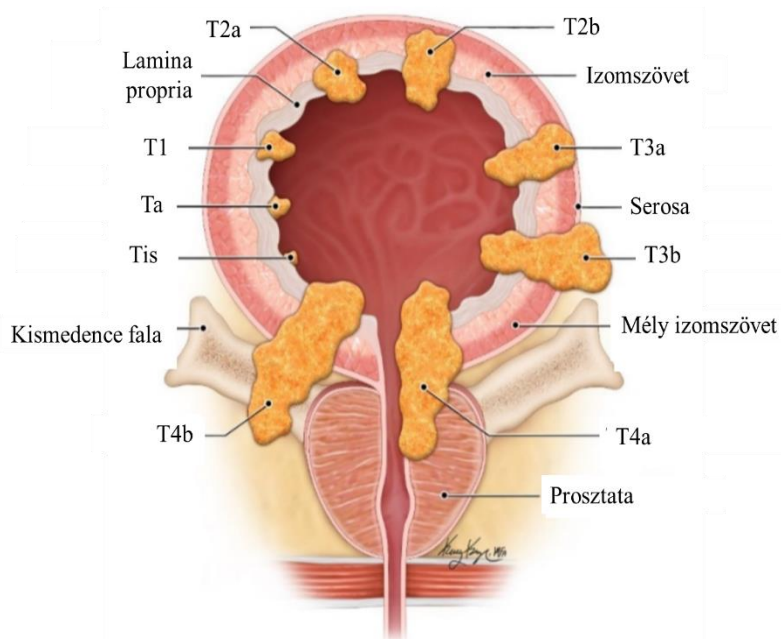
**4. táblázat** - Biomarkerek, melyek segíthetik a differenciál diagnózist az UrC, a PBAC és a CRC között. Negatív: 0% pozitív, leginkább negatív: 1-25% pozitív, néhány pozitív: 26-50% pozitív, leginkább pozitív: 51-75%, pozitív: 76-100% pozitív (5).

Biomarker (IHC)	Reaktivitás			Differenciál diagnózis		
	UrC	CRC	PBAC	UrC - CRC&PBAC	UrC&PBAC - CRC	UrC&CRC - PBAC
AMACR (p504s)	Leginkább negatív	Pozitív	Leginkább pozitív	+	-	-
CK34βE12 (HMWCK)	Leginkább pozitív	Leginkább negatív	Néhány pozitív	+	-	-
CK7	Leginkább pozitív	Néhány pozitív	Leginkább pozitív	-	+	-
β-Catenin (magi)	Leginkább negatív	Pozitív	Leginkább negatív	-	+	-
CD15 (Leu-M1)	Pozitív	Néhány pozitív	Leginkább pozitív	-	+	-
CEA	Pozitív	Pozitív	Leginkább pozitív	-	-	+
GATA3	Negatív	Negatív	Leginkább pozitív	-	-	+

A diagnózis fontos része a tumor stádiumának meghatározása, mely segíti a kezelőorvost a klinikai kimenetel előrejelzésében, valamint a megfelelő terápia kiválasztásában is. PBAC esetében a húgyhólyagdaganatok osztályozásánál már jól ismert TNM stádiumbeosztást alkalmaznak. A T a primer tumor kiterjedését jellemzi (4. ábra), míg az N a regionális nyirokcsomók, az M pedig a távoli metasztázisok jelenlétéről ad információt (5. táblázat).



**4. ábra - A húgyhólyag daganat T stádiumának ábrázolása (68).**



**5. táblázat - Daganatok TNM beosztása, és leírásuk (69).**

<b>T - primer tumor</b>	
Tx	Az elsődleges tumor nem értékelhető
T0	Az elődleges tumor nem nyilvánvaló
Ta	Nem invazív papilláris carcinoma
Tis	Carcinoma in situ
T1	A tumor betör a subepitheliális kötőszövetbe
T2	A tumor betör az izomszövetbe
T2a	A tumor a felületes izomrétegbe tör be, belső fél
T2b	A tumor a mély izomrétegbe tör be, külső fél
T3	A tumor a perivesicalis zsírszövetet is beszűri
T3a	Mikroszkóposan
T3b	Makroszkóposan (extravesicalis tömeg)
T4	A tumor a következőkből legalább egyiket beszűri: prostata, vagina, uterus, medencefal, hasfal
T4a	A tumor beszűri a prostatát, vaginát vagy uterust
T4b	A tumor beszűri a medencefalat vagy hasfalat
<b>N - regionális nyirokcsomó</b>	
Nx	Regionális nyirokcsomók értékelhetetlenek
N0	Nincs regionális nyirokcsomó áttét
N1	Egyetlen regionális nyirokcsomó áttét, a legnagyobb átmérője <2 cm
N2	Egyetlen regionális nyirokcsomó áttét, amely nagyobb, mint 2 cm, de nem nagyobb, mint 5 cm VAGY több nyirokcsomó érintett, amelyből egyik sem nagyobb, mint 5 cm
N3	Nyirokcsomó áttét, amely nagyobb, mint 5 cm
<b>M - metasztázis</b>	
Mx	Távoli áttét nem értékelhető
M0	Nincs távoli áttét
M1	Van kimutatható távoli áttét

Mivel a legtöbb esetben a diagnózis pillanatában a PBAC már előrehaladott állapotban van, a betegség rossz prognózisú (56), ám azonos stádiumban az urothelsejtes carcinoma és PBAC hasonló lefolyású (70). A PBAC esetében az 5 éves túlélés 30% - 50% között alakul (55, 56, 59). A prognózist elsősorban a stádium befolyásolja, a szövettani altípus prognosztikus értéke eddig nem igazolódott (55, 71).

### **1.2.3 Kezelési lehetőségek**

#### **1.2.3.1 A lokális PBAC kezelése**

A lokálisan kiterjedésű PBAC elsődleges kezelése a sebészi beavatkozás, mely magában foglalja a radikális cisztektómiát és a kismedencei nyirokcsomók eltávolítását (72). Emellett egy átfogó, retrospektív tanulmány szerint a posztoperatív radioterápia is kedvező hatású lehet. A vizsgálatba bevont 192 beteg 36%-nak posztoperatív radioterápiában volt része. A két csoportot összehasonlítva azt találták, hogy az 5 éves túlélési arány magasabb volt a sugárkezelésen átesett betegek körében annak ellenére, hogy az ebbe a csoportban tartozó betegek magasabb stádiumú daganatos betegségben szenvedtek, illetve a medencei nyirokcsomók érintettsége is gyakoribb volt. Továbbá, a radioterápiában részesített betegekben a lokális kiújulás aránya is jóval alacsonyabbnak bizonyult (3%) a csupán sebészileg kezelt betegekhez (32%) képest. Tehát az adjuváns posztoperatív radioterápia növelheti a betegségmentes túlélést azáltal, hogy csökkenti a helyi kiújulás arányát, ám a távoli áttétekkel rendelkező daganatos betegeknek további hatékony terápiára van szüksége (56).

#### **1.2.3.2 Az előrehaladott PBAC kezelése**

Az inoperábilis és a metasztatikus PBAC kezelésével kapcsolatban az UrC-hoz hasonlóan nincsenek egyértelmű irányelvek. Egyesek az urotheliális hólyagdaganatok kezelésére alkalmas kemoterápiás szereket alkalmazzák, míg mások a CRC-ban alkalmazottakat részesítik előnyben. Nagy esetszámú, átfogó klinikai kísérletek hiányában ezen betegség esetén is csupán az esettanulmányokra és a retrospektív kutatásokra támaszkodhatunk.

Néhány esettanulmány a FOLFOX4 (fluorouracil, leucovorin, oxaliplatin) / FOLFOX6 (folinsav, 5-fluorouracil, oxaliplatin) terápiák sikeres alkalmazásáról számol be PBAC betegek esetében (73-75). Egy kis esetszámú, prospektív tanulmány során 3 előrehaladott PBAC beteget 3 ciklus neoadjuváns gemcitabin ciszplatin (GC) plus S-1

kezelésben részesítettek, majd a háromból két beteg esetében elvégezték a radikális cisztektómiát. A neoadjuváns kezelés hatására egy beteg teljes, egy pedig részleges választ adott. Ezen eredmények azt sugallják, hogy az előrehaladott állapotban lévő betegek számára ez a kezelés hatékonyan csökkentheti a daganat méretét és mintegy eradikálhatja a potenciális mikrometasztázisokat (76).

A PBAC célzott terápiája kapcsán is nagyon limitált a rendelkezésre álló információ. Az elmúlt évben két esettanulmány jelent meg, melyben célzott terápiát alkalmaztak PBAC betegeknél. Az egyikben Wang és munkacsoportja egy 64 éves férfi beteget I stádiumú PBAC-val diagnosztizáltak, majd egy évvel az operációt követően tüdő metasztázist írtak le. A primer tumor minták új-generációs szekvenálással (NGS) történő vizsgálata *HER2* amplifikációt és mutációt azonosított (p.S310F, allélfrekvencia: 90%). Miután többvonalbeli kezelés is kudarcot vallott, a 4. vonalbeli kezelésként trastuzumab + albumin-kötött paclitaxel kombinációját kezdték el alkalmazni, amire a páciens jól reagált (6 hónap progresszió-mentes túlélés), mely azt sugallja, hogy a trastuzumab alapú terápia hatékony lehet azon PBAC betegek számára, akik *HER2* amplifikációt hordoznak. A tumor progresszióját követően újra szekvenálást végeztek, amely nem mutatott *HER2* amplifikációt és a korábban detektált mutáció gyakorisága is jóval csökkent (90% vs. 27%) (77).

A másik, UrC kapcsán már említett esettanulmányban, egy fázis 2-es klinikai kísérletbe 4 PBAC beteget vontak be. A betegeket IEG szerekkel, nivolumab és ipilimumab kombinációjával kezelték és közülük egy beteg jól reagált a kezelésre (teljes/részleges választ adott), kezelése a cikk megjelenésekor még folyamatban volt, míg a többi 3 beteg esetében progressziót írtak le (35).

#### 1.2.4 A PBAC molekuláris háttere

A PBAC molekuláris hátterét tekintve csupán csekély mennyiségű információ áll rendelkezésünkre. Genetikai profiljának megismerése segíthetné a diagnózis felállítását, és a prógnózis előrejelzését. Emellett a betegségre jellemző genetikai eltérések egy része terápiás célpontként szolgálhat, így a molekuláris háttér ismerete a betegség kezelése szempontjából is meghatározó lehet.

Korábbi évek egy-egy gén vizsgálatát célzó PBAC tanulmányai viszonylag alacsony *KRAS* (11.5%, 3/26) és *TERT* promóter (28.5%, 4/14) mutációs gyakoriságról

számoltak be (78, 79). Emellett kimutatták, hogy sem *EGFR* mutáció/amplifikáció, sem *ALK* átrendeződés nem jellemző a PBAC-ra, azonban a minták 36%-ban (10/28) *EGFR* poliszómiát detektáltak (80).

Nagyobb esetszámú kutatások csak az utóbbi években jelentek meg a PBAC genetikai hátterének feltérképezése kapcsán, melyekben retrospektív módon, NGS eljárással vizsgáltak daganatos szövetmintákat (48, 49, 81). Ezen vizsgálatok számos, klinikailag jelentős genetikai eltérést azonosítottak. Eredményeik alapján a betegség patogenezisében nagy valószínűséggel a MAPK, mTOR, Wnt és TP53/Rb1 útvonalak is szerepet játszhatnak.

A Wnt jelátviteli útvonalnak számos daganattípus kialakulásában van kiemelt szerepe. Amennyiben az útvonal aktív, a  $\beta$ -catenin, mint a transzkripció ko-aktivátora, a sejtmagba jutva elindítja a Wnt szignálútvezetést azáltal, hogy komplexet képez a LEF/TCF transzkripciós faktorokkal. A transzkripciós komplex sikeres összeállása különböző target gének átírását eredményezi, így befolyásolva a sejtciklus szabályozását, a sejtek migrációs képességét és a sejt differenciációt. A fő szabályozó mechanizmus, mely kontrolálja a  $\beta$ -catenin sejtmagon belüli felhalmozódását az APC-axin-axin2 komplex mediált proteozómális degradáció. A Wnt útvonal aktiválását leggyakrabban az APC inaktivációja okozza, illetve emellett a  $\beta$ -catenin fehérjét kódoló *CTNNB1* gén 3. exonján bekövetkező aktiváló mutáció is egy jól ismert alternatív mechanizmusa (82). PBAC kapcsán is leírták az *APC* és *CTNNB1* gének mutációját/amplifikációját (48, 49, 81), valamint egy esetben IHC eljárással sikeresen detektálták a  $\beta$ -catenin túlzott expresszióját és abnormális magi felhalmozódását is (81). Szintén a Wnt útvonal szabályozásáért felelős *SMAD4* tumorszuppresszor gén érintettségét is kimutatták PBAC-ban (49), melynek funkcióvesztéses mutációja CRC-ben összefüggésben áll a kemoterápia elleni rezisztenciával (83).

Egy további, klinikai szempontból jelentős protoonkogén, a *PIK3CA* mutációit is többször detektálták PBAC mintákban (81). A *PIK3CA* mutációi a PI3-kináz útvonal aktivációjához vezetnek, ezért ilyen esetekben az mTOR inhibitorok, mint pl.: az everolimus és temsirolimus hatékonyak lehetnek a daganat megfékezésében (84).

A *KRAS* gén érintettségéről több publikáció is beszámolt, melyek alapján úgy tűnik, hogy a betegek körülbelül harmadában (11.5%-35%) mutálódik (78, 81, 49, 48). A mutáció a 12 (p.G12V, p.G12A, p.G12D) és 13 (p.G13D) kodonokat érinti legtöbbször

(78, 81). A 2014-es, Alexander és kutatócsoportja által publikált eredményekhez hasonlóan *EGFR* mutációt vagy amplifikációt szintén nem detektáltak (81), ezzel szemben viszont PBAC-ban elsőként írtak le két *BRAF* mutációt, melyek közül az egyik egy p.V600E variáns volt, mely más daganatok esetén jól ismert terápiás célpont (85).

A sejtek túlélését és a DNS folyamatos replikációját a telomerek biztosítják, melyhez a telomeráz reverz transzkriptáz (*TERT*) enzim működése elengedhetetlen. Számos humán daganattípusban a *TERT* gén promóter régiójának nagyszámú aktiváló mutációját írták már le, többek között az urothelsejtes daganatban (64,5%) is. (86). A *TERT* promóter mutációja PBAC mintákban is kimutatható volt (28,5% 4/14 (79), 13%, 2/15 (81), 17% 2/12 (49), 5%, 1/20 (48)), ám jóval alacsonyabb százalékban fordult elő az urothelsejtes daganatokhoz képest.

Az eddig publikált vizsgálati eredmények arra engednek következtetni, hogy genetikailag a PBAC külön entitás, mely urothelialis (pl.: *TERT* promóter mutáció), és colorectalis (pl.: Wnt útvonal eltérései) jellegzetességekkel is rendelkezik. Habár az eddigi eredmények alapján e három tumorentitás (CRC, PBAC és UrC) mutációs alapon történő elkülönítése egyelőre nem lehetséges, a PBAC célzott molekuláris vizsgálata fontos lehet a terápiás célpontok azonosításához és ezáltal a betegek személyre szabott kezelésének kiválasztásához.

## 2. Célkitűzések

1. Egy világviszonylatban is egyedülálló méretű UrC és PBAC szövet- és adatgyűjtemény létrehozása:
  - a. Nemzetközi kooperáció keretében
  - b. A hazai PBAC és UrC esetek összegyűjtése a Nemzeti Rákregiszter (NR) segítségével (TUKEB 74/2016).
  
2. DNS szintű vizsgálatok a terápiás célpontok azonosítása, valamint a PBAC és UrC molekuláris taxonomiájának pontosítása céljából:
  - a. 161 onkológiai szempontból releváns gén NGS vizsgálata az OncoPrint™ Comprehensive Assay v3 (OCAv3) panel segítségével.
  - b. 6 gén célzott vizsgálata (*APC*, *DICER1*, *PRKARIA*, *PTEN*, *TSHR*, *WRN*) beleértve a CRC patogenezisében fontos szerepet betöltő *APC* és terápiarezisztencia előrejelzésében fontos *PTEN* gént.
  
3. Az OCAv3 pannellel azonosított patogén eltérésekre javallt, illetve ellenjavallt tervezett hatóanyagok azonosítása a Qiagen Clinical Insight (QCI) bizonyítékokon alapuló, terápiás döntéshozatalt támogató szoftver segítségével.
  
4. Fehérje szintű vizsgálatok mind UrC mind PBAC mintákon a differenciáldiagnosztika fejlesztése céljából: a PTEN,  $\beta$ -catenin és MMR fehérjék vizsgálata IHC módszerrel.
  
5. Eredményeink irodalmi kontextusba helyezése, mind a PBAC, mind pedig az UrC esetében.

### 3. Módszerek

#### 3.1 Minta- és klinikai adatgyűjtés

Munkánk során hazai és külföldi kooperációs partnerek bevonásával egy világviszonylatban is egyedülálló méretű UrC és PBAC szövet- és adatbankot hoztunk létre. A hazai eseteket a Nemzeti Rákregiszter segítségével - *Urachus Hungaricus (UHU) Projekt* (TUKEB 74/2016) -, az európai eseteket pedig egy nemzetközi kooperáció keretében térképeztük fel.

A hazai esetgyűjtés a NR 2001-2016 között regisztrált adataiban BNO (betegségek nemzetközi osztályozása) és morfológiai kódokkal 3 szűrést hajtottunk végre: elsőként az UrC (C67.7), majd a húgyhólyag kupola daganatainak (C67.1), végül pedig a húgyhólyag adenocarcinomáinak (C67/81403) kiszűrésére. Az adatgyűjtés két részből épült fel. Először levélben és e-mailben megkerestük azt a 86 magyarországi intézményt, amelyeknél a fenti keresési kritériumok legalább egy találatot eredményeztek. Azt kértük, hogy a keresési feltételeknek megfelelő betegek esetében saját betegadatbázisukat használva adják meg a páciensek végső diagnózisát: 1) UrC diagnózis, 2) PBAC diagnózis, 3) egyéb diagnózis. A második körben már kizárólag azon intézményeket kerestük meg újra, ahol az első kör eredményeképpen legalább egy megerősített UrC/PBAC diagnózisú beteget kezeltek. A második megkeresés célja a részletes klinikai és követési adatok összegyűjtése volt, amihez az intézményeket egy standardizált adattáblázat kitöltésére kértük a mellékelt részletes kitöltési útmutatónak megfelelően. Emellett esetenként egy-egy paraffinba ágyazott tumormentes és tumortartalmú szövetmintát kértünk az intézményektől a molekuláris vizsgálatok elvégzéséhez.

A nemzetközi mintagyűjtés során urológiai klinikákon és patológiai intézetben dolgozó 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.

### **3.2 Minták feldolgozása, DNS izolálás**

Az összegyűjtött FFPE szövetblokkokból 4 µm vastagságú metszeteket készítettünk. A tárgylemezre került szövetrészetek egyikén hematoxin-eozin (HE) festést végeztünk. Mivel a metszetek többnyire tumoros és tumormentes területeket is tartalmaztak, így szükség volt a tumoros terület megjelölésére, a tumormentes szövettel történő „szennyezettség” elkerülése érdekében. A metszeteinket egy patológus szakorvos vizsgálta, aki egyrészt meghatározta, hogy az adott metszeten a teljes szövetrészetben a tumorsejtek az összes látható sejt hány százalékát tették ki, illetve, ha a tumortaralom nem érte el a 15%-ot, akkor a tumoros szövet határait megjelölte. A makrodisszekció során a szabad szemmel jól látható méretű tumorszövetek eltávolítását végeztük el. A makrodisszekált szövetrészetekből a DNS izolálása a High Pure PCR Template Preparation Kittel (Roche) történt, a gyártó utasításait követve.

### **3.3 DNS minták minőségi és mennyiségi ellenőrzése**

A DNS koncentráció meghatározására spektrofotometriás és fluorimetriás módszert is alkalmaztunk. A spektrofotometriás mérés NanoDrop 1000 készülékkel (Thermo Fisher) történt, mely a DNS UV elnyelését méri 2 µl mintából. A minta DNS koncentrációjának meghatározásához a 260 nm-es hullámhosszúhoz tartozó abszorbancia értéket mértük meg, valamint meghatároztuk a 260/280 és a 260/230 nm-en mért abszorbancia arányt is, hogy a minták megfelelő minőségéről meggyőződjünk. A fluorimetriás mérést Qubit 4.0 műszeren dsDNA hs Assay-el/dsDNA Broad Range Assay-el (Invitrogen) végeztük. Ebben az esetben interkalálódó fluoreszcens festéket kevertünk a mintákhoz, és a fluoreszcencia intenzitásból következtethettünk a DNS koncentrációjára. A méréseket a gyártó utasításait követve végeztük el.

### **3.4 DNS szintű molekuláris vizsgálatok**

Vizsgálatainkat két szekvenáló panel alkalmazásával végeztük el, melyeken 6 (Illumina MiSeq kohort) és 161 gén (IonTorrent kohortok) szekvenciáját vizsgáltuk, valamint kollaborációs partnereink segítségével MSI vizsgálatokat végeztünk 63 UrC-s minta (MSI kohort) bevonásával. Mivel a vizsgálatok a gyűjtéssel párhuzamosan, különböző időpontokban történtek, ezért a vizsgálati kohortok méretei is eltérőek voltak, a betegek a kohortok között részben átfedtek.



### 3.4.1 Az Illumina MiSeq szekvenálás (6 gén)

A rendelkezésre álló minták közül összesen 40 UrC beteg esetében (Illumina MiSeq kohort) célzott NGS eljárással vizsgálatokat végeztünk Illumina MiSeq Platformon. Mintánként 45 ng DNS-t használtunk fel multiplex polimeráz láncreakció (PCR) futtatására, és a legalább 0,5 ng/ul-es koncentrációjú mintákon további vizsgálatokat végeztünk. A könyvtár preparálását a NEBNext Ultra DNA Library Prep Set for Illumina (New England Biolabs) kittel végeztük a gyártó utasításait követve. A szekvenálás Illumina MiSeq platformon, az elemzés pedig a Cancer Research Workbenchen (Qiagen) keresztül történt. A célzott szekvenálás egyedi panelen történt, mely exon régiókat és a szomszédos intronikus régiókat fedi le a célzott 6 gén esetében (*APC*: exon 1-16, *DICER1*: exon 1-28, *PRKARIA*: exon 1-11, *PTEN*: exon 1-9, *TSHR*: exon 1-10, *WRN*: exon 2-35). Minden minta esetében az átlagos lefedettség körülbelül 5000-szeres volt. Az elemzés a CLC Biomedical Genomics Workbench alkalmazásával történt, majd a szekvenálási adatokat a hg19 humán referencia genomra illesztettük. Az annotálás nyílt adatbázisok felhasználásával történt (COSMIC, ClinVar, dbSNP, 1000 genome projekt, HapMap).

### 3.4.2 Ion Torrent OncoPrint szekvenálás (161 gén)

A rendelkezésre álló minták közül összesen 41 UrC és 13 PBAC esetében (IonTorrent kohortok) végeztük NGS-alapú szekvenálást az OCAv3 (ThermoFisher Scientific) panel segítségével. A kiválasztott FFPE szövettani blokkokból 4 mikron vastagságú lemezeket készítettünk, melyekről szükség esetén a korábban leírtak szerint elvégzett makrodisszekciót követően DNS-t izoláltunk. A szekvenálási vizsgálatot 10 ng DNS mintából indítottuk. E vizsgálat képes detektálni az egy nukleotid eltéréseket (SNV: single nucleotide variants), az inzerciókat és deléciókat (INDEL), valamint a számbéli eltéréseket (CNV: copy number variants) összesen 161, onkológiai szempontból releváns gén esetében (6. táblázat). Az OCAv3 az Ion AmpliSeq™ (ThermoFisher Scientific) amplicon sokszorosításon alapuló módszerét alkalmazza. Az IonTorrent technológia 4 fő lépésből áll: 1) könyvtár előállítás 2) minta preparálás és amplifikáció, 3) szekvenálás és 4) adatelemzés.

Az automata könyvtárkészítéshez az Ion AmpliSeq Kitet használtuk a gyártó utasításainak megfelelően (Ion AmpliSeq™ Kit for Chef DL8). A szekvenálás Ion s5™

XL félvezető szekvenálón, egy Ion 540TM szekvenáló chipen történt, a gyártó utasításait követve. A minták esetében az átlagos lefedettség körülbelül 2500-szoros volt. A szekvenálási adatokat a hg19 humán referencia genomra illesztettük. Az adatok elemzése a Torrent Browser szoftverrel történt. A szekvenálási eredmény patogenitás szerinti annotálása az IonReporter 5.6 szoftverrel történt, melyet kiegészítettünk szabadon hozzáférhető online adatbázisokkal (VEP (variant effect predictor) / ClinVar / VarSome / COSMIC (Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer) adatbázisok).

A kapott szekvenálási eredményeket az alábbi szelekciónak vetettük alá:

A) Technikai minőségi kritérium alapú szűrést végeztünk, vagyis kizártuk azon mintákat a kiértékelésből, melyek nem feleltek meg a kezdeti minőségi ellenőrzésnek. A minták minőségi kontrollját a következő 4 kritérium alapján végeztük el: readok száma >3M, readok átlagos hosszúsága > 75 bp, az átlagos mélység > 800x és bázisok lefedettségének egységessége > 80%.

B) Kizártuk azon eltéréseket, melyek nem exon régióon belül voltak.

C) A minimális allélfrekvencia értéket 15%-ra állítottunk be, mely határértéket korábbi vizsgálatunkban azonos mintákon, azonos gének szekvenálási eredményeinek összevetésével határoztuk meg. Ez volt az a legalacsonyabb határérték, amely mellett még a legnagyobb átfedést mutatták az egyes gének különböző szekvenálási módszerrel kimutatott eltérései.

## 6. táblázat - Az OCAv3 panelen vizsgált gének listája.

Hotspot gének				Teljes hosszúságú gének			Számbéli eltérések		Génfüzió (inter-, és intragénikus)		
AKT1	FOXL2	MET	AKT2	ATM	TP53	MSH6	AKT1	PPARG	ALK	RET	NF1
ALK	GATA2	MTOR	AKT3	BAP1	TSC1	NBN	AR	TERT	AXL	ROS1	NOTCH1
AR	GNA11	MYD88	AXL	BRCA1	TSC2	NOTCH2	CCND1	AKT2	BRAF	AKT2	NOTCH4
ARAF	GNAQ	NFE2L2	CCND1	BRCA2	ARID1A	NOTCH3	CCNE1	AKT3	EGFR	AR	NRG1
BRAF	GNAS	NRAS	CDK6	CDKN2A	ATR	PALB2	CDK4	ALK	ERBB2	BRCA1	NTRK2
BTK	HNF1A	PDGFRA	ERCC2	FBXW7	ATR	PMS2	CDK6	AXL	ERG	BRCA2	NUTM1
CBL	HRAS	PIK3CA	FGFR4	MSH2	CDK12	POLE	EGFR	BRAF	ETV1	CDKN2A	PDGFRB
CDK4	IDH1	PPP2R1A	H3F3A	NF1	CDKN1B	RAD50	ERBB2	CCND2	ETV4	ERBB4	PIK3CA
CHEK2	IDH2	PTPN11	HIST1H3B	NF2	CDKN2B	RAD51	FGFR1	CCND3	ETV5	ESR1	PRKACA
CSF1R	JAK1	RAC1	MAP2K4	NOTCH1	CHEK1	RAD51B	FGFR2	CDK2	FGFR1	FGR	PRKACB
CTNNA1	JAK2	RAF1	MDM4	PIK3R1	CREBBP	RAD51C	FGFR3	CDKN2A	FGFR2	FLT3	PTEN
DDR2	JAK3	RET	MYC	PTCH1	FANCA	RAD51D	FGFR4	CDKN2B	FGFR3	JAK2	RAD51B
EGFR	KDR	RHEB	MYCN	PTEN	FANCD2	RNF43	FLT3	ESR1	NTRK1	KRAS	RBI
ERBB2	KIT	RHOA	NTRK1	RB1	FANCI	SETD2	IGF1R	FGF19	NTRK3	MDM4	RELA
ERBB3	KNSTRN	SF3B1	NTRK2	SMARCB1	MLH1	SLX4	KIT	FGF3	PDGFRA	MET	RSPO2
ERBB4	KRAS	SMO	PDGFRB	STK11	MRE11A	SMARCA4	KRAS	NTRK1	PPARG	MYB	RSPO3
ESR1	MAGOH	SPOP	PIK3CB				MDM2	NTRK2	RAF1	MYBL1	TERT
EZH2	MAP2K1	SRC	ROS1				MDM4	NTRK3			
FGFR1	MAP2K2	STAT3	SMAD4				MET	PDGFRB			
FGFR2	MAPK1	U2AF1	TERT				MYC	PIK3CB			
FGFR3	MAX	XPO1	TOP1				MYCL	RICTOR			
FLT3	MED12						MYCN	TSC1			
							PDGFRA	TSC2			
							PIK3CA				

### 3.4.2.1 A mutációs mintázat terápiás szempontból történő besorolása

A patogén eltéréseket a QCI szoftverrel (Qiagen Clinical Insight, verzió: 8.1.20210827) vizsgáltuk tovább (lekérdezés dátuma: 2021.12.16). Ezzel a módszerrel az adott genetikai eltéréshez a szoftver segítségével terápiás javaslatot illeszthetünk. A QCI szoftver elemzi az adott genetikai eltérést, klinikai relevanciája alapján interpretálja azt, majd terápiás javaslatot tesz az adott eltérés alapján, ezzel elősegítve a megfelelő terápiás döntéshozatalt. Előnye, hogy több adatbázis elérhető adatait, valamint az aktuális klinikai kutatási anyagokat is összegyűjti és értelmezi, így segítve a pontosabb terápiás döntéshozatalt. A program az eredményeket összefoglaló riport formájában prezentálja, amelyben a genetikai eltéréseket patogenitás alapján csoportosítja (patogén vagy benignus), illetve az adott javaslatok evidencia szintjét (Tier 1-4) is megadja. A Tier 1-es evidencia erős klinikai szignifikanciát takar, mely A és B szintre különül el. A Tier 1A szint az FDA (Food and Drug Administration) által jóváhagyott, illetve a szakmai irányelvekben is szereplő ajánlásokat foglalja magába, míg a Tier 1B szint az adott terület szakértői által végzett kutatások konszenzusán alapuló ajánlásokat takarja. A Tier 2-es evidencia potenciális klinikai szignifikanciát takar, mely C és D szintre különül el. A Tier 2C az FDA által különböző tumortípusokra, vagy kutatási fázisban lévő terápiákra jóváhagyott, valamint több, kisebb publikált tanulmány konszenzusán alapuló ajánlásokat

foglalja magába, míg a Tier 2B preklinikai fázisban lévő vagy néhány esettanulmányon alapuló, konszenzus nélküli ajánlásokat takar. A Tier 3-as szint ismeretlen klinikai szignifikanciát takar, míg a Tier 4-es szint benignus eltéréseket jelöl. Saját vizsgálatunkban Tier 2C és Tier 3-as szintű ajánlásokat kaptunk és a továbbiakban a legalacsonyabb, Tier 3 evidencia szintű ajánlásokat nem vettük figyelembe, így csak a Tier 2C szintű ajánlásokat dolgoztuk fel, mivel ezek bírnak potenciális klinikai jelentőséggel. Ezen eltérésekhez a program olyan terápiás szereket rendel, melyek:

- A) az amerikai Élelmiszer – és Gyógyszerengedélyeztetési Hivatal (FDA – Food and Drug Administration) jóváhagyott,
- B) különböző tumortípusok szakmai kezelési irányelveiben szerepelnek,
- C) vagy klinikailag bizonyított hatással rendelkező, de még kísérleti fázisban lévő hatóanyagok (87).

### **3.4.3 DNS szintű mikroszatellita instabilitás (MSI) vizsgálat**

Az öt primer párral elvégzett PCR reakciókat multiplex formában végeztük el a 7. táblázatban felsorolt primerek alkalmazásával összesen 56 UrC-s mintán (MSI kohort, n=63, 89%). A multiplex PCR reakciót 2 µl 50 ng/µl koncentrációjú templát DNS mintával futtattuk 25 µl-es végtérfogatban. A fragment analízist, vagyis a PCR során keletkezett amplikonok nagy felbontású elválasztását a 7. táblázatban jelölt típusú kapilláris elektroforézis készülékekkel végeztük el. A készülékek 96-os platebe mért mintákat futtatnak a kapilláris csatornában. A reakciócsövek a hígított mintán kívül reakcióelegyenként tartalmaznak még formamidot, illetve méret standard oldatot is. A méret standard egy, a primereket jelölő fluoreszcens festéktől eltérő színnel jelölt molsúly standard, amely a mintákkal együtt futtatva lehetővé teszi a fragmentek méretének meghatározását. A denaturált molekulák mozgásának sebessége függ azok méretétől, így ezen technikának köszönhetően a hosszbeli eltérés időbeli a futási időben megmutatkozó különbséggé válik, amely a detektálás alapját képezi. Az észlelt fluoreszcencia-intenzitás mértéke pedig a keletkezett termék mennyiségéről ad tájékoztatást. Kettő, vagy több instabilnak értékelt mikroszatellita marker esetében az eredményt erősen instabilnak tekintettük (MSI-high).

**7. táblázat - MSI vizsgálattal kapcsolatos információk.**

	Helyszín	Marker					Gyártó	Fragment analízis
MSI kohort - 63 UrC minta	Universitätsklinikum Essen - UKE	BAT-25	BAT-26	NR-21	NR-24	MONO-27	Promega	3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystem)
	Netherlands Cancer Institute - NKI	BAT-25	BAT-26	NR-21	NR-24	NR-27	Integrated DNA Technologies	3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystem)
	Semmelweis Egyetem Budapest	BAT-25	BAT-26	D2S123	D5S346	D17S250	Thermo Fisher Scientific	3500 Dx Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific)

**3.5 Fehérje szintű vizsgálatok**

**3.5.1 A  $\beta$ -catenin és PTEN fehérjék IHC vizsgálata UrC kohorton**

A  $\beta$ -catenin fehérje IHC vizsgálatát 38 UrC beteg FFPE tumormintáin végeztük el (Ref: 503-2264, Zytomed Systems; előkezelés: CC1, 90°C, 16 min; hígítás: 1:1000, 24 min). A PTEN fehérje IHC vizsgálatára 30 UrC beteg FFPE tumormintája állt rendelkezésünkre (clone: 138G6, Cell Signaling Technology; előkezelés: CC1, 90°C, 32 min; hígítás: 1:200, 24 min). A vizsgálatokhoz minden esetben 3  $\mu$ m vastag FFPE metszeteket használtunk, a festés pedig a Ventana Benchmark Ultra rendszeren (Ventana Medical Systems) történt. A megjelenítés PotiView DAB rendszeren keresztül zajlott (Ventana Medical Systems).

**3.5.2 MMR fehérjék vizsgálata IHC analízissel UrC és PBAC kohorton**

A hazai és nemzetközi gyűjtésből származó 19 PBAC mintán (PBAC MMR kohort) és 61 UrC mintán (MSI kohort n=63, 97%) végeztük el a MMR fehérjék (MLH1, MSH2, MSH6 és PMS2) IHC vizsgálatát. A vizsgálatok elvégzéséhez 3  $\mu$ m vastagságú metszeteket használtunk. Minden vizsgálat a Ventana Benchmark Ultra rendszeren keresztül zajlott (Ventana Medical Systems). A MMR fehérjék IHC vizsgálatának kiértékelése az egyes fehérjék tumorsejtek magjaiban mutatott pozitivitása alapján történt. A küszöbértéket <10%-nak tekintettük, ezen érték fölött MMR-hiány/MMR-deficiencia áll fenn (8. táblázat)

**8. táblázat** - Az IHC vizsgálatokkal kapcsolatos információk. RTU: ready to use.

	Helyszín	Marker	Klón/acc.#	Hígítás	Gyártó	Vizualizáció
UrC kohort	Universitätsklinikum Essen - UKE	MLH1	G168-15	1:75	Zytomed Systems	OptiVieW DAB (Ventena Medical Systems)
		MSH2	SP46	1:50	DCS Diagnostik-Systeme	
		MSH6	44	1:400	DCS Diagnostik-Systeme	
		PMS2	EP51	1:25	Dako/Agilent Technologies	
	Netherlands Cancer Institute - NKI	MLH1	M1	RTU	Ventena Medical Systems	OptiVieW DAB (Ventena Medical Systems)
		MSH2	G219-1129	RTU	Ventena Medical Systems	
		MSH6	EP49	1:50	Epitomics	
		PMS2	EP51	1:50	Dako/Agilent Technologies	
PBAC kohort	Semmelweis Egyetem Budapest	MLH1	790-5091	RTU	Ventena Medical Systems	OptiVieW DAB (Ventena Medical Systems)
		MSH2	790-5093	RTU	Ventena Medical Systems	
		MSH6	EP49	RTU	Cell Marque	
		PMS2	EP51	RTU	Dako/Agilent Technologies	

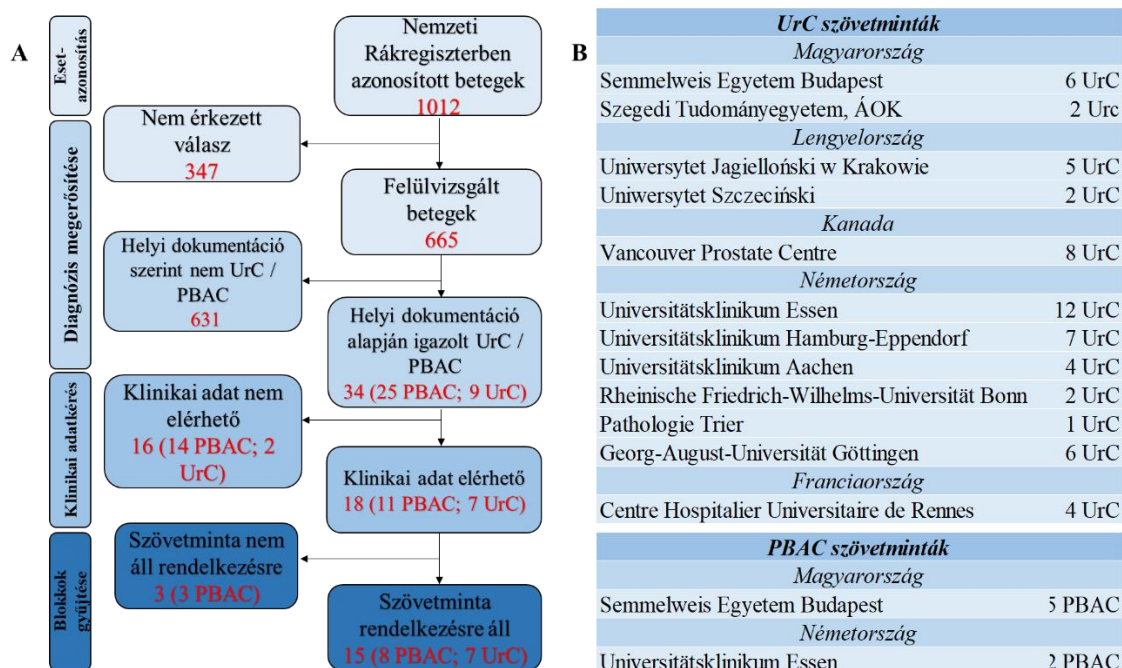
### 3.6 Statisztikai kiértékelés

A statisztikai analízist SPSS szoftverrel végeztük (v24, IBM). A Kaplan-Meier túlélési elemzést log-rank teszttel kiegészítve alkalmaztuk annak meghatározása érdekében, hogy az egyes változók milyen összefüggést mutatnak a teljes túlélésre vonatkozóan. Az egyes paraméterek túléléssel való összefüggéseinek további vizsgálatára egyváltozós Cox regresszió analízist végeztünk. A  $p \leq 0,05$  értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

## 4. Eredmények

### 4.1 Minta és klinikai adatgyűjtés eredményei

Szűrési kritériumaink a NR-ben 1012 beteget azonosítottak, melyből 1) UrC (C67.7) kóddal 19 beteget, 2) húgyhólyag daganat kupola lokalizáció (C67.1) kóddal 202 beteget, míg 3) húgyhólyag ADC (C67/81403) kóddal 791 beteg találtunk, akiket összesen 86 különböző magyarországi intézményben kezeltek. Az első körben elvégzett diagnózis egyeztetés során a 86 intézmény közül 54 válaszolt, így az 1012-ből 665 beteggel kapcsolatban kaptunk visszajelzést, mely végső soron 9 UrC és 25 PBAC-s esetet igazolt (5%, 34/665). A maradék 631 beteg (95%) esetében az adott intézmény klinikai dokumentációja szerinti a végső diagnózis nem UrC vagy PBAC volt. Második lépésként az igazolt UrC/PBAC esetekről kértünk részletes klinikai és követési adatokat, melyeket 7 UrC és 11 PBAC esetében meg is kaptunk. Az igazolt és részletes klinikai és követési adatokkal rendelkező betegből 7 UrC és 8 PBAC esetében kaptunk szövetszövetmintákat is (5.A ábra).



5. ábra – A) Hazai és B) nemzetközi minta és klinikai adatgyűjtés sémája és eredményei.

A nemzetközi mintagyűjtésbe 10 külföldi kooperációs partner, valamint további 2 magyarországi intézmény csatlakozott. Ennek eredményeként 59 UrC és 17 PBAC

beteg FFPE szöveti blokkját gyűjtöttük össze. A Semmelweis Egyetemről 6 UrC beteg, a Szegedi Tudományegyetemről 2 UrC, Németország hat különböző intézményéből összesen 32 UrC, a lengyel Jagelló Egyetemről 5 UrC, a szintén lengyel Szczezin Egyetemről 2 UrC, a kanadai Vancouveri Proszttarók Centrumból 8 UrC, a francia Rennes-i Egyetemről pedig 4 UrC beteg mintáit bocsátották rendelkezésünkre. PBAC esetében a Semmelweis Egyetem Patológiai, Igazságügyi és Biztosítási Orvostani Intézetéből 6, és Németországból 12 PBAC mintát bocsátottak rendelkezésünkre (5.B ábra).

Az NR-ben található esetek az egyes intézményektől beérkező kódok alapján kerülnek tárolásra.

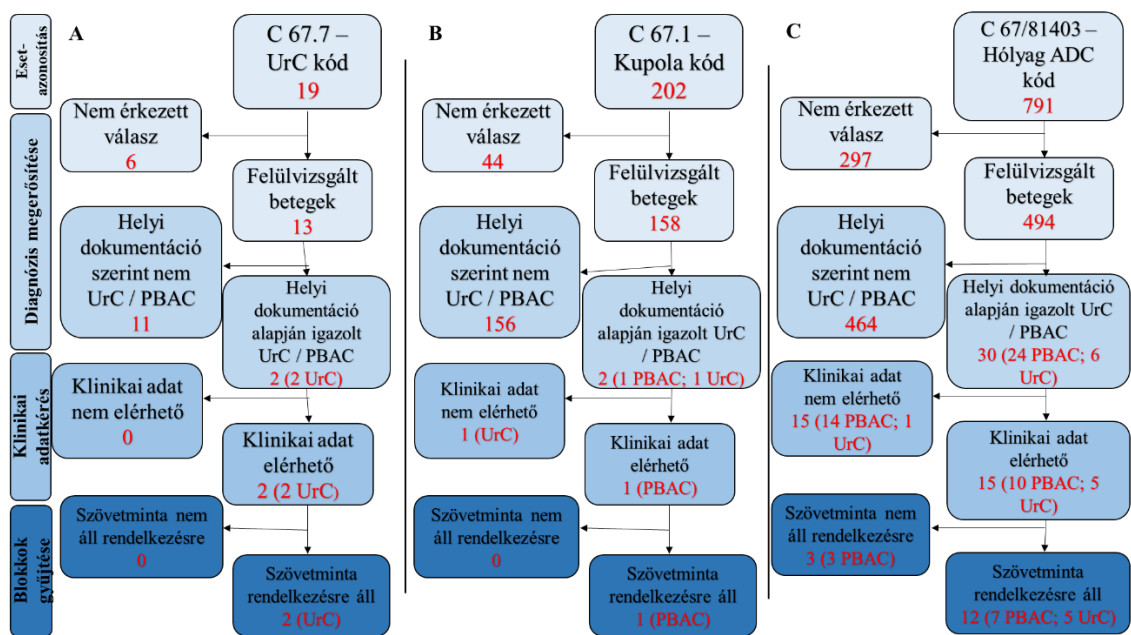
1) Az UrC kóddal (C67.7) történő keresésünk 19 beteget eredményezett. A diagnózisegyeztetés 13 beteg esetében történt meg, mely 2 valódi UrC-s beteget azonosított, a fennmaradó 11 beteg (85%, 11/13) egyéb végső diagnózissal rendelkezett (6.A ábra).

2) A hólyagkupolát érintő daganatnak megfelelő C67.1-es kódú keresésünkkel 202 beteget szűrtünk ki, melyből 158 beteg esetében volt sikeres a diagnózis kezelőintézményekkel történő egyeztetése. Közülük csupán 2 betegnél volt UrC/PBAC a diagnózis, az esetek 99%-ban (156/158) a kódolástól eltérő diagnózist igazoltak vissza (6. B ábra).

3) A harmadik keresési kódunk egy BNO és egy morfológiai kód kombinációja volt (C67/81403), mely összesen 791 beteget azonosított. A diagnózisok felülvizsgálata 494 beteg esetében történt meg, akik közül végső soron 30 beteg esetében erősítették meg az UrC/PBAC diagnózist (6. C ábra).

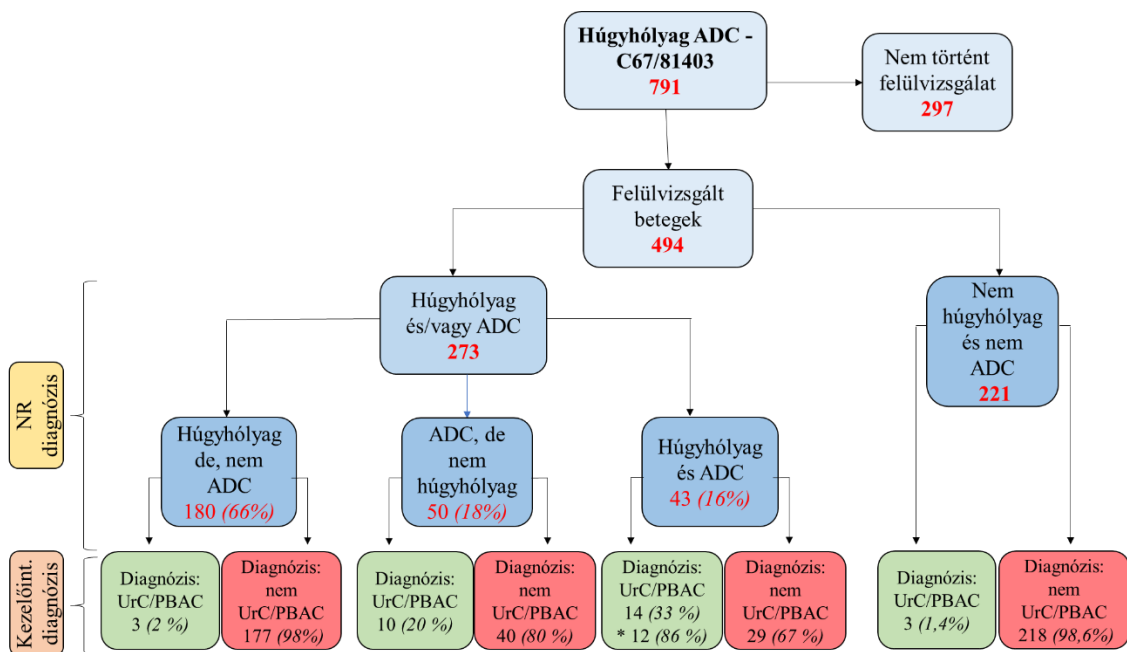
A kupola kód (C67.1) nem specifikusan csak UrC-t vagy PBAC-t azonosíthat, ezért itt az első lépésben történő diagnózis egyeztetés során talált eltérés nem tekinthető feltétlenül kódolási hibának. A másik két keresési kóddal (UrC – C67.7 és hólyag ADC – C67/81403) azonosított eseteknél azonban a BNO kódok által meghatározott és az intézményi válaszok alapján kapott eredmények egyezése elvárható lett volna. A C67/81403-as (hólyag ADC) kóddal azonosított betegek esetében alaposabban is ellenőriztük a BNO szerint kódolt és az intézmény által megadott diagnózisok közötti eltérések okát.





6. ábra – A) Az UrC kóddal, B) a hólyagkupola kóddal, és C) hólyag ADC kóddal történő minta és klinikai adatgyűjtés sémája és részletes eredményei.

A 791 db C.67/81403 kóddal azonosított személyből 494 esetben tudtuk elvégezni az alaposabb ellenőrzést a NR segítségével. Közülük 221 beteg a nem húgyhólyag és nem ADC csoportba került, míg 273 beteg (56%) a húgyhólyag és/vagy ADC csoportba sorolódott. Ez utóbbit további három alcsoportra osztottuk a BNO és morfológiai kód alapján: 1) húgyhólyagdaganat, de nem ADC (66%, 180/273), 2) ADC, de nem húgyhólyagdaganat (18%, 50/273), és végül 3) húgyhólyagdaganat és ADC (16%, 43/273). Ezen három csoporton belül a betegek kezelőintézetei által részünkre bocsátott diagnózisa alapján a végső diagnózis összesen 27 beteg esetében volt valóban UrC/PBAC (5A. és 7. ábra). A kezelőintézetek diagnózisa alapján azonban ebben a csoportban is volt 3 olyan beteg, akinek UrC/PBAC volt a végső diagnózisa (1,4%) (7. ábra).



7. ábra - A hólyag ADC (C67/81403) kóddal azonosított csoporton belüli betegeloszlás a kezelőintézetek által megküldött diagnózisokkal történő egyeztetés után. \*: Patológiai Intézetek által kódolt esetek.

#### 4.2 Betegkohortok karakterisztikája

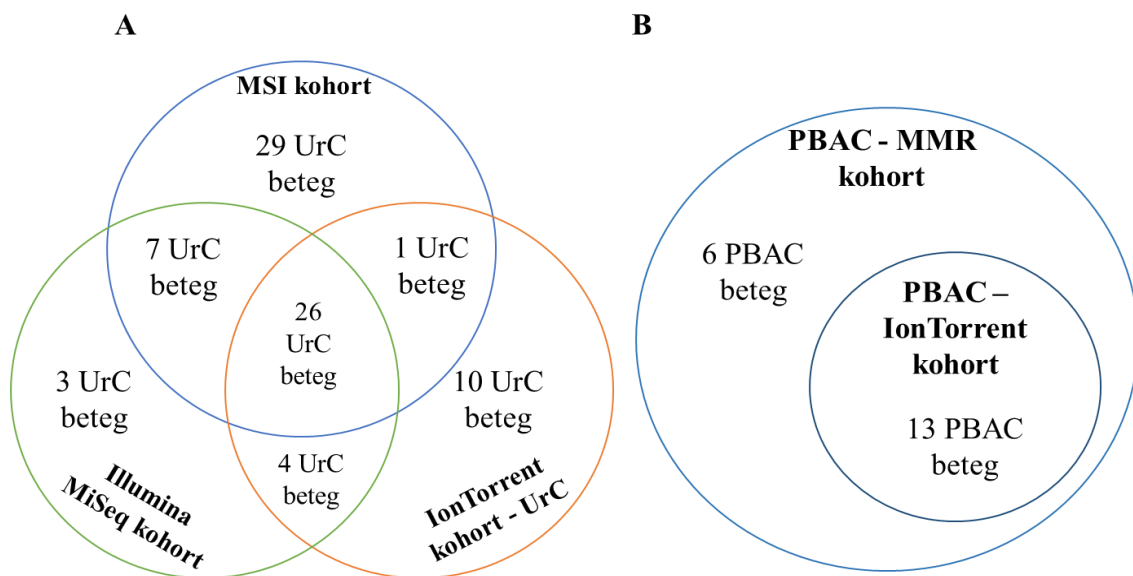
A különböző betegkohortok részben/egészben átfednek egymással, melyet a 8. ábra szemléltet. A kohortok karakterisztikáit a 9. és 10. táblázat foglalja össze külön UrC és PBAC csoportokra osztva.

DNS szintű vizsgálatainkat az alábbi kohortokon végeztük el:

- 1) az Illumina MiSeq kohort 40 UrC betegből állt (9. táblázat)
- 2) az IonTorrent UrC/PBAC kohort 54 beteget tartalmazott (UrC n=41, PBAC n=13) (9. és 10. táblázat)
- 3) az MSI kohort 63 UrC betegből állt (9. táblázat)

Fehérje szintű vizsgálatainkat az alábbi kohortokon végeztük el:

1. az Illumina MiSeq kohorton (n= 40 UrC) a PTEN és  $\beta$ -catenin fehérék vizsgálata (9. táblázat)
2. az MSI kohorton (n= 63 UrC) és a PBAC MMR kohorton (n=19 PBAC) a MMR fehérék vizsgálata (10. táblázat).



**8. ábra** - A különböző vizsgálatokba bevont A) UrC és B) PBAC kohortok átfedése egymás között.

**9. táblázat** - Az Illumina MiSeq az MSI és az IonTorrent kohortba bevont UrC-s betegek klinikai paraméterei. N.a.: nincs adat, NOS: not otherwise specified – nem specifikus, SRC: signet ring cell – pecsétgyűrűsejtes fenotípus, TURB: húgyhólyag transzurethralis reszekciója.

		Illumina MiSeq kohort		MSI kohort		IonTorrent kohort - UrC	
		n=40	(%)	n=63	(%)	n=41	(%)
Nem	Férfi	23	<b>58</b>	42		22	<b>54</b>
Életkor (év)	Középtérték (tartomány)	51.5 (24-78)	-	49 (24-78)	-	49.5 (22-77)	-
Vérvezelés	Igen	25	<b>83</b>	23	<b>82</b>	28	<b>85</b>
	Nem	5	<b>17</b>	5	<b>18</b>	5	<b>15</b>
	N.a.	10	-	35	-	8	-
Alhasi fájdalom	Igen	3	<b>10</b>	3	<b>11</b>	2	<b>6</b>
	Nem	26	<b>90</b>	25	<b>89</b>	29	<b>94</b>
	N.a.	11	-	35	-	10	-
Tapintható tumor	Igen	1	<b>3</b>	1	<b>4</b>	1	<b>3</b>
	Nem	29	<b>97</b>	27	<b>96</b>	30	<b>97</b>
	N.a.	10	-	35	-	10	-
UrC típus	Intesztinális	19	<b>47</b>	27	<b>43</b>	18	<b>46</b>
	Mucinózus	14	<b>35</b>	24	<b>38</b>	12	<b>31</b>
	NOS	4	<b>10</b>	4	<b>9</b>	5	<b>13</b>
	SRC	2	<b>5</b>	3	<b>7</b>	2	<b>5</b>
	Kevert	1	<b>3</b>	5	<b>8</b>	2	<b>5</b>
	N.a.	-	-	-	-	2	-
Kalcifikáció	Igen	4	<b>11</b>	3	<b>9</b>	2	<b>5</b>
	Nem	34	<b>89</b>	29	<b>91</b>	35	<b>95</b>
	N.a.	2	-	31	-	4	-
Sheldon beosztás	I	0	<b>0</b>	0	<b>0</b>	0	<b>0</b>
	II	1	<b>2,5</b>	8	<b>13</b>	0	<b>0</b>
	III-IIIID	24	<b>63</b>	32	<b>52</b>	30	<b>75</b>
	IVA-IVB	13	<b>34,5</b>	22	<b>35</b>	10	<b>25</b>
	N.a.	2	-	1	-	1	-
Mayo beosztás	I	10	<b>28</b>	16	<b>29</b>	10	<b>25</b>
	II	13	<b>36</b>	18	<b>32</b>	19	<b>49</b>
	III	4	<b>11</b>	4	<b>7</b>	3	<b>8</b>
	IV	9	<b>25</b>	18	<b>32</b>	7	<b>18</b>
	N.a.	4	-	7	-	2	-
Nyirokcsomó státusz	Negatív	19	<b>68</b>	26	<b>49</b>	19	<b>76</b>
	Pozitív	9	<b>32</b>	10	<b>19</b>	6	<b>24</b>
	Nincs nycs	-	-	17	<b>32</b>	-	-
	N.a.	12	-	10	-	16	-
Távoli metasztázis státusz	Negatív	20	<b>65</b>	38	<b>68</b>	28	<b>78</b>
	Pozitív	11	<b>35</b>	18	<b>32</b>	8	<b>22</b>
	N.a.	9	-	7	-	5	-
Nyirokcsomó/távoli meta. státusz	Pozitív	14	<b>35</b>	22	<b>35</b>	11	<b>27</b>
	Negatív/n.a	26	<b>65</b>	41	<b>65</b>	30	<b>73</b>
Sebészi terápia	TURB	3	<b>8</b>	31	<b>51</b>	1	<b>3</b>
	Parciális ciszt.	24	<b>69</b>	22	<b>36</b>	28	<b>76</b>
	Radikális ciszt.	8	<b>23</b>	8	<b>13</b>	8	<b>21</b>
	N.a.	5	-	2	-	4	-
Köldök eltávolítás	Igen	16	<b>52</b>	14	<b>50</b>	21	<b>64</b>
	Nem	15	<b>48</b>	14	<b>50</b>	12	<b>36</b>
	N.a.	9	-	35	-	8	-
Operáció utáni progresszió	Nincs	15	<b>48</b>	30	<b>52</b>	20	<b>57</b>
	Lokális	7	<b>23</b>	8	<b>14</b>	6	<b>17</b>
	Távoli	6	<b>19</b>	15	<b>0</b>	6	<b>17</b>
	Lokális és távoli	3	<b>10</b>	5	<b>9</b>	3	<b>9</b>
	n.a	9	-	5	-	6	-
Progresszió mentes túlélés	Középtérték (hónap)	22	-	24,5	-	19	-
	Tartomány	0-117	-	0-178	-	2-117	-
	n.a	7	-	3	-	5	-
Teljes túlélés	Középtérték (hónap)	34	-	41,5	-	29	-
	Tartomány	2-212	-	2-212	-	2-132	-
	n.a	7	-	3	-	2	-
Beteg státusz	Él	22	<b>65</b>	36	<b>60</b>	27	<b>69</b>
	Meghalt	12	<b>35</b>	24	<b>40</b>	12	<b>31</b>
	n.a	6	-	3	-	2	-

**10. táblázat** - Az IonTorrent és MMR vizsgálatba bevont PBAC betegek karakterisztikája. N.a.: nincs adat, TURB: húgyhólyag transzurethralis reszekciója.

		PBAC - MMR kohort		IonTorrent PBAC kohort	
		n=19	(%)	n=13	(%)
Nem	Férfi	13	<b>68</b>	8	<b>62</b>
Életkor (év)	Középérték (tartomány)	59 (38-86)	-	59 (38-75)	-
Vérvezetés	Igen	8	<b>80</b>	5	<b>83</b>
	Nem	2	<b>20</b>	1	<b>17</b>
	N.a.	9	-	7	-
Alhasi fájdalom	Igen	3	<b>30</b>	2	<b>29</b>
	Nem	7	<b>70</b>	5	<b>71</b>
	N.a.	9	-	6	-
Tapintható tumor	Igen	1	<b>10</b>	1	<b>14</b>
	Nem	9	<b>90</b>	6	<b>86</b>
	N.a.	9	-	6	-
Pecsetgyűrűsejtes komponens	Igen	5	<b>31</b>	3	<b>25</b>
	Nem	11	<b>69</b>	9	<b>75</b>
	N.a.	3	-	1	-
Kalcifikáció	Igen	0	<b>0</b>	0	<b>0</b>
	Nem	16	<b>100</b>	12	<b>100</b>
	N.a.	3	-	1	-
Stádium beosztás	T1	0	<b>0</b>	0	<b>0</b>
	T2	5	<b>28</b>	3	<b>23</b>
	T3	5	<b>28</b>	5	<b>38,5</b>
	T4	8	<b>44</b>	5	<b>38,5</b>
	N.a.	1	-	-	-
Grade	I	1	<b>6</b>	1	<b>9</b>
	II	7	<b>47</b>	6	<b>55</b>
	III	7	<b>47</b>	4	<b>36</b>
	N.a.	4	-	2	-
Nyirokcsomó státusz	Pozitív	-	-	5	<b>38</b>
	Negatív/n.a	-	-	8	<b>62</b>
Nyirokcsomó/távoli metasztázis státusz	Pozitív	9	<b>47</b>	7	<b>54</b>
	Negatív/n.a	10	<b>53</b>	6	<b>46</b>
Sebészi terápia	TURB	4	<b>22</b>	0	<b>0</b>
	Parciális cisztektómia	1	<b>6</b>	1	<b>8</b>
	Radikális cisztektómia	13	<b>72</b>	12	<b>92</b>
	N.a.	1	-	-	-
Nyirokcsomó eltávolítás / Vazektómia	Igen	11	<b>69</b>	10	<b>91</b>
	Nem	5	<b>31</b>	1	<b>9</b>
	N.a.	3	-	2	-
Teljes túlélés	Középérték (hónap)	22	-	32	-
	Tartomány	1-381	-	1-381	-
Beteg státusz	Él	5	<b>26</b>	4	<b>31</b>
	Meghalt	14	<b>74</b>	9	<b>69</b>

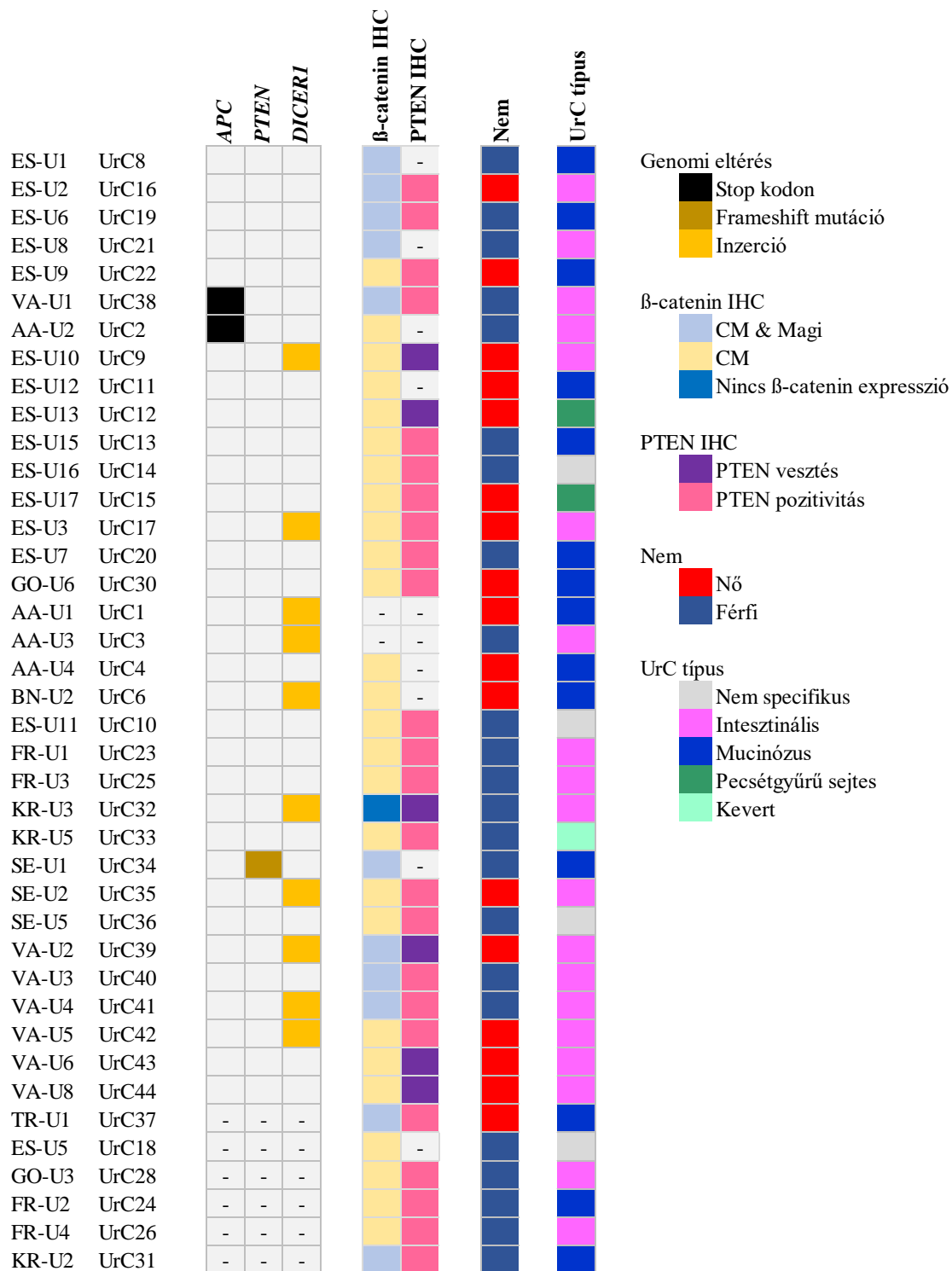
### 4.3 DNS szintű molekuláris vizsgálatok eredményei

#### 4.3.1 Illumina MiSeq 6 génes panel vizsgálat eredményei

A 40 UrC mintából 34 esetében sikerült elegendő mennyiségű és minőségű DNS mintát kinyerni a szekvenáláshoz, mely során az *APC*, *DICER1*, *PRKARIA*, *PTEN*, *TSHR* és *WRN* gének eltéréseit vizsgáltuk. Az *APC* és *PTEN* gének érintettsége 15% (5/34), illetve 6% (2/34) volt. Az *APC* gén esetében két eltérés (p.Y1075\*; c.3225T>G, p.K1199\*; c.3595A>T) csonkoló mutációnak bizonyult, melyek működésképtelen APC fehérjét eredményeztek, így ezen eltéréseket patogén mutációknak tekintettük. A másik három variáns (p.L2722V; c.8164C>G, p.L666V; c.1996T>G, p.N862K; c.2586C>G) az adatbázisok alapján benignusnak bizonyult. A *PTEN* génben azonosított két eltérésből az egyik egy frameshift inzerció volt (p.C211fs; c.631\_632insG), mely szintén működésképtelen fehérjét eredményez, így patogén eltérésnek tekintendő, míg a másik eltérés (p.R308C; c.922C>T) benignusnak bizonyult. Mindemellett a *DICER1* génben a vizsgált esetek 29%-ában intronikus eltéréseket találtunk (c.4206+8\_4206+9insTTGTG, COSM1666515) (10/34) (11. táblázat, 9. ábra).

**11. táblázat** - Urachus carcinomában talált genetikai eltérések az Illumina MiSeq 6 génes panellel.

Gén	Aminosav változás	Nukleotid változás	Predikció
<i>APC</i>	p.L2722V	c.8164C>G	<i>Benignus</i>
<i>APC</i>	p.L666V	c.1996T>G	<i>Benignus</i>
<i>APC</i>	p.Y1075*	c.3225T>G	<i>Patogén</i>
<i>APC</i>	p.N862K	c.2586C>G	<i>Benignus</i>
<i>APC</i>	p.K1199*	c.3595A>T	<i>Patogén</i>
<i>PTEN</i>	p.R308C	c.922C>T	<i>Benignus</i>
<i>PTEN</i>	p.C211fs	c.631_632insG	<i>Patogén</i>
<i>DICER1</i>	p.?	c.4206+8_4206+9insTTGTG	<i>Ismeretlen</i>



**9. ábra** - Az Illumina MiSeq platformon végzett vizsgálatok eredményeit összefoglaló ábra, kiegészítve a betegek klinikopatológiai paramétereivel és az IHC vizsgálatok eredményeivel. CM: citoplazma membrán.

### 4.3.2 Az Ion Torrent 161 génes panel vizsgálat eredményei

A 41 UrC és 13 PBAC minta esetében a 161 génes szekvenálási adatokon a releváns eltérések kiválasztása érdekében a szűrési lépéseket elvégeztük. Így összesen 45 UrC (80%, 33/41) és 12 PBAC (92%, 12/13) minta eredményeit értékeltük ki. Az így azonosított eltéréseket az IonReporter 5.6 szoftver segítségével funkció vesztést, illetve funkció nyerést okozó patogén eltérésekre osztottuk. Az Ion Reporter által be nem sorolt eltérések patogenitását pedig négy különböző, nyílt hozzáférésű adatbázis (COSMIC / ClinVar / VarSome / VEP) alkalmazásával határoztuk meg. Abban az esetben tekintettünk egy eltérést patogénnek, ha a négy adatbázisból legalább kettőben patogénként szerepelt. Az annotálás végeztével 68 gén 192 különböző eltérését, valamint 19 gén amplifikációját azonosítottuk a normál funkció megváltozásával járó patogén eltérésként (10. ábra).

Az UrC betegek 97%-a (32/33), míg a PBAC betegek 83%-a (10/12) hordozott legalább egy patogén eltérést. Az UrC páciensek 87,5%-a (28/32) hordozott kettő, vagy több mutációt, míg 4 beteg esetében csupán 1-1 patogén eltérést tudtunk kimutatni. A PBAC-s betegek 80%-nál (8/10) detektáltunk kettő vagy több genetikai eltérést. UrC esetében a leggyakrabban érintett gének a *TP53* (79%, 26/33), *KRAS* (33%, 11/33), *MYC* (18% 6/33), *NOTCH3* és *POLE* (15%, 5/33) voltak. Hasonlóképpen a PBAC betegek esetében a *TP53* (42%, 5/12), *KRAS* (25%, 3/12) és *MYC* (25%) gének érintettsége volt a legmagasabb. Leggyakoribbnak a misszensz eltérések bizonyultak, melyet 89 alkalommal detektáltunk, majd ezt követték nonszensz eltérések (n=88), míg kereteltolódással (frameshift) járó mutációt csupán 15 esetben detektáltunk, ebből 9 esetben deléció, 6 esetben pedig inzerció állt a háttérben (10. ábra).

Az UrC és PBAC mintákat együttvéve összesen 19 gén esetében detektáltunk amplifikációt, melyből 7 gén esetében egyéb eltérések is jelen voltak, míg a fennmaradó 12 gén esetében kizárólag amplifikációkat tapasztaltunk. Az UrC betegek körében a 19 amplifikálódott génből 16 volt jelen, míg a PBAC betegek körében csupán 10 génben detektáltunk amplifikációt. Mindkét csoportban a *MYC* gén amplifikációja bizonyult a leggyakoribbnak: UrC: 15% (5/33), PBAC: 25% (3/12) (10. ábra).

A teljes kohortot tekintve 38 gén eltérése (mutáció és amplifikáció) rekurrensnek bizonyult, tehát adott eltérés legalább 2 beteg esetében kimutatható volt. A két betegcsoportot külön vizsgálva UrC esetén 37 gén rekurrens eltérését detektáltuk, míg



PBAC esetén 7 gén ilyen eltérését azonosítottunk. 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%) (10. ábra).

Figyelembe véve, hogy az egyes eltéréseket útvonalakba osztva több 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, melybe a vizsgált 161 génből 22 tartozott. UrC-ban a 33 betegből 32 esetében (97%) volt eltérés ebben a funkcióban, míg a PBAC kohortban ugyanezen mechanizmus génjei a betegek 75%-ban voltak érintettek (9/12) (10. ábra).

Ezen kívül még a MAPK/PIK3 szignálútvonalban detektáltunk magas számban eltéréseket. Ebbe a kategóriába a vizsgált 161-ből összesen 27 gént osztottunk be. UrC esetén összesen 58 eltérést, míg PBAC esetén 8 eltérést detektáltunk, mely az UrC csoportban a betegek 67%-át (22/33), PBAC-ban pedig a páciensek 50%-át (6/12) jelentette.

A vizsgált gének közül 5 gén a NOTCH jelátviteli útvonalhoz tartozott, melyben 6 UrC beteg (6/33, 18%) esetében összesen 16 eltérést detektáltunk. Ugyanezen útvonal 3 PBAC betegben volt érintett, mely a vizsgált betegek 25%-át tette ki (3/12) (10. ábra).



#### 4.3.2.1 A mutációs mintázat alapján történő terápia predikció eredményei

A mutációs mintázat terápiás szempontból történő értékeléséhez a QCI szoftver segítségével célzott és kemoterapiás 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.

Szenzitív gyógyszer-mutáció kölcsönhatás alatt azt értjük, ha egy adott szer az adott genetikai eltérés megléte esetén a kedvezőbb kimenetellel áll összefüggésben. További feltételként csak olyan gyógyszerek azonosítását céloztuk meg, melyek FDA/EMA (Európai Gyógyszerügynökség - European Medicines Agency EMA) engedéllyel rendelkeznek és szerepelnek valamilyen daganat kezelésének szakmai irányelveiben.

Rezisztens gyógyszer-mutáció kölcsönhatásról akkor beszélünk, ha a gyógyszer az adott eltérés jelenlétében összefüggésben áll a kedvezőtlen kimenetellel, vagy ha az adott genetikai eltérés összefüggésbe hozható az adott gyógyszerrel szembeni *de novo*, vagy szerzett rezisztencia kialakulásával, illetve, ha az adott szer az FDA/EMA ajánlásában kizárólag adott mutációt nem hordozó daganattípusok kezelésére alkalmazható.

A harmadik, "nem ajánlott" kategóriába olyan szerek kerültek, melyekre nem léteznek ajánlások szakmai irányelvekben.

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, így összességében a 33 UrC betegből 32 (97%) esetében, a 12 PBAC betegből pedig 8 (67%) esetében sikerült potenciálisan hatékony gyógyszert találnunk.

A mutációt hordozó, 32 UrC beteg esetében 20 gén 45 különböző eltérésére és 10 gén amplifikációjára összesen 154 db gyógyszert azonosított a program. Ebből 106 db célzott terápia, 37 db kemoterápia, 9 db kombinációs kezelés (célzott terápia + kemoterápia), valamint két „egyéb szer” volt. Összességében 102 db gyógyszer (66%, 102/154) (76 célzott terápia + 16 kemoterápia + 9 kombinált kezelés + 1 egyéb kezelés) kapott szenzitív besorolást, 19 szer (12%, 19/154) (8 célzott terápia + 10 kemoterápia + 1 egyéb kezelés) rezisztens jelzést, és 4 gyógyszer (3%, 4/154) (4 célzott terápia) kapott

nem ajánlott besorolást. A fennmaradó 29 kezelést (19%, 29/154) több, mint egy kategóriába is besorolta a program (11. és 12. ábra).

A 8 PBAC beteg esetében 2 gén 6 különböző eltérésére és további 5 gén amplifikációjára összesen 110 gyógyszert azonosított a program. Ebből 77 db célzott terápia, 24 db kemoterápia, 8 szer célzott és kemoterápia kombinációja, valamint egy további „egyéb szer” volt. PBAC esetében összességében 72 db szer (65%, 72/110) kapott szenzitív besorolást (54 célzott terápia + 10 kemoterápia + 8 kombinált kezelés), 9 gyógyszer (8%, 9/110) kapott rezisztens jelzést (5 célzott terápia + 3 kemoterápia + 1 egyéb kezelés), míg 5 gyógyszer (5%, 5/110) (5 célzott terápia) a nem ajánlott besorolást kapta. További 24 kezelést (22%, 24/110) a program több, mint egy kategóriába is besorolta (13. és 14. ábra).

ÁBRA 1/2 része			CÉLZOTT TERÁPIA																								
			ajánlott / nem ajánlott / rezisztens																								
			venetoclax	decitabine	duvelisib	idealisib&idelalisib/rituximab	lenalidomide/rituximab	bortezomib/rituximab	acalabrutinib	acalabrutinib/obimutuzumab	ibrutinib	obimutuzumab/venetoclax	rituximab/venetoclax	regorafenib	bevacizumab	cetuximab	panitumumab	rituximab	alemtuzumab	erlotinib	osimertinib	geffitinib	EGFR tyrosine kinase inhibitor	afatinib	crizotinib	IFNA2	lenalidomide
AA-U-T2	CCND1	AMP																									
AA-U-T4	PIK3CA	p.H1047R																									
	KRAS	p.G12V																									
BN-U-T2	TP53	p.R342*																									
	TP53	p.V73fs																									
ES-U-T16	TP53	p.R248W																									
	TP53	p.V73fs																									
ES-U-T1	TP53	p.L257fs																									
	TP53	p.R282W																									
ES-U-T12	TP53	p.V73fs																									
	CDK4	AMP																									
ES-U-T2	FGFR2	AMP																									
	MYC	AMP																									
ES-U-T3	TP53	p.G266V																									
	KRAS	p.A146T																									
ES-U-T4	TP53	p.A146T																									
	TP53	p.R248Q																									
ES-U-T8	MYC	AMP																									
	TP53	p.L344P																									
FR-U-T1	CCND1	AMP																									
	KRAS	p.G12V																									
FR-U-T3	MYC	AMP																									
	TP53	p.R282W																									
FR-U-T8	TP53	p.V73fs																									
	EGFR	AMP																									
FR-U-T5	FLT3	AMP																									
	MSH2	p.W117*																									
FR-U-T6	MET	p.Q1043*																									
	NF1	p.W1314*																									
FR-U-T9	NF1	p.W696*																									
	NF1	p.W2229*																									
FR-U-T10	PALB2	p.Q1044*																									
	PIK3RI	p.W237*																									
FR-U-T11	TP53	p.R175H																									
	TP53	p.V73fs																									
FR-U-T12	TP53	p.R175H																									
	KRAS	p.G12V																									
FR-U-T13	MYC	AMP																									
	TP53	p.R175H																									
FR-U-T14	KRAS	p.G12V																									
	MYC	AMP																									
FR-U-T15	TP53	p.R175H																									
	TP53	p.Y236D																									
FR-U-T16	KRAS	AMP																									
	KRAS	p.G12V																									
FR-U-T17	TP53	p.R248P																									
	TP53	p.V73fs																									
FR-U-T18	ERBB2	AMP																									
	CDK12	p.Q286*																									
FR-U-T19	MYC	AMP																									
	TP53	p.R175H																									
FR-U-T20	TP53	p.R342*																									
	TP53	p.V73fs																									

ÁBRA 2/2 része			CÉLZOTT TERÁPIA																							
			ajánlott / nem ajánlott / rezisztens																							
			venetoclax	decitabine	duvelisib	idealisib&idelalisib/rituximab	lenalidomide/rituximab	bortezomib/rituximab	acalabrutinib	acalabrutinib/obinutuzumab	ibrutinib	obinutuzumab/venetoclax	rituximab/venetoclax	regorafenib	bevacizumab	cetuximab	panitumumab	rituximab	alemtuzumab	erlotinib	osimertinib	gefitinib	EGFR tyrosine kinase inhibitor	afatinib	erizotinib	IFNA2
SE-U-T2	IDH1	p.R132C																								
	KRAS	p.G12D																								
VA-U-T1	TP53	p.R175H																								
VA-U-T2	TP53	p.R282W																								
VA-U-T4	FGFR3	AMP																								
	TP53	p.C275Y																								
VA-U-T5	CDK12	p.Q115*																								
	EGFR	AMP																								
VA-U-T6	TP53	p.W91fs																								
	TP53	p.Y126H																								
VA-U-T8	KRAS	p.G12V																								
	TP53	p.R282W																								
		p.V73fs																								
FR-U-T4	BRAF	p.R603Q																								
	EGFR	p.G465R																								
		p.S811F																								
	FGFR2	p.M537I																								
	MET	p.Q1011*																								
	NRAS	p.A59T																								
	PIK3CA	p.A1046V																								
TP53	p.R280T																									
	p.H168Y																									
	p.P219S																									
	p.S90F																									
	p.T230I																									
SE-U-T6	TP53	p.R273C																								
TR-U-T1	CCND1	AMP																								
UHU-U-T1	KRAS	p.G12V																								
ES-U-T13	MET	AMP																								
	TP53	p.R175H																								
HH-U-T4	TP53	p.R65fs*58																								
SE-U-T1	MET	AMP																								
	TP53	p.E294*																								
SE-U-T7	BRCA2	p.K3326*																								
	TP53	p.Lys132R																								

**11. ábra** - Az UrC-ban azonosított mutációk alapján tett célzott kezelésekkel kapcsolatos javaslatok (szenzitív – zöld jelzés) és ellenjavallatok (rezisztens – piros jelzés, nem ajánlott – narancs jelzés) a QCI terápiapredikációs program értékelése alapján, két részletben. Az ábrán kizárólag a legalább Tier 2-es evidencia szintű ajánlásokat tüntettük fel, illetve az áttekinthetőség érdekében csupán azokat a szereket, melyeket a betegek minimum 30 %-nál listázott a program.

ÁBRA 1/2 része  UrC betegek Terápiás javaslat egyéb indikációban - Tier 2 evidenci szint			KEMOTERÁPIA										KOMBINÁLT						EGYÉB					
			ajánlott / nem ajánlott / rezisztens										ajánlott						ajánlott / rezisztens					
			5-azacytidine	fludarabinephosphate	tipiracil	fluoropyrimidine	capecitabine/oxaliplatin	5-FU/irinotecan/leucovorin/oxaliplatin	cisplatin/gemcitabine	cisplatin	vinorelbine	chlorambucil	fludarabine	5-azacytidine/venetoclax	capecitabine/trastuzumab/tucatinib	CBDCA/TXT/rHuPH20/trastuzumab	CP/TXT/DOX/rHuPH20/trastuzumab	CP/DOX/TAX/rHuPH20/ trastuzumab	TXT/pertuzumab/rHuPH20/ trastuzumab	TXT/trastuzumab	5-FU/pembrolizumab/DDP/trastuzumab	TAX/rHuPH20/trastuzumab	rofecoxib	prednisolone
AA-U-T2	<i>CCND1</i>	AMP																						
	<i>PIK3CA</i>	p.H1047R																						
AA-U-T4	<i>KRAS</i>	p.G12V																						
	<i>TP53</i>	p.R342* p.V73fs																						
BN-U-T2	<i>TP53</i>	p.R248W p.V73fs																						
ES-U-T16	<i>TP53</i>	p.L257fs																						
ES-U-T1	<i>TP53</i>	p.R282W p.V73fs																						
ES-U-T12	<i>CDK4</i>	AMP																						
	<i>FGFR2</i>	AMP																						
	<i>MYC</i>	AMP																						
	<i>TP53</i>	p.G266V																						
ES-U-T2	<i>KRAS</i>	p.A146T																						
	<i>TP53</i>	p.R248Q p.V73fs																						
ES-U-T3	<i>MYC</i>	AMP																						
	<i>TP53</i>	p.L344P																						
ES-U-T4	<i>CCND1</i>	AMP																						
ES-U-T8	<i>KRAS</i>	p.G12V																						
ES-U-T8	<i>MYC</i>	AMP																						
	<i>TP53</i>	p.R282W p.V73fs																						
FR-U-T1	<i>EGFR</i>	AMP																						
	<i>FLT3</i>	AMP																						
	<i>MSH2</i>	p.W117*																						
	<i>MET</i>	p.Q1043*																						
	<i>NF1</i>	p.W1314*																						
		p.W696* p.W2229*																						
	<i>PALB2</i>	p.Q1044*																						
	<i>PIK3R1</i>	p.W237*																						
<i>TP53</i>	p.R175H																							
	p.V73fs																							
FR-U-T3	<i>TP53</i>	p.R175H																						
HH-U-T3	<i>KRAS</i>	p.G12V																						
	<i>MYC</i>	AMP																						
HH-U-T5	<i>TP53</i>	p.R175H																						
	<i>TP53</i>	p.Y236D																						
HH-U-T6	<i>KRAS</i>	AMP																						
	<i>KRAS</i>	p.G12V																						
	<i>TP53</i>	p.R248P p.V73fs																						
KR-U-T3	<i>ERBB2</i>	AMP																						
	<i>CDK12</i>	p.Q286*																						
	<i>MYC</i>	AMP																						
	<i>TP53</i>	p.R175H p.R342* p.V73fs																						

ÁBRA 2/2 része			KEMOTERÁPIA														KOMBINÁLT										EGYÉB	
			ajánlott / nem ajánlott / rezisztens														ajánlott										ajánlott / rezisztens	
			5-azacytidine	fludarabinephosphate	tipiracil	fluoropyrimidine	capecitabine/oxaliplatin	5-FU/irinotecan/leucovorin/oxaliplatin	cisplatin/gemcitabine	cisplatin	vinorelbine	chlorambucil	fludarabine	5-azacytidine/venetoclax	capecitabine/trastuzumab/tucatinib	CBDC/TXT/rHuPH20/trastuzumab	CP/TXT/DOX/rHuPH20/trastuzumab	CP/DOX/TAX/rHuPH20/trastuzumab	TXT/pertuzumab/rHuPH20/trastuzumab	TXT/trastuzumab	5-FP/pembrolizumab/DDP/trastuzumab	TAX/rHuPH20/trastuzumab	rofecoxib	prednisolone				
SE-U-T2	IDH1	p.R132C																										
	KRAS	p.G12D																										
VA-U-T1	TP53	p.R175H																										
VA-U-T2	TP53	p.R282W																										
VA-U-T4	FGFR3	AMP																										
	TP53	p.C275Y																										
VA-U-T5	CDK12	p.Q115*																										
	EGFR	AMP																										
VA-U-T6	TP53	p.W91fs																										
	TP53	p.Y126H																										
VA-U-T8	KRAS	p.G12V																										
	TP53	p.R282W p.V73fs																										
FR-U-T4	BRAF	p.R603Q																										
	EGFR	p.G465R																										
		p.S811F																										
	FGFR2	p.M537I																										
	MET	p.Q1011*																										
	NRAS	p.A59T																										
	PIK3CA	p.A1046V																										
TP53	p.R280T																											
	p.H168Y																											
	p.P219S																											
	p.S90F																											
	p.T230I																											
SE-U-T6	TP53	p.R273C																										
TR-U-T1	CCND1	AMP																										
UHU-U-T1	KRAS	p.G12V																										
ES-U-T13	MET	AMP																										
	TP53	p.R175H																										
HH-U-T4	TP53	p.R65fs*58																										
SE-U-T1	MET	AMP																										
	TP53	p.E294*																										
SE-U-T7	BRCA2	p.K3326*																										
	TP53	p.K132R																										

12. ábra - Az UrC-k mutációs mintázata alapján kialakított kemoterápiás, kombinációs és „egyéb” kezelések alkalmazásával kapcsolatos javaslatok (szenzitív – zöld jelzés) és ellenjavallatok (rezisztens – piros jelzés, nem ajánlott – narancs jelzés) a QCI terápiapredikációs szoftver alapján. Az ábrán kizárólag a legalább Tier 2-es evidencia szintű ajánlásokat tüntettük fel, illetve terjedelmi okok miatt a kemoterápiás kezelések csoportjában kizárólag azokat a szereket, melyeket a betegek legalább 25%-nál listázott a program. Rövidítések: 5-FU: 5-fluorouracil, CAPE: capecitabin, TXT: docetaxel, rHuPH20: rekombináns humán hialuronidáz, DOX: doxorubicin, TAX: paclitaxel, 5-FP: fluoropirimidin DDP: platina.



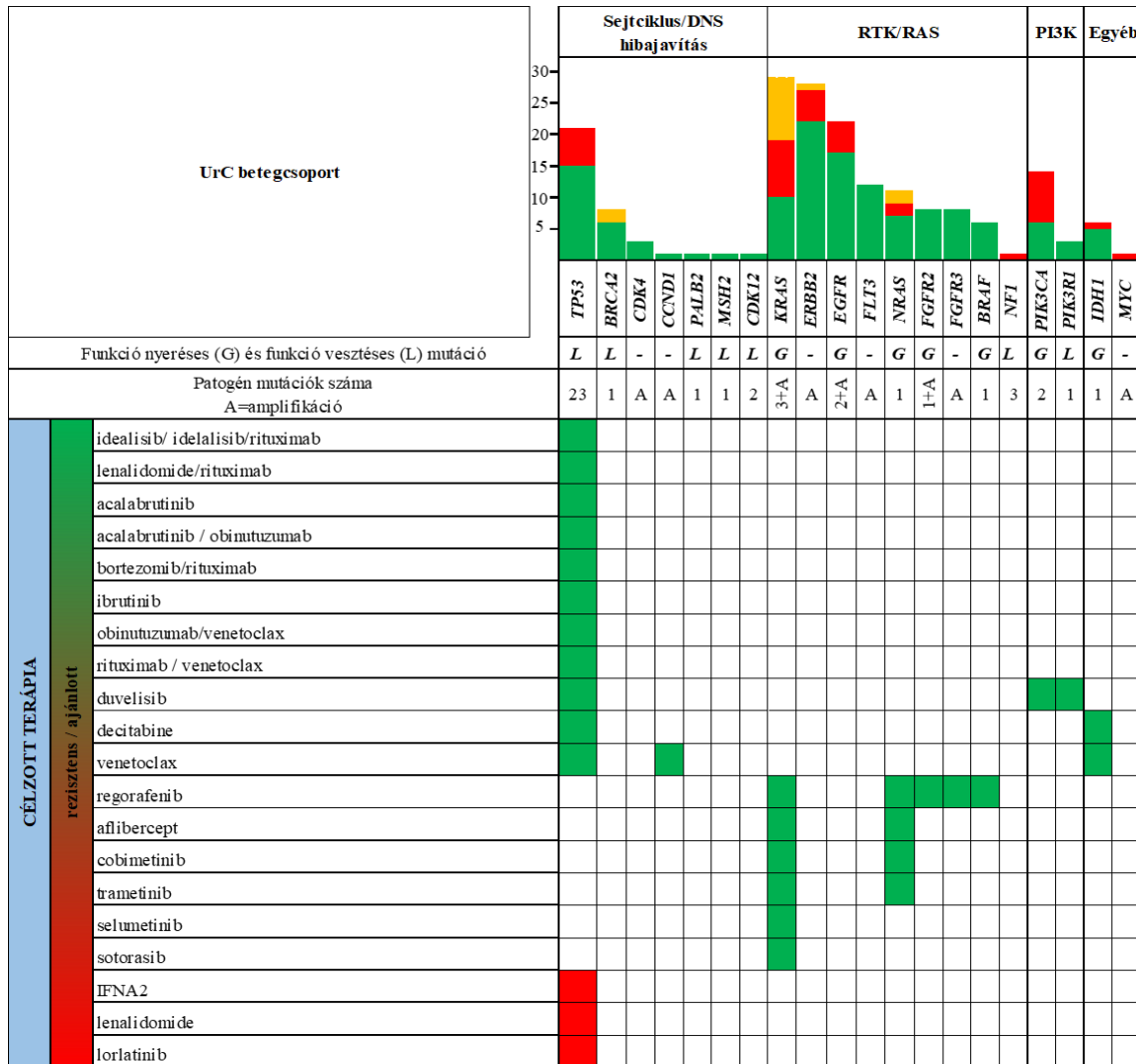
PBAC betegek Terápiás javaslat egyéb indikációban - Tier 2 evidencia szint	ES-P-T5				PAT-P-T5		ES-P-T2		PAT-P-T2		PAT-P-T3		PAT-P-T4		UHU-P-T6		UHU-P-T8	
	ERBB2	FLT3	MYC	TP53	EGFR	MYC	TP53	KRAS	KRAS	TP53	MYC	TP53	CDK4	FLT3	KRAS	TP53		
	AMP	AMP	AMP	p.R209fs*6	AMP	AMP	p.E285K	p.G12V	p.G12V	p.R248W	AMP	p.V272M	AMP	AMP	p.G12V	p.P27fs*17		
acalabrutinib																		
acalabrutinib/obinutuzumab																		
alemtuzumab																		
bortezomib/rituximab																		
decitabine																		
duvelisib																		
ibrutinib																		
idealisib&idelalisib/rituximab																		
lenalidomide/rituximab																		
obinutuzumab/venetoclax																		
rituximab/venetoclax																		
venetoclax																		
aflibercept																		
cobimetinib																		
regorafenib																		
selumetinib																		
sotorasib																		
trametinib																		
brigatinib																		
bosutinib																		
cabozantinib																		
dacomitinib																		
fedratinib																		
gilteritinib																		
lapatinib																		
midostaurin																		
neratinib																		
nintedanib																		
pexidartinib																		
ponatinib																		
pralsetinib																		
quizartinib																		
sorafenib																		
sunitinib																		
atezolizumab																		
bevacizumab																		
ramucirumab																		
atezolizumab/bevacizumab																		
cemiplimab																		
ipilimumab/nivolumab																		
nivolumab																		
pembrolisumab																		
panitumumab																		
cetuximab																		
rituximab																		
afatinib																		
erlotinib																		
osimertinib																		
EGFR tyrosine kinase inhibitor																		
gefitinib																		
tamoxifen																		
crizotinib																		
IFNA2																		
lenalidomide																		
lorlatinib																		

13. ábra - Célzott terápiás kezelések alkalmazásának javaslata (szenzitív – zöld jelzés) és ellenjavaslata (rezisztens – piros jelzés, nem ajánlott – narancs jelzés) PBAC betegek esetében a QCI terápiapredikciós szoftver eredményei alapján. Az ábrán kizárólag a Tier 2-es evidencia szintű ajánlásokat tüntettük fel, illetve azokat a szereket, melyeket a betegek legalább 25%-nál listázott a program.

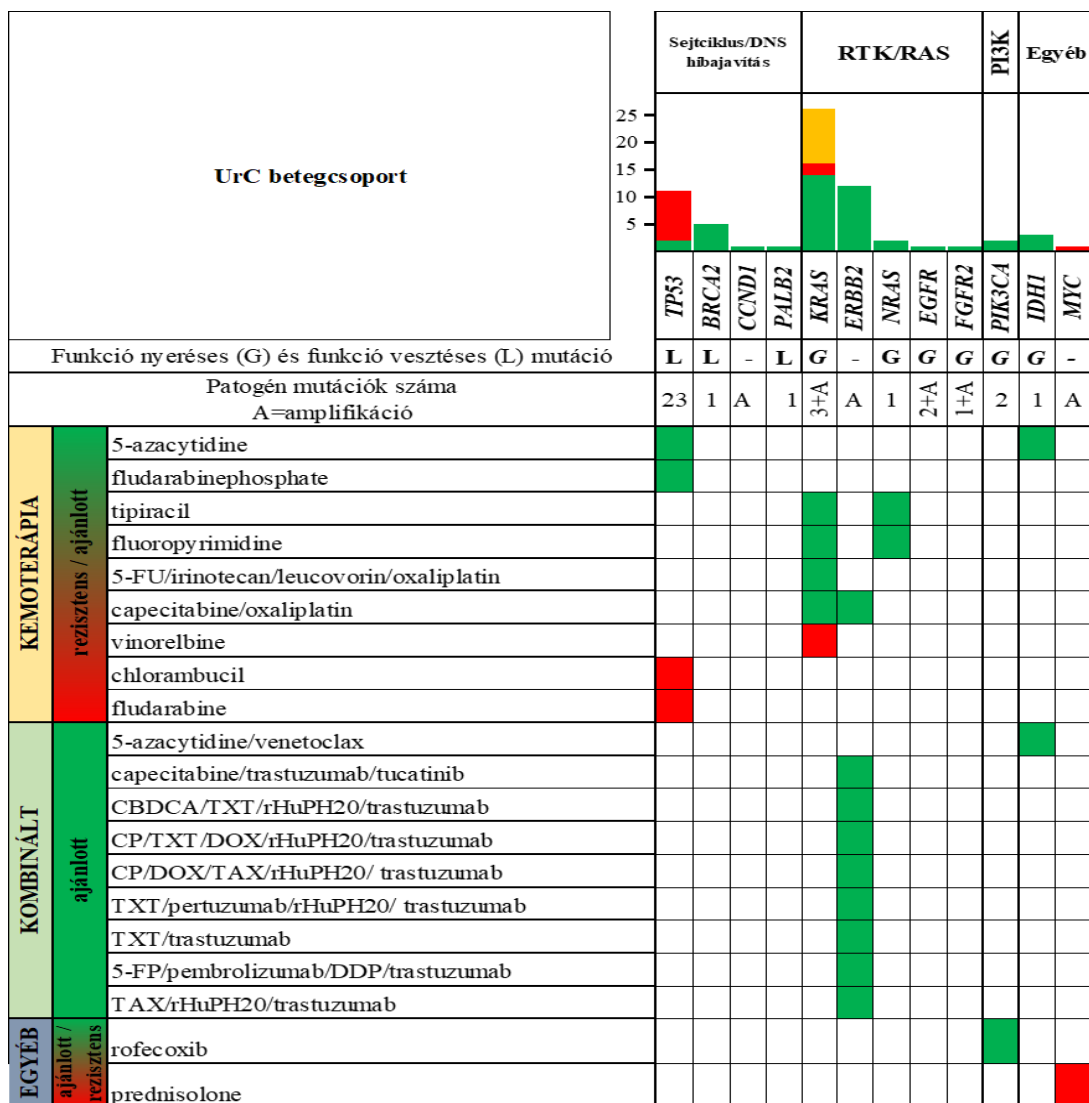
		PBAC betegek Terápiás javaslat egyéb indikációban - Tier 2 evidencia szint																	
		ES-P-T5		PAT-P-T5			ES-P-T12		PAT-P-T2		PAT-P-T3		PAT-P-T4		UHU-P-T6		UHU-P-T8		
		ERBB2	FLT3	MYC	TP53	EGFR	MYC	TP53	KRAS	KRAS	TP53	MYC	TP53	CDK4	FLT3	KRAS	TP53		
		AMP	AMP	AMP	p.R209fs*6	AMP	AMP	p.E285K	p.G12V	p.G12V	p.R248W	AMP	p.V272M	AMP	AMP	p.G12V	p.P27fs*17		
<b>KEMOTERÁPIA</b> rezisztens / nem ajánlott / ajánlott	5-azacytidine																		
	fludarabinephosphate																		
	capecitabine/oxaliplatin																		
	5-FU/irinotecan/leucovorin/oxaliplatin																		
	fluoropyrimidine																		
	tipiracil																		
	anthracycline																		
	capecitabine																		
	cyclophosphamide/doxorubicin																		
	cyclophosphamide/epirubicin																		
	carboplatin/gemcitabine																		
	carboplatin/paclitaxel																		
	cisplatin/gemcitabine																		
	cisplatin/docetaxel																		
	cisplatin/paclitaxel																		
	cisplatin/pemetrexed																		
	docetaxel																		
	gemcitabine																		
	paclitaxel																		
	pemetrexed																		
	cisplatin																		
	vinorelbine																		
	chlorambucil																		
	fludarabine																		
	<b>KOMBINÁLT KEZELÉS</b> ajánlott	CAPE/trastuzumab/tucatinib																	
		CBDCA/TXT/rHuPH20/trastuzumab																	
CP/TXT/DOX/ rHuPH20/ trastuzumab																			
CP/DOX/TAX/rHuPH20/trastuzumab																			
TXT/pertuzumab/rHuPH20/trastuzumab																			
TXT/trastuzumab																			
5-FP/pembrolizumab/DDP/trastuzumab																			
TAX/rHuPH20/trastuzumab																			
<b>EGYÉB</b> rez.	prednisolone																		

**14. ábra** - Kemoterápiás szerek, illetve kombinált-, és egyéb kezelések alkalmazásának javaslata (szenzitív – zöld jelzés) és ellenjavaslata (rezisztens – piros jelzés, nem ajánlott – narancs jelzés) PBAC betegek esetében a QCI terápiapredikációs program eredményei alapján. Az ábrán kizárólag a Tier 2-es evidencia szintű ajánlásokat tüntettük fel. Rövidítések: 5-FU: 5-fluorouracil, CAPE: capecitabine, CBDCA: karboplatin, TXT: docetaxel, rHuPH20: rekombináns humán hialuronidáz, CP: ciklofoszfamid DOX: doxorubicin, TAX: paclitaxel, 5-FP: fluoropirimidin DDP: platina.

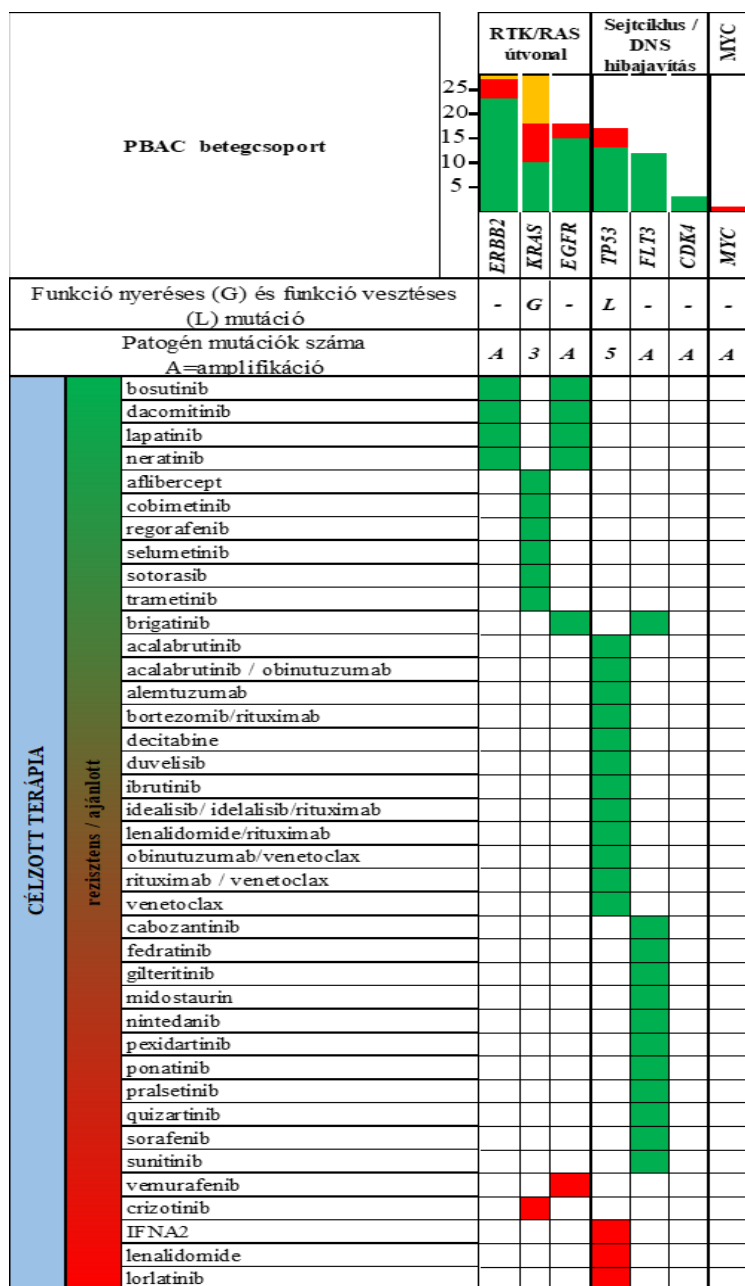
Az érintett géneket funkciójuk szerint szignálútvonalakba is beosztottuk, így jól láthatóvá vált, hogy az egyes útvonalak érintettsége esetén milyen szerek alkalmazhatók (15.-18. ábra). Ennek eredményeként azt tapasztaltuk, hogy mind az UrC, mind pedig a PBAC csoporton belül a RTK/RAS útvonal eltéréseire kaptuk a legtöbb terápiás javaslatot (15-18. ábra).



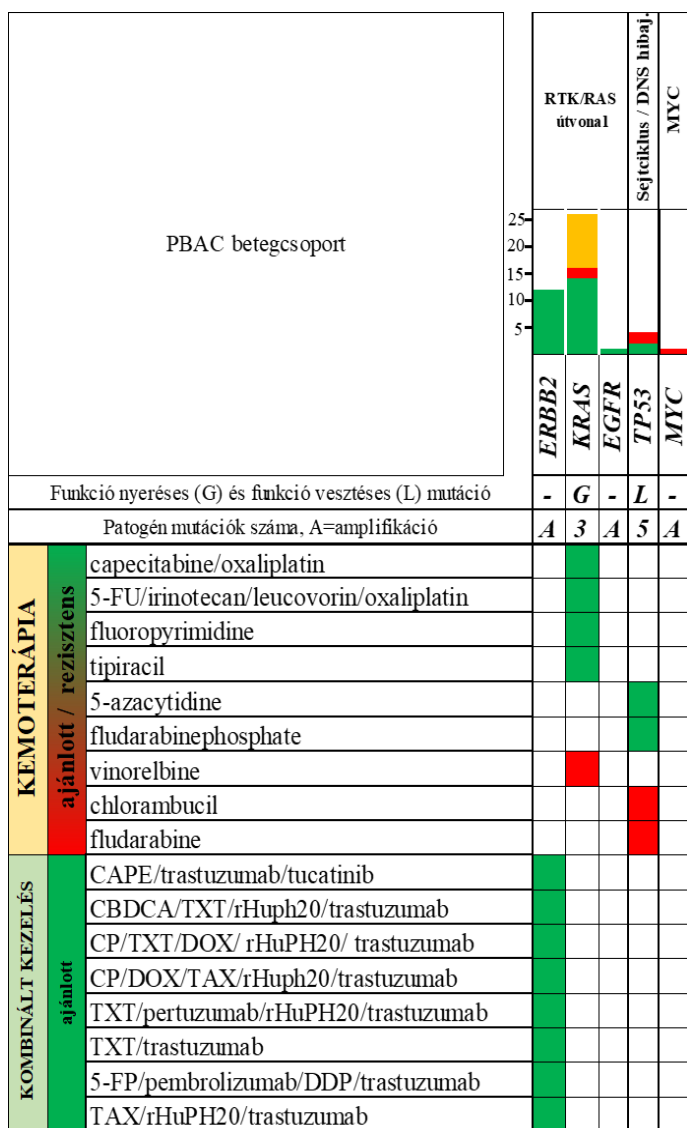
**15. ábra** - UrC betegek esetében javallott és ellenjavallott célzott terápiás szerek útvonalankénti bontásban. Az ábra felső részén, az oszlop diagrammokon az összes ajánlott (zöld), nem ajánlott (narancssárga) és rezisztens (piros) szerek eloszlása látható, mely az adott gén mutációihoz köthető. Feltüntettük 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 20%-nál megjelentek.



16. ábra - UrC betegek esetében javallott és ellenjavallott kemoterápiás szerek, kombinált terápiai, illetve egyéb szerek útvonalankénti bontásban. Az ábra felső részén, az oszlop diagrammokon az összes ajánlott (zöld), nem ajánlott (narancssárga) és rezisztens (piros) szerek eloszlása látható, mely az adott gén mutációihoz köthető. Feltüntettük továbbá, hogy az adott mutáció funkcionyerést (G - gain) vagy funkcióvesztést (L - loss) okoz a fehérjében, illetve, hogy az adott génben milyen és mennyi eltérést találtunk, amelyre volt terápiai javaslat. Az ábra plot részén, a kemoterápiás szerek csoportjában csupán azokat az ajánlott és rezisztens szereket tüntettük fel, melyek a betegek legalább 20%-nál megjelentek. Rövidítések: 5-FU: 5-fluorouracil, CBDCA: karboplatin, TXT: docetaxel, rHuPH20= rekombináns humán hialuronidáz, CP: ciklofoszfamid, DOX: doxorubicin, TAX: paclitaxel, 5-FP: fluoropirimidin, DDP: platina.



17. ábra - PBAC betegek esetében javallott és ellenjavallott célzott terápiás szerek, útvonalaankénti bontásban. Az ábra felső részén, az oszlop diagrammokon az összes ajánlott (zöld), nem ajánlott (narancssárga) és rezisztens (piros) szerek eloszlása látható, mely az adott gén mutációihoz köthető. Feltüntettük továbbá, hogy az adott mutáció funkciónyerést (G – gain) vagy funkcióvesztést (L – loss) okoz-e a fehérjében, illetve, hogy az adott génben milyen és mennyi eltérést találtunk, amelyre volt terápiás javaslat. Az ábrán, az ajánlott szereknél csupán azokat tüntettük fel, melyek a betegek legalább 20%-nál megjelentek, illetve az összes ellenjavallott szert.

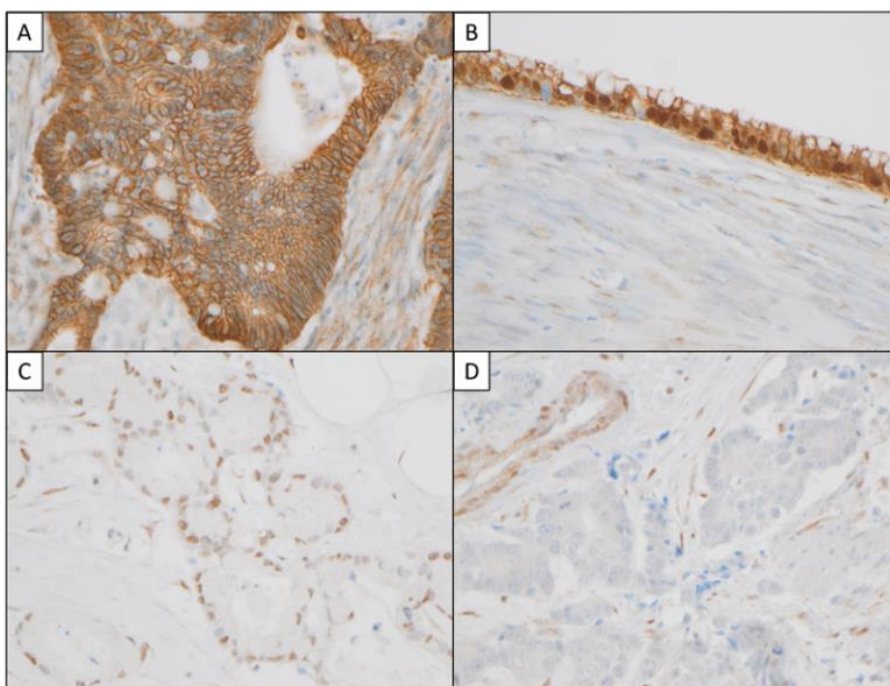


**18. ábra** – PBAC betegek esetében javasolt és ellenjavallott kemoterápiás szerek, kombinált terápiai, illetve egyéb szerek útvonalankénti bontásban. Az ábra felső részén, az oszlop diagrammokon az összes ajánlott (zöld), nem ajánlott (narancssárga) és rezisztens szerek eloszlása látható, mely az adott gén mutációihoz köthető. Feltüntettük továbbá, hogy az adott mutáció funkciónyerést (gain) vagy funkcióvesztést (loss) okoz-e a fehérjében, illetve, hogy az adott génben milyen és mennyi eltérést találtunk, amelyre volt terápiai javaslat. Az ábra plot részén, a kemoterápiás szerek csoportjában csupán az ajánlott és rezisztens szereket tüntettük fel, melyek a betegek legalább 20%-nál megjelentek. Rövidítések: 5-FU: 5-fluorouracil, CAPE: capecitabin, CBDCA: karboplatin, TXT: docetaxel, rHuPH20: rekombináns humán hialuronidáz, CP: ciklofoszfamid DOX: doxorubicin, TAX: paclitaxel, 5-FP: fluoropirimidin.

#### 4.4 Fehérje szintű molekuláris vizsgálatok eredményei

##### 4.4.1 A $\beta$ -catenin és a PTEN fehérjék IHC vizsgálatának eredményei

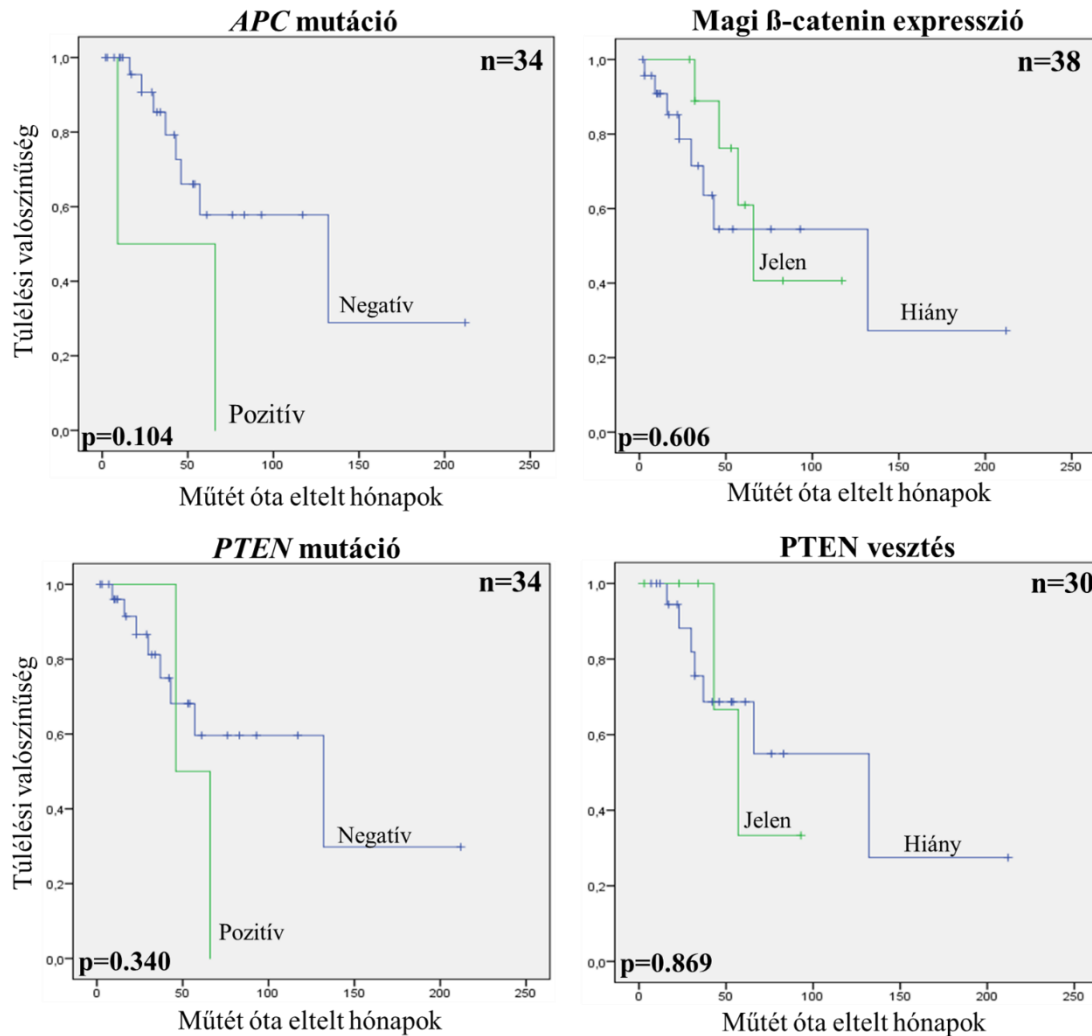
Összesen 38 UrC esetében végeztük el a  $\beta$ -catenin IHC vizsgálatát, amelyből az esetek 97%-ában (37/38) detektáltunk  $\beta$ -catenin expressziót: 26 esetben (70%) citoplazmatikus expressziót, 11 esetben (30%) pedig citoplazmatikus és magi expressziót egyaránt. A csonkoló *APC* mutációt szenvedett két minta közül az egyik esetében (p.Y1075\*; c.3225T>G) magi  $\beta$ -catenin expresszió volt megfigyelhető. A PTEN fehérje hiánya az esetek 20%-ában (6/30) volt megfigyelhető (9. ábra, 19. ábra).



**19. ábra** - A) Erős membrán és citoplazmatikus  $\beta$ -catenin festődés egy intesztinális típusú UrC esetében. B) Egy mucinózus UrC erős citoplazmatikus  $\beta$ -catenin festődést mutatott majdnem minden tumorsejt magjában. C) Egy NOS típusú UrC esetén megfigyelhető PTEN expresszió, míg egy másik esetében D) PTEN hiány állapítható meg. A-200x, B-D-400x. NOS: not otherwise specified – nem specifikus.

Sem az *APC*, sem pedig a *PTEN* mutációk nem mutattak összefüggést a teljes túléléssel (p=0,104 és p=0,340) (20. ábra A és C), mindamellet ezek az eredményeket körültekintéssel szabad csak interpretálni, hiszen csupán 2 minta esetében detektáltunk *APC* és *PTEN* mutációt (7. ábra).

A nukleáris  $\beta$ -catenin jelenlét (20. B ábra), valamint a PTEN fehérje elvesztése (20. D ábra) szintén nem mutatott összefüggést a betegek teljes túlélésével ( $p=0.606$  és  $p=0.869$ ).

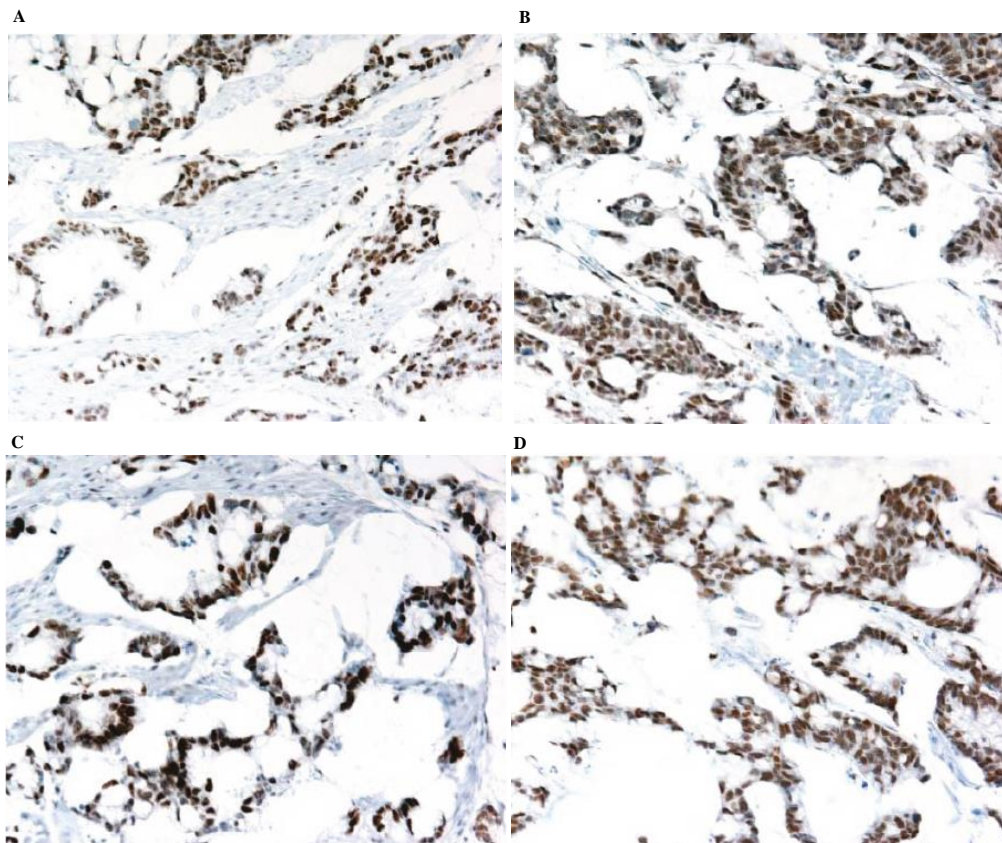


**20. ábra** - Kaplan-Meier elemzés az A) *APC* és C) *PTEN* mutációk, valamint B) a  $\beta$ -catenin magi felhalmozódásának, és D) *PTEN* fehérje elvesztésnek teljes túléléssel való összefüggésének vizsgálatára.

#### 4.4.2 Az MMR fehérjék IHC vizsgálatának eredménye PBAC mintákban

Összesen 19 PBAC szövetmintában vizsgáltuk a MMR fehérjék jelenlétét. Az IHC festés egy esetben sikertelen volt, egy esetben nem tudtuk kimutatni az MSH2 fehérjét (MSI: 6%, 1/18), míg az esetek többségében, összesen 17 esetben mind a négy MMR fehérje kimutatható volt (94%, 17/18) (21. ábra).





**21. ábra** - MMR fehérjék IHC festésének egyik olyan esete, melyben minden fehérje kimutatható (MSS eset) A) MLH1, B) PMS2, C) MSH2, D) MSH6.

#### **4.4.3 A MMR fehérjék IHC vizsgálatának eredménye UrC mintákban**

Összesen 61 UrC szövetmintán tudtuk elvégezni az MMR fehérjék IHC vizsgálatát. Egy esetben az MSH2 fehérje elvesztését detektáltuk, míg a további 60 mintában mind a négy MMR fehérje kimutatható volt. A DNS szintű MSI-analízis 56 minta esetében volt elérhető.

## 5. Megbeszélés

Munkánk során célul tűztük ki egy világviszonylatban is egyedülálló méretű UrC és PBAC adat-, és szövetbank létrehozását, melyet egy nemzetközi kooperáció életrehívásával, valamint egy hazai, a Nemzeti Rákregiszteren alapuló országos gyűjtés segítségével valósítottunk meg. További célunk volt e két ritka tumorentitás molekuláris szintű vizsgálata, mely egyrészt DNS szinten NGS technika alkalmazásával valósult meg egy 161 és egy 6 gént vizsgáló panel segítségével, másrészt fehérje szinten a mismatch hibajavító (MMR) fehérjék, valamint a PTEN és  $\beta$ -catenin fehérjék IHC vizsgálatával. A vizsgált UrC és PBAC minták DNS szintű eltéréseihez klinikai annotációs szoftver alkalmazásával potenciálisan hatékony gyógyszereket rendeltünk, ezáltal képet kaptunk arról, hogy mely célzott, illetve mely kemoterápiás szerek lehetnek hatékonyak ezen ritka daganatok kezelésében. Eredményeinket a rendelkezésre álló irodalmi adatokkal összevetve vontuk le következtetéseinket.

A rákregiszter alapú tanulmányok értékes eszközt jelentenek a ritka daganatos megbetegedések földrajzi előfordulásának megfigyelésében, és ezzel akár a betegség patofiziológiájának jobb megértéséhez is vezethetnek. Alapvető feladatuk, hogy az epidemiológia adatszolgáltatáson túl elősegítsék az onkológiai hálózat tervezését, fejlesztését, továbbá, hogy támogassák a tudományos kutatásokat és prevenció programokat.

Ritka előfordulásuknak köszönhetően, mind az UrC, mind a PBAC epidemiológiája kapcsán is csupán néhány publikált tanulmány érhető el. UrC esetében hat populáció-alapú, epidemiológiai tanulmány lelhető fel az irodalomban (19, 88-92), míg PBAC esetében a legjobb tudomásunk szerint csupán kettő, nemzeti rákregiszteren alapuló tanulmányt publikáltak ezidáig (93, 94).

Az UrC és PBAC kapcsán a magyarországi adatok feldolgozása és egy országos esetazonosítás céljából egy NR-alapú keresést hajtottunk végre. A BNO és morfológiai kódokkal történő keresésünk 15 éves periódusban vizsgálódva összesen 1012 olyan beteget azonosított, akik esetében felmerülhet az UrC vagy a PBAC diagnózis. Ebből az 1012 esetből 665 beteg esetében sikerült a kezelőintézetek közreműködésével a diagnózist egyeztetni, amely végül 9 UrC és 25 PBAC eset azonosításához vezetett. Ezek alapján a hozzávetőlegesen számolható előfordulási gyakoriság hazánkban 0,0061 / 100.000 fő / év, mely alacsonyabb, mint az elérhető, hasonló regiszterek alapján becsült

európai és észak-amerikai előfordulási gyakoriságok, melyek jellemzően 0,02-0,04-es értékek között mozognak (0,0143 (Ontario, Kanada), 0,0359 (Németország). A legmagasabb előfordulási arányt eddig Japánból jelentették, ahol a hozzávetőleges előfordulási gyakoriság 0,0596-nak adódott (19, 88-92, 95, 96,).

PBAC esetén az egyetlen európai tanulmány, amely Hollandiából származik, egy 11 éves keresési periódus alatt összesen 349 PBAC esetet azonosított, melyből a becsült előfordulási gyakoriság 0,2023 / 100.000 fő / év (93). A magyarországi esetazonosítás alapján becsült előfordulási gyakoriság PBAC esetén pedig 0,0168 /100.000 fő / év.

A fenti összehasonlítások ellenére nem valószínű, hogy a tényleges magyarországi UrC / PBAC előfordulás lényegesen alacsonyabb lenne. A hazai, látszólag ritkább előfordulás valószínűleg inkább a hazai regiszterbe történő adatjelentés pontatlanságaival, mint az UrC / PBAC valóban ritkább előfordulásával magyarázható.

A három keresési kód közül a C67.1 (hólyagkupola daganata), bár gyakori lokalizációja az urachális eredetű tumoroknak, mégsem specifikus. Ezért ezzel a keresőkulccsal nem feltétlenül vártuk, hogy az intézmények UrC vagy PBAC diagnózist fognak megerősíteni. A C67/81403 azaz hólyagdaganat és adenocarcinoma egy betegen belüli előfordulására alkalmazott keresőkulcs sem feltétlenül hólyag adenocarcinomat talál, hiszen a két esemény előfordulhat egyszerre egy betegen, de két eltérő lokalizációban is. Például a cisztekтомia során etlávólított prosztatata hisztológiai vizsgálata során nem ritkán fedeznek fel ún. incidentális prosztatadaganatot, mely szövettanát tekintve adenocarcinoma. Ilyen esetekben előfordulhat, hogy a keresési kulcsunk helyes kódolás mellett is kiválasztotta a számunkra nem releváns esetet. Ez is közrejátszhatott abban, hogy az ezzel a kulccsal azonosított betegeknek az intézményi adategyeztetés után mindössze 6%-a (30/494) bizonyult UrC vagy PBAC-nak. Bár a C67.7 kód kifejezetten az UrC daganatok kódolását szolgálja, az így azonosított 19 betegből a diagnózis felülvizsgálata, mely 13 beteg esetében valósult meg, végül 2 beteg esetében igazolta valóban UrC jelenlétét (15%).

A diagnózisegyeztetés követően azonosított UrC/PBAC esetek kódonkénti aránya: UrC kóddal (C67.7) 2 UrC eset (15%, 2/13), húgyhólyagtumor és ADC kóddal (C67/81403) 30 UrC/PBAC eset (6%, 30/494), míg kupola kóddal (C67.1) 2 UrC/PBAC eset (1%, 2/158). Az összesen azonosított 9 UrC közül a legtöbbet, 6 esetet a C67/81403

keresőkulccsal találtuk meg, míg az UrC (C67.7) keresőkulcs 2, a kupola (C67.1) keresőkulcs 1 UrC-t azonosított.

A Nemzeti Rákregiszter az egész ország területéről gyűjt adatokat, ám az adatbevitel minősége intézményenként igen heterogén képet fest. Az egyik leggyakoribb hibaforrás a rosszindulatú daganatos diagnózis túl korai alkalmazása. Ez akkor fordulhat elő, amikor a kódolás már a daganat gyanújának felmerülésekor, de még a végső diagnózis felállítása előtt megtörténik. Emellett gyakori a BNO nem kellő mértékű ismerete miatti téves kódolás, amikor egy nem tumoros betegnél is daganatos kódot alkalmaznak vagy esetenként nem a megfelelő kódot használják az adott tumortípus leírásánál. További hibaforrást jelent, ha az adott kórház informatikai rendszere elavult kódtárakból dolgozik. A hibák csökkentése érdekében a Nemzeti Rákregiszter adatbázisának kezelői minden adatszolgáltatónak visszaküldik az általuk közölt adatokat azt kérve, hogy még egyszer ellenőrizzék a kódolás minőségét. Vagyis (1) a téves BNO-kóddal szereplő daganatok adatait javítsák ki, és ha ez korábban nem történt meg, rendeljék hozzá a morfológiai kódot is, (2) töröljék azokat a betegeket, akiknek a daganata utólag nem bizonyult rosszindulatúnak, (3) pótlólag írják be azokat a rosszindulatú daganatokat, amelyek valamilyen okból a listában eddig nem szerepeltek (97, 98).

Összességében, a Nemzeti Rákregiszterbe a fenti, tiszteletre méltó erőfeszítések ellenére is sok, a kódolás és klinikai dokumentáció minőségére visszavezethető hiba kerül. Ezen korlátozó tényezők ellenére a ritka daganatos esetek összegyűjtésére a NR sikerrel alkalmazható.

Munkánk során a hazai és nemzetközi gyűjtés eredményeképpen összesen 68 UrC és 42 PBAC esetet sikerült összegyűjtenünk, mely jelenleg világviszonylatban is a legnagyobbak közé tartozik.

Az UrC és a CRC közötti szövettani hasonlóságok jó okot adnak arra, hogy az UrC molekuláris eltéréseit összevessük a CRC-ban talált eltérésekkel. Habár az UrC és CRC különböző daganattípusok, jelentős szövettani és klinikai hasonlóságot mutatnak. Hasonlóságuk az immunfenotípusukban is megnyilvánul: gyakori a CK7 és CEA pozitivitás, illetve a GATA3 expresszió hiánya (5). A CRC és UrC közötti hasonlóság genetikai szinten is megmutatkozik. Hasonló mutációs mintázat és gyakoriság rajzolódik ki néhány gén tipikus exonikus régiójában, mint például a *TP53*, *KRAS*, *SMAD4* és *NRAS* (27, 28, 34, 37-48, 99).

Jól ismert tény, hogy az *APC* tumorszupresszor gén funkcióvesztő mutációjának kulcsfontosságú szerepe van a CRC kialakulásában. Az *APC* fehérje legfontosabb feladata, hogy a  $\beta$ -catenin fehérjével interakcióba lépve elősegítse annak degradációját, és ezáltal szabályozza a cadherin-mediált sejt-sejt adhéziót. Az *APC* funkciójának elvesztése a  $\beta$ -catenin abnormális felhalmozódásához és magi transzlokációjához, ezáltal a Wnt útvonal aktiválódásához vezet. A Wnt útvonal szabályozatlan aktiválódása kulcsfontosságú szerepet tölt be a tumorgenezisben, befolyással bír számos sejtszintű folyamatra úgy, mint sejt migráció, adhézió, kromoszóma szegregáció, mely folyamatok mind elősegítik a tumor kialakulását és fejlődését (100).

Singh és munkatársai teljes exom szekvenálási eljárást alkalmazva a vizsgált UrC minták 43%-ban (3/7) detektáltak *APC* mutációt (38). Collazo-Lorduy és kutatócsoportja csonkoló *APC* mutációkat írtak le (p.R1450\*, p.R554\*) a vizsgált UrC minták 22%-ban (2/9) célzott exom szekvenálási eljárást alkalmazva (27). További UrC kutatásokban hasonló arányban találtak *APC* mutációkat (18%, 3/17) (47). A legújabb vizsgálatban, Kardos és munkatársai célzott panelszekvenálást végeztek 12 UrC mintán, mely során a minták 25%-ában (3/12) detektáltak *APC* mutációt (34).

Vizsgálatunkban 34 UrC mintát vizsgáltunk, melyből 2 minta esetében detektáltunk eltérést az *APC* tumorszupresszor génben. Mindkét nonszensz mutáció csonkolt, diszfunkcionális *APC* fehérjét eredményez. A patogén *APC* mutációt hordozó UrC betegek rövidebb túlélést mutattak, ám ezt a megállapítást az alacsony *APC* pozitív esetszám miatt kellő fenntartással kell kezelni (101). Az összes eddig publikált *APC* szekvenálást alapul véve 141 UrC mintából 14 esetben (10%) detektáltak *APC* eltérést (27, 28, 34, 37-45, 47, 48, 102). Ez arányaiban egyértelműen jóval elmarad a CRC-ban több független tanulmányban is megállapított mintegy 80% körüli *APC* mutációs rátától (99). Ezen megállapítások tehát karakterisztikus különbséget jelentenek a CRC és UrC molekuláris taxonómiájában és arra utalnak, hogy a két tumorféleség között szövettani és genetikai szinten is fenálló jelentős hasonlóság mellett például az *APC* gén esetében jelentős eltérések is kimutathatók, ami az UrC önálló entitáskénti felfogását indokolja. Összeségében tehát eredményeink arra utalnak, hogy a Wnt útvonal érintettsége az UrC patogenezisében a CRC-hoz képest kevésbé hangsúlyos.

A  $\beta$ -catenin vizsgálata jól alkalmazható diagnosztikus és prognosztikus biomarker CRC esetében. Fiziológiás esetben a  $\beta$ -catenin a sejt membránjában / citoplazmájában

helyezkedik el és szerepet játszik a cadherin mediált sejt-sejt adhézió és a génátírás szabályozásában. Magi  $\beta$ -catenin expressziót CRC esetén figyelhetünk meg (103). Wong és munkatársai pozitív  $\beta$ -catenin magi festődést detektáltak a vizsgált CRC minták túlnyomó többségében, mely alátámasztja a magas *APC* mutációs rátát CRC-ban (102).

Egy nemrégiben megjelent tanulmányban, melyben az UrC immunhisztokémiai sajátosságainak irodalmi áttekintését végeztük el a közölt 63 UrC esetből csak 9-ben (14%) találtunk magi  $\beta$ -catenin expressziót (5). Jelen vizsgálatainkban ennél valamivel magasabb arányban (29%, 11/38) detektáltunk pozitív magi  $\beta$ -catenin immunfestődést. Ugyanakkor a magi  $\beta$ -catenin expresszió nem állt szignifikáns összefüggésben a betegek túlélésével. Érdekes módon, a két pozitív magi  $\beta$ -catenin expressziót mutató UrC mintából csak egy esetében detektáltunk csonkoló *APC* mutációt (101). A  $\beta$ -catenin magi felhalmozódásának potenciális genetikai mechanizmusával kapcsolatban Alomar és kutatócsoportja a *CTNGB1* ( $\beta$ -catenin) gén 3-as exonjában azonosítottak egy aktiváló mutációt, mely aminosav cserét eredményez a glikogén szintáz kináz-3 (GSK-3 $\beta$ ) fehérje foszforilációs helyén. Megállapították, hogy a foszforiláció hiányában csökken az *APC*  $\beta$ -catenin kötése (104). Ez magyarázatot adhat az általunk tapasztaltakra, miszerint alacsony *APC* mutációs gyakorisághoz képest (10%) meglepően magas számban (29%, 11/38) detektáltunk pozitív magi  $\beta$ -catenin aktivitást.

A tumorszupresszor *PTEN* a PIK3 jelátviteli útvonal negatív regulátora. *PTEN* mutációk szórványosan előfordulnak CRC-ban és potenciális prediktoraként tartják számon az EGFR és MAPK inhibitor kezeléseknek (99).

Az irodalomban négy, teljes exom szekvenáláson alapuló tanulmányt találtunk, melyek összesen 20 UrC-s beteg adatait tartalmazzák. Egyik tanulmány sem számolt be *PTEN* mutációról (20, 38, 43, 47). Ezeken felül három további publikációt találtunk, melyben célzottan vizsgálták a *PTEN* gént, összesen 52 UrC-s mintán. Az esetek 8%-ában (4/52) detektáltak *PTEN* gén defektust (39, 48, 49). Tehát összesen 72 esetből 4 esetben írták le a gén mutációit (6%).

Ezzel összhangban, vizsgálataink során a két szekvenálási platformon összesen 44 betegmintát vizsgáltunk, melyből 3 esetben detektáltunk *PTEN* eltérést (7%), mely az irodalmi adatokkal együttvéve is azt sugallja, hogy UrC-ban ritkán fordul elő *PTEN* mutáció, hasonlóan a CRC-ben talált alacsony előfordulási gyakorisághoz (4%) (99, 101).

Perrone és munkatársai kimutatták, hogy a PTEN fehérje inaktivációja az anti-EGFR terápiával szembeni rezisztencia kialakulásáért felelős (105). A PTEN fehérje hiánya a CRC beteg körülbelül 40%-ában detektálható, ami egyértelműen magasabb a gén defektusához képest, ami arra utal, hogy a *PTEN* gyakran epigenetikai szinten regulálódik. Ezt erősíti az a megfigyelés is, miszerint a *PTEN* gén hipermetilációja szignifikánsan összefügg a PTEN fehérje csökkent expressziójával (106). A genomi szintű eredményekhez hasonlóan Frattini és munkatársai kimutatták, hogy a PTEN fehérje elvesztése összefüggésben áll a cetuximab kezelés hatástalanságával (107).

Tudomásunk szerint, UrC-ban eddig nem álltak rendelkezésre adatok a PTEN fehérje expressziójára vonatkozóan. Jelen vizsgálatainkban 30 UrC beteg mintáin végeztünk PTEN IHC vizsgálatot, mely a vizsgált minták 20%-ában (6/30) mutatta ki a PTEN fehérje vesztést. Ez némiképp alacsonyabb, a CRC-ban leírt 30-40%-hoz képest (saját 101, 106, 108, 109). Az alacsonyabb arányban előforduló *PTEN* mutációkhoz képest a magasabb gyakoriságú PTEN expresszióvesztés arra utal, hogy UrC-ban a *PTEN* túlnyomórészt epigenetikus downreguláció által csendesül (106). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a PTEN elvesztését célszerűbb immunhisztokémiai módszerrel vizsgálni, melynek fontos szerepe lehet egy esetlegesen alkalmazott anti-EGFR terápia hatásosságának előrejelzésében. Az anti-EGFR terápiával kapcsolatban fontos még kiemelni a *KRAS* aktiváló mutációk szerepét, hiszen ezek az UrC esetek mintegy 30%-ban jelen vannak és jelenlétük negatív módon befolyásolja a daganat anti-EGFR terápiára adott válaszát (27, 28, 34, 37-45, 47, 48, 102).

Mivel sem az UrC, sem pedig a PBAC szisztémás kezelésével kapcsolatban nem állnak rendelkezésünkre prospektív vizsgálatokból származó klinikai bizonyítékok, ezért e két daganatféleség előrehaladott stádiumú eseteinek kezelése bizonytalan. Ebben a helyzetben a daganatok molekuláris sajátosságaira tervezett célzott terápiák alkalmazása ígéretes stratégiának számít. Ennek ellenére mindkét daganatféleség esetén csupán csekély számú célzott terápiás kezelés leírását publikálták. Bár egyes UrC / PBAC esettanulmányokban számoltak már be DNS szekvencia alapján kiválasztott célzott terápiás kezelésekről, azonban szisztematikusan és nagyobb UrC vagy PBAC kohorton elvégzett terápiaazonosítást célzó vizsgálatok még nem készültek. Ezért a fentiekben leírt módon összegyűjtött mintákon a kereskedelmi forgalomban kapható Oncomine Comprehensive Assay Panel (OCAv3) felhasználásával összesen 161 onkológiai

szempontból releváns gén szekvenálását végeztük el. Az adott mintában detektált eltéréseket allél frekvenciájuk alapján 15%-os küszöbérték alatt a további vizsgálatokból kizártuk. Az így megmaradó eltéréseket klinikai hatásuk szerint szelektáltuk és csak az ún. patogén, tehát a tumor kialakulását potenciálisan elősegítő eltéréseket vizsgáltuk tovább. Ezután az eltérések terápiás szempontból történő elemzése következett, melyhez a QCI adatbázison alapuló szoftvert alkalmaztuk, mellyel csupán klinikai vizsgálatokban már tesztelt, EMA és/vagy FDA engedéllyel rendelkező szereket azonosítottuk. Továbbá csupán a legalább Tier2 evidencia szintű ajánlásokat vettük figyelembe. Mivel egy adott eltérés jelenléte esetén ajánlott szerek nem feltétlenül a mutációval érintett molekulára hatnak, hanem gyakran az adott szignálút vonal más tagjaira, ezért érdemes az egyes érintett molekulákat funkciójuk szerinti szignáltranszdukciós kontextusban is vizsgálni.

A *TP53* tumorszupresszor gén, melynek fontos szerepe van a normál sejtek növekedésében és a tumoros elfajulás megakadályozásában, a legtöbb humán daganattípusban gyakran szenved mutációt. Ez járhat funkcióvesztéssel vagy funkciónyeréssel is (110, 111). Az irodalomban fellelhető adatok összesítése alapján az UrC esetek 69%-ban (133/194) fordulnak elő patogén *TP53* eltérések, ami így a leggyakrabban előforduló mutáció (27, 28, 34, 37-40, 43, 46-49). A mi vizsgálatunk is ehhez hasonló, 79%-os (26/33) *TP53* mutációs rátát eredményezett. Ezzel szemben a PBAC-ban talált *TP53* mutációs gyakoriság lényegesen alacsonyabb volt, 42% (5/12), míg az irodalmi adatok alapján az esetek 61%-ban (34/56) érintett ez a gén (46, 48, 49, 81).

A p53 fehérje terápiás célpontként történő alkalmazása igen vonzó stratégiának tűnik (112). A p53 fehérje funkciócsökkenéséért alapvetően két fő mechanizmus felelős: a *TP53* gén mutációja és a vad típusú p53 fehérje alulregulációja. Többféle p53 fehérjét célzó stratégia is elérhető már, azonban a jelenleg zajló kísérletek többsége még csak kezdeti fázisban van. Mindössze 3 olyan vegyület (APR-246, COTI-2 és az idasantulin) jutott el eddig a fázis III-as klinikai vizsgálatokig, mely a mutáns p53 fehérje reaktivációját célozza. Bár még korai lenne messzemenő következtetéseket levonni, azonban sikeres klinikai vizsgálatok esetén a p53 célzott kezelése a gén eltéréseinek gyakorisága okán új utat nyithat a daganatok kezelésében (113).



Vizsgálataink alapján mind az UrC (97%), mind a PBAC esetében (75%) a sejtciklus/DNS hibajavítás volt a leginkább érintett mechanizmus, mely elsősorban a *TP53* gén gyakori érintettségével magyarázható.

A *TP53* mellett ehhez az útvonalhoz soroltuk még többek között a ciklin D géneket, a *CCND1* (UrC 9%, 3/33, PBAC 0%), *CCND2* (UrC 12%, 4/33, PBAC 8%, 1/12) és a *CCND3* (UrC 0%, PBAC 8%, 1/12). Ezek mutációit legjobb tudomásunk szerint ezidáig sem UrC-ban, sem PBAC-ban nem detektálta más kutatócsoport. Ezen gének kritikus szerepet játszanak a sejtosztódás szabályozásában. Onkogénként funkcionálnak azáltal, hogy elősegítik a sejtciklus G1 fázisból S fázisba történő belépését úgy, hogy a ciklin D fehérje bekötődik a ciklin dependens kináz CDK4/CDK6-hoz, ezzel aktiválva azt. A ciklin D - CDK4/6 komplex számos daganatban amplifikáció vagy pontmutáció következtében fokozott aktivitást mutat, ami fokozott sejtosztódást eredményez (114, 115). Vizsgálatunkban a *CDK4* gén egy UrC és egy PBAC beteg esetében mutatott amplifikációt (UrC: 3%, PBAC: 8%). Jelenleg számos CDK4/6 inhibitor (pl.: palbociclib, abemaciclib vagy ribociclib) alkalmaznak onkológiai betegek klinikai rutin ellátásában (115). Terápiapredikációs QCI vizsgálatunk egyéb indikációban a *CDK4* gén amplifikációja kapcsán azonosította a fent említett három gyógyszert. Jelenleg ezen szerek alkalmazása emlődaganatos betegeknél engedélyezett, de számos klinikai vizsgálatban más tumortípusok esetén is tesztelik őket (pl. palbociclib alkalmazása áttétes CRC-ban: NCT03446157). A palbociclib hatékonyságának meghatározása *CCND1/2/3* amplifikációt hordozó tumorok esetén jelenleg is zajlik egy fázis II klinikai kísérlet keretében (NCT04439201).

A *CDKN2A* gén két fehérjét kódol, a p14ARF-et és a p16INK4a-t. A p16INK4a gátolja a CDK4/6 fehérjéket, ezzel megakadályozva a sejtciklus G1-ből S fázisba történő belépését, a p14ARF pedig a p53 fehérjét aktiválja (116). Az irodalomban UrC kapcsán eddig két beteg esetében írtak le *CDKN2A* mutációját (38, 47). Jelen vizsgálatunkban két UrC (6%, 2/33) és két PBAC (17%, 2/12) beteg esetében találtunk funkcióvesztő mutációt a *CDKN2A* génben. Nemrégiben megjelent egy fázis II klinikai vizsgálat beszámolója, melyben biztató eredményeket közöltek *CDKN2A* mutáns, nem kissejtes tüdődaganatos betegek palbociclib monoterápiájával kapcsolatban (117). A fentiek alapján a palbociclib alkalmazása ígéretes lehet *CDKN2A* mutáns UrC és PBAC betegek számára.

A poly (adenozin difoszfát [ADP]-ribóz) polimeráz (PARP) enzimek fontos szerepet játszanak a homológ rekombináció révén létrejövő DNS hibajavításban, melynek során a kettősszalú DNS törések javítása valósul meg. Egyes daganatok funkcióvesztő mutációt hordoznak a homológ rekombinációs hibajavító mechanizmusban szerepet játszó génekben, mint például a *BRCA1* és *BRCA2*. Az ilyen eltérést hordozó daganatsejtek igen érzékenyen reagálnak a PARP inhibitor kezelésre (pl. olaparib, rucaparib, niraparib) (118). Az UrC kohortunkban 4 beteg esetében (12%, 4/33) azonosítottuk a *BRCA2* funkcióvesztő mutációit. Ennek megfelelően a QCI által elvégzett terápiapredikció mind a 4 esetben azonosított PARP inhibitorokat, potenciálisan hatékony szerként UrC kapcsán. Egy 2019-ben megjelent esettanulmányban egy metasztatikus UrC betegnél, akinél a NGS *BRCA1* deléciót, *MYC* amplifikációt és *TP53* mutációt azonosított, több, mint 19 hónapon keresztül sikeresen (teljes radiológiai válasz) alkalmazták a PARP-inhibitor (rucaparib) kezelést (119). Az elmúlt évben jelent meg egy Japán, fázis I kísérlet leírása, melyben előrehaladott, vagy metasztatikus szolid tumorokkal rendelkező betegeket kezeltek PARP inhibitorral, niraparibbal. A vizsgálatba bevont 1 UrC-s betegnél nem sikerült kedvező hatást elérni, hiszen a daganat progrediált, ugyanakkor a beteg *BRCA2* mutációs státuszát nem közölték a szerzők (120).

A TERT enzim RNS templátról DNS szálakat készít a humán kromoszómák végén elhelyezkedő telomer régióra. Az esetek 85-90%-ban a humán daganatok magas szintű TERT expressziót mutatnak, amely hozzájárul a rákos sejtek proliferációjához számos daganatos megbetegedésben, mint például a CRC, a prosztatarák, vagy a petefészek daganat (121). PBAC-ban mind az irodalomban, mind pedig jelen vizsgálatunkban detektáltunk *TERT* mutációt. Az összesített irodalmi adatok alapján a PBAC-ban az esetek 13%-ában (8/61) (48, 49, 79, 81), míg saját eredményeink alapján 17%-ban (2/17) volt érintett a *TERT* gén. A rákos sejtekben mutatott fokozott TERT expresszió miatt ez a molekula szintén jó gyógyszer-célpontnak ígérkezik. Gátlására számos szert alkalmaznak napjainkban pl.: nukleozid analógokat vagy kémiaiilag módosított oligonukleotidokat (pl. imetelstat), illetve számos inhibitor van klinikai vizsgálati fázisban (121).

Az eddig megjelent tanulmányok mind az UrC, mind pedig a PBAC esetében igazolták a MAPK/PIK3 szignálút vonal gyakori érintettségét. Az összesített irodalmi adatok alapján a *KRAS* gén érintettsége UrC-ban 30%-os (69/230) (27, 28, 34, 37-49),

míg PBAC-ban 26%-os (25/98) (45, 46, 48, 49, 78, 81). Jelen vizsgálataink hasonló gyakorisági értékeket találtak mind UrC (32%-ban, 11/34), mind pedig PBAC esetén (25%, 3/12). Hasonlóan a CRC-ban találtakhoz az általunk detektált különböző *KRAS* mutációk többsége (4/7) a 12-es kodont érintette (122).

A RAS fehérjék, beleértve a *KRAS*-t, azon molekulák közé tartoznak, melyek központi szerepet játszanak számos sejtbiológiai folyamatban, mint például a sejtproliferáció, differenciáció, metabolizmus és sejthalál (123). Emellett a *KRAS* az egyik legismertebb protoonkogén, mely különböző daganatokban - mint például a nem kissejtes tüdődaganatban, vagy a CRC-ban - egyaránt magas mutációs rátával rendelkezik (124). Dacára az elmúlt 40 év gyógyszerfejlesztéseinek, még mindig nem áll rendelkezésünkre hatékony stratégia a *KRAS* mutációk célzására, kivéve a sotorasibot, melyet az elmúlt évben fogadott el az FDA *KRAS* p.G12C mutáns, előrehaladott állapotú szolid tumorok kezelésére (125). Ezzel a szerrel UrC és PBAC esetében még nem állnak rendelkezésre tapasztalatok.

Az EGFR molekula közvetlen terápiás célponként történő alkalmazása már régóta alkalmazott stratégia a daganatterápiában. Az első EGFR tirozin-kináz inhibitor, az erlotinib 2004-es FDA általi engedélyezése óta számos további EGFR inhibitort sikerült kifejleszteni. Ezidáig világszerte 14 különböző EGFR inhibitor kapott hatósági engedélyt különböző daganatos megbetegedések kezelésére (126). Ezek alapján nem meglepő, hogy a QCI analízisünk számos célzott terápiás szert listázott az *EGFR* mutációt/amplifikációt hordozó UrC/PBAC betegek számára.

Összesített irodalmi adatok alapján mind UrC-ban, mind PBAC-ban írtak már le *EGFR* eltérést (UrC: 4%, 8/183, PBAC: 15%, 13/89) (27, 37-41, 43, 45-48, 80, 81). Ezzel összhangban vizsgálataink is hasonló arányban mutatták ki az *EGFR* funkciónyerő eltéréseit (főleg amplifikációit) mind UrC (9%, 3/33), mind pedig PBAC (8%, 1/12) betegekben. Az irodalomban eddig két tanulmány jelent meg, melyekben UrC-ban szenvedő betegeket kezeltek anti-EGFR terápiával (26, 27), mindkét esetben sikerült pozitív terápiást hatást elérni. Ezen túlmenően volt néhány beszámoló, melyekben egyéb tirozin-kináz receptor inhibitorokat (trametinib, sorafenib, sunitinib, tepotinib, bevacizumab, afatinib) alkalmaztak UrC-s betegek esetében, szintén biztató eredményekkel (28-31).

A humán epidermális növekedési factor receptor 2 (HER2) egy gyakran használt terápiás célpont emlő-, gyomor és gastroesophagealis daganatokban. Egyéb tumortípusokban az *ERBB2* (HER2) gyakoriságáról és a HER2-t célzó terápia hatékonyságáról még keveset tudunk (127). Egy 2019-ben megjelent tanulmányban az *ERBB2* amplifikáció gyakoriságát és a HER2-t célzó terápia hatékonyságát vizsgálták különböző tumortípusokban. A vizsgálatban összesen 5002 előrehaladott állapotú daganatos beteg mintáit vizsgálták (kivéve emlő daganatot), köztük 7 UrC-s beteg mintáit is. Az 5002 minta közül összesen 122 esetben (2,4 %) detektáltak amplifikációt, a vizsgálatba bevont UrC esetek pedig 28%-ban (2/7) hordoztak *ERBB2* amplifikációt. Azon betegek, akik HER2-t célzó terápiában részesültek, szignifikánsan hosszabb progresszió-mentes túlélést mutattak az anti-HER2 kezelés alatt, a megelőző terápia alatt mérthez képest, valamint nőtt a teljes túlélés hossza is esetükben. Bár a szerzők nem részletezték az eredményeket tumortípusonként, így pontos információt az UrC-s betegek kezeléséről nem közöltek, eredményeik azt sugallják, hogy HER2 amplifikációt hordozó tumortípusokban hatásos lehet az anti-HER2 terápia, így ez a kezelés megfelelő lehet a HER2 pozitív UrC-s betegek számára is (127).

UrC-ban és PBAC-ban az *ERBB2* eltéréseiről még igen keveset tudunk (40, 45, 46). Vizsgálatunk szerint az UrC esetek 9%-ban (1 amplifikáció, 2 misszensz mutáció /33), míg PBAC-ban 8%-ban (1 amplifikáció/12) voltak jelen e gén patogén eltérései. Ezen terápiás célpont népszerűségét jellemzi, hogy a QCI vizsgálatunk az *ERBB2* amplifikációval összefüggésben találta a legnagyobb számú célzott terápiás gyógyszert.

A *MET* gén által kódolt c-MET tirozin-kináz fehérje szabályozatlan működése az onkogenezis jól ismert mozgatórugója. Számos protoonkogénnel ellentétben a *MET* egyedinek számít, mivel három különböző genetikai eltérése (amplifikáció, mutáció és fúzió) is egyaránt klinikailag releváns onkogenezishez vezethet. Habár mindhárom állapot kimutatása módszertani kihívást jelent, mégis rendkívül fontos azonosítani a MET-függő tumorokat, mivel ezek kezelésére számos célzott terápiás lehetőség áll rendelkezésre (pl. capmatinib, crizotinib, vagy tepotinib). Ezen kívül mivel a *MET* eltérések más célzott terápiákkal szembeni rezisztencia kialakulásáért is felelősek lehetnek, így a *MET* gént érintő mutációk meghatározása egyéb terápiák kapcsán (pl. anti-EGFR terápia) is fontos (128, 129).

A szakirodalomban eddig 3 UrC-s beteg esetében írtak le *MET* eltérést, 2 esetben amplifikációt, valamint egy misszensz pontmutációt (27, 40). Az általunk vizsgált IonTorrent UrC kohortban 12%-ban (4/33) (2 nonszensz mutáció, 1 misszensz mutáció, 1 amplifikáció) detektáltuk *MET* eltéréseket, valamint az IonTorrent PBAC kohortban is leírtunk 1 esetben *MET* amplifikációt, amelyre a legjobb tudomásunk szerint még nem volt példa a szakirodalomban.

A *MYC* onkogén eltérései is számos human daganatban szolgálnak driverként. Amplifikációja összefüggésben van az emlő-, a prosztata-, és a vastagbél-daganatok rosszabb prognózisával. Továbbá, a *MYC* gén amplifikációját és az ennek következtében létrejövő *MYC* fehérje overexpressziót a petefészekdaganatok ~50%-ban (130), a hepatocelluláris daganatok közel 30%-ban (131) és a nem kissejtes tüdődaganatokban 17%-ban (132) is leírták. Bár a *MYC* célzott terápiája a daganatok széles körében ígéretes kezelés lehetne, mindeddig nem sikerült hatékony gátlószert kifejleszteni ellene. Erre a problémára jelenthet megoldást azon szerek alkalmazása, melyek nem közvetlenül a *MYC* génre, hanem az általa szabályozott molekulákra hatnak (133, 134).

A szakirodalmat áttekintve az UrC-k 18%-ában (6/34) írtak le *MYC* amplifikációt, mely megegyezik az általunk tapasztalt gyakorisággal. PBAC kapcsán legjobb tudomásunk szerint elsőként találtunk *MYC* amplifikációt, mely vizsgálataink szerint a PBAC betegek 25%-ában (3/12) fordul elő. QCI analízisünk a fentiekkel összhangban, nem talált célzott-, vagy kemoterápiás szert a *MYC* eltéréssel összefüggésben.

A mikroszatellita instabilitás egy olyan molekuláris fenotípus, melyet a genomban felhalmozódó nagyszámú eltérés jellemez, mivel a DNS replikáció során a leggyakrabban a random ismétlődő szakaszokban, az ún. mikroszatellita régiókban a leggyakoribb a másolási hibák kialakulása. Ezek a másolási hibák az adott szakasz hosszának megváltozásával (rövidülés vagy hossznövekedés) jár. A MMR rendszer hibája esetén ezek a hibák felhalmozódnak a DNS-ben és a mikroszatellita régiók abnormális mintázatát okozzák. Ezt a jelenséget nevezzük MSI-nak (50). Az MSI tehát az MMR fehérjék hibás működésére vezethető vissza, és egyes mikroszatellita régiók analízisével DNS szinten detektálható. Ugyanakkor lehetőség van az MMR fehérjék (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*) immunhisztokémiai vizsgálatára is. A klinikai rutinban mindkét módszer elterjedt. Kutatások alátámasztják azon feltételezést, hogy a MSI-H tumorok kezelésére hatásosak lehetnek IEG szerek (135, 136). A pembrolizumab pedig az első olyan szer

volt, amelyik nem egy meghatározott tumorentitásra, hanem egy bizonyos molekuláris eltérésére, nevezetesen az MSI jelenlétére kapott FDA engedélyt olyan szolid tumoros betegek esetén, akik legalább egy korábbi szisztémás kezelésre progrediáltak (137)

Jelen vizsgálatunkban mind DNS, mind pedig fehérje szinten elvégeztük a MMR-defektus vizsgálatát. Mikroszatellita PCR analízisünk az általunk vizsgált UrC-s esetek egyikében sem detektált MSI-t, míg az MMR fehérjék IHC vizsgálata során is csupán egyetlen esetben (1/61 UrC minta) detektáltunk MMR fehérje (MSH2) vesztsést. Így tehát összességében az esetek 98%-ban (60/61) nem találtunk MMR vesztsést (40).

Az MMR rendszer érintettségéről UrC-ban az itt leírt eredményekkel javarészt ellentmondásos publikációk születtek az elmúlt években. Ezek összesítése alapján az esetek 61%-ban (25/40) detektáltak MSI-t UrC-s betegek mintáiban (31, 34, 39, 42). Ezzel ellentétben egy 2020-ban megjelent, 13 UrC mintán elvégzett MMR vizsgálat eredményeit közlő tanulmány szerint egyetlen esetben sem detektáltak MSI-t (49).

Véleményünk szerint az egyes tanulmányok közötti eltérések az UrC diagnosztikus kritériumainak különbségeiből adódhatnak. A kevésbé szigorú definíciók alkalmazásával más, nem urachalis eredetű adencocarcinómákat, mint például CRC vagy endometrium carcinomat is beválogathattak, melyekben gyakoribb a MSI előfordulása, ezzel szemben a mi tanulmányunkban felhasznált eseteknél, a nem egyértelműen urachalis eredet kizáró tényező volt.

PBAC kapcsán három tanulmány érhető el, melyekben MSI analízisek eredményeit publikálták. Az ezekben vizsgált összesen 69 PBAC minta egyikében sem találtak MSI-t (49, 81, 138). Ehhez hasonlóan, az általunk vizsgált 19 PBAC eset közül mindössze egyetlen esetben detektáltunk (1/18, 6%) MSI-t.

Az alacsony MSI arány bár nem vetít előre jó érzékenységet az IEG kezelésre sem UrC, sem pedig PBAC esetében, de nem is zárja ki annak lehetőségét, hiszen az MSI jelenlétének pozitív prediktív értéke magas, de negatív prediktív értéke alacsony, ami azt jelenti, hogy az MSI-t nem hordozó betegek is jól reagálhatnak az IEG kezelésre.

A közelmúlt egy másik, hatékony tumorelleses stratégiája az IEG kezelések alkalmazása, melyekben a PD-1/PD-L1 útvonal célzása került az érdeklődés középpontjába. A PD-1/PD-L1 gátlás bizonyítottan hatékony több daganatféléseben, akár előrehaladott állapotban is. A legtöbb tanulmány kimutatta a nagyobb érzékenységet PD-1/PD-L1 gátló szerekre olyan esetekben, ahol a tumorsejtekben és/vagy a tumor

mikrokörnyezetét beszűrő immunsejtekben PD-L1 expressziót tudtak kimutatni IHC-val. Sok esetben azonban azon tumorok esetén is pozitív tumor ellenes hatást detektáltak, ahol nem sikerült fokozott PD-L1 expressziót kimutatni (139). Korábban számoltak már be olyan UrC esetről, melyet atezolizumabbal, egy PD-L1-gátló szerrel kezeltek, mely alkalmazásával stabil állapotot értek el (34). Ezen eredmények arra utalnak, hogy a PD-1/PD-L1-gátló szerek hatékonyak lehetnek előrehaladott UrC-ban is az alacsony PD-L1 expresszió (16%) ellenére is (40).

Egy 2019-ben megjelent tanulmányban 56 PBAC mintán vizsgálták a PD-L1 szöveti fehérje expresszióját. Csakúgy, mint UrC esetében, PBAC kapcsán is csak kevés esetben tudtak kimutatni PD-L1 expressziót, hiszen a vizsgált 56 mintából összesen 2 bizonyult pozitívnak (4%) (138). Jelenleg nem ismert, hogy a PD-L1 expressziója összefüggésben áll-e az IEG kezelések hatékonyságával PBAC-ban, azonban vannak tanulmányok, melyek arról számoltak be, hogy metasztatikus CRC betegek esetében a PD-L1 expresszió státusza nem volt prediktív értékű pembrolizumab/nivolumab terápia hatékonyságával kapcsolatban (140, 141). További vizsgálatok eredményei azt sugallják, hogy az előrehaladott állapotú PBAC betegek 20-30%-nál hatékony lehet az elsővonalbeli atezolizumab vagy pembrolizumab alkalmazása, valamint minden olyan PBAC beteg esetén, akinél a platina-alapú kemoterápia alkalmazása nem lehetséges, szintén atezolizumab/pembrolizumab kezelés megkezdése ajánlott (142, 143). Ezen javaslatok megfontolása különösen fontos lehet PBAC kapcsán, hiszen a platina-alapú kemoterápiák alkalmazásával is nagyon alacsony számban érnek el jó terápiás választ.

Bár munkánk során volt néhány korlátozó tényező, mint például a retrospektív, több különböző intézményből történő mintagyűjtés és az ebből következő FFPE blokkokra vonatkozó minőségbeli különbségek, eredményeink mégis egyedülállónak tekinthetőek, hiszen mind a vizsgált esetek, mind pedig a vizsgált gének számát tekintve ez az egyik legnagyobb tanulmány. Továbbá, ez az első olyan vizsgálat UrC és PBAC kapcsán, amely terápiapredikációs szoftvert alkalmaz a detektált mutációkhoz klinikailag jóváhagyott gyógyszerek azonosítása céljából. A vizsgálat retrospektív jellegéből adódóan természetesen nem tudhatjuk, hogy a valóságban milyen terápiás értékkel bírnának a vizsgálatunk során azonosított szerek. Ennek eldöntésére egyrészt az irodalomban publikált minden olyan, UrC és a PBAC beteg esetének összegyűjtésére van szükség, akik DNS szekvenálás alapján kiválasztott célzott terápiás kezelésben

részesültek. Jelen munkám megbeszélés része ebbe az irányba tett első lépésnek is felfogható, hiszen abban összefoglaltam az aktuális irodalomban elérhető összes, célzott kezelésnek alávetett UrC és PBAC beteg esetét. Mindemellett kutatócsoportunk egy prospektív munka keretében azon dolgozik, hogy a klinikánkhoz UrC és PBAC diagnózissal forduló és a vizsgálatba beleegyező betegek daganatszövetének mutációs mintázata alapján potenciálisan hatékony gyógyszereket azonosítsunk, melyek alkalmazása reményeink szerint hozzájárul a betegek hatékonyabb kezeléséhez. Munkánk során szerzett tudásunkkal pedig más intézmények számára is hasznos tapasztalatot szolgáltatathatunk e ritka betegségek kezelésével kapcsolatban.



## 6. Következtetések

1. 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 alkalmas a ritka daganatok magyarországi eseteinek (adatainak és szövettani mintáinak) összegyűjtésére.
2. 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.
3. Mind UrC-ban, mind CRC-ban a *PTEN* gén mutációs gyakorisága igen alacsony (4-6%), ám a PTEN fehérje vesztese 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.
4. 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), ami arra utal, hogy a két betegség patomechanizmusa sok tekintetben hasonló lehet.
5. Az anti-EGFR terápia, - mely potenciálisan hatékony kezelés lehet UrC betegek számára - megkezdése előtt eredményeink alapján szükséges a *KRAS*, *MET* gének, valamint a PTEN fehérje vizsgálata, mivel ezek eltérései gyakoriak UrC-ban és érintettségük összefüggésben áll az anti-EGFR terápiával szembeni rezisztenciával.
6. Az Oncomine Comprehensive génpanellel elvégzett vizsgálat eredményeinek kiértékeléséhez használt adatbázis alapú (QCI) terápiapredikciót alkalmazva személyre szabott terápia tervezést szimuláltunk és azonosítottuk a leggyakrabban ajánlott gyógyszereket. Eredményeink alapján számos célzott terápiás szer potenciálisan hatékony lehet, hiszen az UrC betegeink 97%-nak, míg a PBAC betegeink 67%-nak sikerült potenciálisan alkalmazható terápia ajánlani, amelyeknek eddigi, UrC/PBAC-ban történő alkalmazásáról irodalomkutatást végeztünk. Ennek eredményei segítséget nyújthatnak azon célzott szerek kiválasztásában, melyekkel kapcsolatban már elérhetőek UrC/PBAC-ban szerzett tapasztalatok.

7. Vizsgálatunk retrospektív jellege miatt még kérdéses, hogy milyen terápiás értékkel bírnak az általunk azonosított szerek. Kutatócsoportunk egy prospektív munka kereteiben: a klinikánkhoz UrC/PBAC diagnózissal forduló betegek daganatszövetének mutációs mintázata alapján potenciálisan hatékony gyógyszereket azonosítsa tűzte ki célul, a betegek hatékonyabb kezelése érdekében, mellyel az itt felvázolt analitikai és kiértékelési módszert is teszteljük prospektíven.

## 7. Összefoglalás / Summary

Ritka daganatok esetén, mint az UrC és PBAC a késői diagnózis, a terápiás irányelvek hiánya, valamint a prospektív klinikai vizsgálatok kivitelezési nehézségei nagyban rontják a betegség várható prognózisát. Kitűzött célunk egy hazai és nemzetközi mintagyűjtés elindítása, a rendelkezésre álló minták molekuláris vizsgálata, a daganatok mutációs mintázatának meghatározása és ez alapján egy személyre szabott terápiapredikció volt.

Vizsgálataink alapján mind UrC-ban, mind PBAC-ban a leggyakrabban érintett három gén a *TP53*, a *KRAS* és a *MYC*. Emellett mindkét daganatban a sejtciklus/DNS hibajavítás és a MAPK útvonalak érintettsége volt a leggyakoribb. Kutatócsoportunk írta le elsőként a *CCND1/2/3* gének mutációit mind UrC, mind PBAC-ban, valamint a *MYC* gén amplifikációját PBAC-ban. Kimutattuk, hogy az *APC* gén mutációja jóval kevésbé gyakori UrC-ban, mint CRC-ben, mely arra enged következtetni, hogy a Wnt útvonal az UrC patogenezisében kevésbé számottevő, valamint arra is utal, hogy a két tumorentitás molekuláris taxonómiáját és valószínűleg patogenezisét tekintve is nagyobb mértékben különbözik egymástól, mint ezt korábban gondoltuk. A *PTEN* gén eltérései azonban mind UrC-ban, mind pedig CRC-ben ritkán fordulnak elő, ám a PTEN fehérje elvesztése ennél nagyobb arányban mutatható ki, ami e fehérje epigenetikai szintű szabályozására utal.

A klinikai döntéshozatal elősegítése érdekében terápiapredikciós szoftver alkalmazásával a patogén eltérésekhez hatóanyagokat társítottunk, így célzottan, egyedi kezeléseket rendelhattünk a betegek mutációs státuszához. Eredményeink számos potenciálisan hatékony célzott terápia alkalmazását vetítik előre mind UrC, mind pedig PBAC kapcsán, mely reményt adhat e ritka betegségek jövőbeli sikeresebb gyógyszeres kezelésére nézve.

Mivel ritka tumorok esetében többnyire kivitelezhetetlenek a prospektív klinikai vizsgálatok, a személyre szabott orvoslás méginkább előtérbe kerül. Eredményeink alátámasztják, hogy ezen betegségek esetében a precíziós orvoslás elérhető lehet az adott daganat genetikai eltéréseire egyénileg tervezett célzott terápiapredikció segítségével. A disszertációban bemutatott stratégia sikerességét azonban prospektív módon is alá kell támasztani, ezért kutatócsoportunk egy nemzetközi kooperáció keretében jelenleg ezért a célért dolgozik.

In case of rare cancers, such as UrC and PBAC, late diagnosis, lack of therapeutic guidelines, as well as impracticability of prospective clinical trials greatly impair patients' prognosis. Our goal was to conduct a national and international sample collection and to perform tissue molecular analyses in order to identify recurrent DNA alterations and potential therapeutic targets.

We found, *TP53* (79% and 42%), *KRAS* (33% and 25%) and *MYC* (18% and 25%) to be the most commonly affected genes in both UrC and PBAC. In addition, the most frequently affected molecular pathways in both tumor types were the cell cycle regulation/DNA damage control and the MAPK pathway. We identified - for the first-time - mutations in the *CCND1/2/3* genes in both UrC and PBAC and alterations in the *MYC* gene in PBAC. Our results showed that *APC* mutations are much less frequent in UrC compared to CRC (10% vs 80%) suggesting Wnt pathway to be involved in the pathogenesis of only a relative small portion of UrCs. Furthermore, these results also suggest that UrC and CRC are much more different entities regarding their molecular taxonomy and pathogenesis than previously considered. Both UrC and CRC show low rates of genomic (6% and 4-20%) but high rates of protein PTEN loss (20% and 40%), suggesting an epigenetic regulation for this gene in both tumor types.

In order to facilitate clinical decision-making, we used a therapeutic prediction software to link potentially effective drugs with pathogenic DNA alterations. Using this approach, we were able to identify targeted treatments for the majority of cases in an individual manner. Our results identified a large number of potentially effective therapies for both UrC and PBAC, raising promise for future treatment of these rare diseases.

Since performance of prospective clinical trials are hardly possible for rare tumor entities, personalized medicine becomes an attractive therapeutic strategy. Our results support precision medicine as a feasible treatment strategy in UrC and PBAC. However, this should be proven in prospective studies. Therefore, our research group currently initiated an international collaboration and already working towards this aim.

## 8. Irodalomjegyzék

1. Begg RC. The Urachus: its Anatomy, Histology and Development. *J Anat.* 1930;64(Pt 2):170-83.
2. Schubert GE, Pavkovic MB, Bethke-Bedürftig BA. Tubular urachal remnants in adult bladders. *J Urol.* 1982;127(1):40-2.
3. Sheldon CA, Clayman RV, Gonzalez R, Williams RD, Fraley EE. Malignant urachal lesions. *J Urol.* 1984;131(1):1-8.
4. Sellars H, Macleod C, Perakath B. Ileal perforation and fistulated urachal remnant in Crohn's disease. *N Z Med J.* 2019;132(1507):100-103.
5. Reis H, Krafft U, Niedworok C, Módos O, Herold T, Behrendt M, Al-Ahmadie H, Hadaschik B, Nyirady P, Szarvas T. Biomarkers in Urachal Cancer and Adenocarcinomas in the Bladder: A Comprehensive Review Supplemented by Own Data. *Dis Markers.* 2018;2018:7308168.
6. Pagliaro L. (szerk). *Rare Genitourinary Tumors* Springer 2016: 144 p.
7. Lee SR, Kang H, Kang MH, Yu YD, Choi CI, Choi KH, Park DS, Hong YK. The Youngest Korean Case of Urachal Carcinoma. *Case Rep Urol.* 2015;2015:707456.
8. Claps M, Stellato M, Zattarin E, Mennitto A, Sepe P, Guadalupi V, Mennitto R, de Braud FGM, Verzoni E, Procopio G. Current Understanding of Urachal Adenocarcinoma and Management Strategy. *Curr Oncol Rep.* 2020;22(1):9.
9. Siefker-Radtke A. Urachal adenocarcinoma: a clinician's guide for treatment. *Semin Oncol.* 2012;39(5):619-24.
10. Siefker-Radtke AO, Czerniak BA, Dinney CP, Millikan RE. Uncommon cancers of the bladder. In: Raghavan D, Johnson D, Meropol N, Moots P, Rose P, editors. *Textbook of uncommon cancer.* 3rd ed. Philadelphia: Wiley; 2006: 18 –26. p.
11. Szarvas T, Módos O, Niedworok C, Reis H, Szendrői A, Szász MA, Nyirády P. Clinical, prognostic, and therapeutic aspects of urachal carcinoma-A comprehensive review with meta-analysis of 1,010 cases. *Urol Oncol.* 2016;34(9):388-98.
12. Thali-Schwab CM, Woodward PJ, Wagner BJ. Computed tomographic appearance of urachal adenocarcinomas: review of 25 cases. *Eur Radiol.* 2005;15(1):79-84.

13. Siefker-Radtke AO, Gee J, Shen Y, Wen S, Daliani D, Millikan RE, Pisters LL. Multimodality management of urachal carcinoma: the M. D. Anderson Cancer Center experience. *J Urol*. 2003;169(4):1295-8.
14. Behrendt MA, van Rhijn BW. Genetics and biological markers in urachal cancer. *Transl Androl Urol*. 2016;5(5):655-661.
15. Herr HW, Bochner BH, Sharp D, Dalbagni G, Reuter VE. Urachal carcinoma: contemporary surgical outcomes. *J Urol*. 2007;178(1):74-8; discussion 78.
16. Gopalan A, Sharp DS, Fine SW, Tickoo SK, Herr HW, Reuter VE, Olgac S. Urachal carcinoma: a clinicopathologic analysis of 24 cases with outcome correlation. *Am J Surg Pathol*. 2009;33(5):659-68.
17. Paner GP, Barkan GA, Mehta V, Sirintrapun SJ, Tsuzuki T, Sebo TJ, Jimenez RE. Urachal carcinomas of the nonglandular type: salient features and considerations in pathologic diagnosis. *Am J Surg Pathol*. 2012;36(3):432-42.
18. Ashley RA, Inman BA, Sebo TJ, Leibovich BC, Blute ML, Kwon ED, Zincke H. Urachal carcinoma: clinicopathologic features and long-term outcomes of an aggressive malignancy. *Cancer*. 2006;107(4):712-20.
19. Bruins HM, Visser O, Ploeg M, Hulsbergen-van de Kaa CA, Kiemeny LA, Witjes JA. The clinical epidemiology of urachal carcinoma: results of a large, population based study. *J Urol*. 2012;188(4):1102-7.
20. Jung HA, Sun JM, Park SH, Kwon GY, Lim HY. Treatment Outcome and Relevance of Palliative Chemotherapy in Urachal Cancer. *Chemotherapy*. 2014;60(2):73-80.
21. Kim IK, Lee JY, Kwon JK, Park JJ, Cho KS, Ham WS, Hong SJ, Yang SC, Choi YD. Prognostic factors for urachal cancer: a bayesian model-averaging approach. *Korean J Urol*. 2014;55(9):574-80.
22. Niedworok C, Panitz M, Szarvas T, Reis H, Reis AC, Szendrői A, Nyirády P, Szasz AM, Módos O, Rübber H, Vom Dorp F. Urachal Carcinoma of the Bladder: Impact of Clinical and Immunohistochemical Parameters on Prognosis. *J Urol*. 2016;195(6):1690-6.
23. Mercier F, Passot G, Villeneuve L, Levine EA, Yonemura Y, Goéré D, Sugarbaker PH, Marolho C, Bartlett DL, Glehen O; BIG-RENAPE Working Group. Peritoneal Carcinomatosis of Urachus Origin Treated by Cytoreductive Surgery and

- Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy (HIPEC): An International Registry of 36 Patients. *Ann Surg Oncol*. 2018;25(4):1094-1100.
24. Berki T, Boldizsár F, Szabó M, Talabér G, Varecza Z. Jelátvitel (Orvosi biotechnológia), Pécsi Tudományegyetem, 2011: 11-15, 55-59 p.
  25. Therkildsen C, Bergmann TK, Henrichsen-Schnack T, Ladelund S, Nilbert M. The predictive value of KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA and PTEN for anti-EGFR treatment in metastatic colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. *Acta Oncol*. 2014;53(7):852-64.
  26. Goss G, Hirte H, Miller WH Jr, Lorimer IA, Stewart D, Batist G, Parolin DA, Hanna P, Stafford S, Friedmann J, Walsh W, Mathews S, Douglas L, Seymour LK. A phase I study of oral ZD 1839 given daily in patients with solid tumors: IND.122, a study of the Investigational New Drug Program of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *Invest New Drugs*. 2005;23(2):147-55.
  27. Collazo-Lorduy A, Castillo-Martin M, Wang L, Patel V, Iyer G, Jordan E, Al-Ahmadie H, Leonard I, Oh WK, Zhu J, McBride RB, Cordon-Cardo C, Solit DB, Sfakianos JP, Galsky MD. Urachal Carcinoma Shares Genomic Alterations with Colorectal Carcinoma and May Respond to Epidermal Growth Factor Inhibition. *Eur Urol*. 2016;70(5):771-775.
  28. Loh KP, Mondo E, Hansen EA, Sievert L, Fung C, Sahasrabudhe DM, Guancial E. Targeted Therapy Based on Tumor Genomic Analyses in Metastatic Urachal Carcinoma. *Clin Genitourin Cancer*. 2016;14(4):e449-52.
  29. Testa I, Verzoni E, Grassi P, Colecchia M, Panzone F, Procopio G. Response to targeted therapy in urachal adenocarcinoma. *Rare Tumors*. 2014;6(4):5529.
  30. Shitara K, Yamazaki K, Tsushima T, Naito T, Matsubara N, Watanabe M, Sarholz B, Johne A, Doi T. Phase I trial of the MET inhibitor tepotinib in Japanese patients with solid tumors. *Jpn J Clin Oncol*. 2020;50(8):859-866.
  31. Jia Z, Chang X, Li X, Wang B, Zhang X. Urachal Carcinoma: Are Lymphadenectomy and Umbilectomy Necessary? *Med Sci Monit*. 2020;26:e927913.
  32. Swatler J, Kozłowska E. Immunoterapie nowotworów działające na punkty kontrolne układu odpornościowego [Immune checkpoint-targeted cancer immunotherapies]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2016;70:25-42. Polish.

33. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(4):252-64.
34. Kardos J, Wobker SE, Woods ME, Nielsen ME, Smith AB, Wallen EM, Pruthi RS, Hayward MC, McGinty KA, Grilley-Olson JE, Patel NM, Weck KE, Black P, Parker JS, Milowsky MI, Hayes DN, Kim WY. Comprehensive Molecular Characterization of Urachal Adenocarcinoma Reveals Commonalities With Colorectal Cancer, Including a Hypermutable Phenotype. *JCO Precis Oncol*. 2017;1:PO.17.00027.
35. McGregor BA, Campbell MT, Xie W, Farah S, Bilen MA, Schmidt AL, Sonpavde GP, Kilbridge KL, Choudhury AD, Mortazavi A, Shah AY, Venkatesan AM, Bublely GJ, Siefker-Radtke AO, McKay RR, Choueiri TK. Results of a multicenter, phase 2 study of nivolumab and ipilimumab for patients with advanced rare genitourinary malignancies. *Cancer*. 2021;127(6):840-849.
36. Chen M, Xue C, Huang RQ, Ni MQ, Li L, Li HF, Yang W, Hu AQ, Zheng ZS, An X, Shi Y. Treatment Outcome of Different Chemotherapy in Patients With Relapsed or Metastatic Malignant Urachal Tumor. *Front Oncol*. 2021;11:739134.
37. Módos O, Reis H, Niedworok C, Rübber H, Szendrői A, Szász MA, Tímár J, Baghy K, Kovalszky I, Golabek T, Chlosta P, Okon K, Peyronnet B, Mathieu R, Shariat SF, Hollósi P, Nyirády P, Szarvas T. Mutations of KRAS, NRAS, BRAF, EGFR, and PIK3CA genes in urachal carcinoma: Occurrence and prognostic significance. *Oncotarget*. 2016;7(26):39293-39301.
38. Singh H, Liu Y, Xiao X, Lin L, Kim J, Van Hummelen P, Wu CL, Bass AJ, Saylor PJ. Whole exome sequencing of urachal adenocarcinoma reveals recurrent NF1 mutations. *Oncotarget*. 2016;7(20):29211-5.
39. Cornejo KM, Cosar EF, Paner GP, Yang P, Tomaszewicz K, Meng X, Mehta V, Sirintrapun SJ, Barkan GA, Hutchinson L. Mutational Profile Using Next-Generation Sequencing May Aid in the Diagnosis and Treatment of Urachal Adenocarcinoma. *Int J Surg Pathol*. 2020;28(1):51-59.
40. 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, Rübber 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.
41. Riva G, Mian C, Luchini C, Girolami I, Ghimenton C, Cima L, Novelli L, Hanspeter E, Mazzoleni G, Schwienbacher C, Pycha S, D'Elia C, Trenti E, Pycha A, Martignoni G, Hes O, Eccher A, Nesi G, Brunelli M. Urachal carcinoma: from gross specimen to morphologic, immunohistochemical, and molecular analysis. *Virchows Arch*. 2019;474(1):13-20.
  42. Sirintrapun SJ, Ward M, Woo J, Camic A. High-stage urachal adenocarcinoma can be associated with microsatellite instability and KRAS mutations. *Hum Pathol*. 2014;45(2):327-30.
  43. Cha S, Lee J, Shin JY, Kim JY, Sim SH, Keam B, Kim TM, Kim DW, Heo DS, Lee SH, Kim JI. Clinical application of genomic profiling to find druggable targets for adolescent and young adult (AYA) cancer patients with metastasis. *BMC Cancer*. 2016;16:170.
  44. Hang JF, Pan CC. Absence of GNAS and BRAF mutations but presence of KRAS mutation in urachal adenocarcinoma. *Pathology*. 2017;49(3):316-317.
  45. Lee B, Jordan E, Won H, Bagrodia A, Deasi N, Bajorin D, Rosenberg J, Bochner B, Kim W, Berger M, Solit D, Al-Ahmadie H, Iyer G. Mutational Landscape of Primary Bladder and Urachal Adenocarcinoma. *J Urol* 2016;195: e1133-e4.
  46. Toubaji A, Jordan EJ, Desai N, Gopalan A, Chen YB, Fine SW, Sirintrapun SJ, Tickoo SK, Bochner BH, Dalbagni G, Cha EK, Bajorin DF, Rosenberg JE, Taylor BS, Berger MF, Reuter VE, Solit D, Iyer G, Al-Ahmadie H. Genomic Alterations in Primary Bladder Adenocarcinoma and Urachal Adenocarcinoma. *Nature Modern Pathology*, 106th Annual Meeting of the United States and Canadian Academy of Pathology (USCAP), 2016, San Antonio, Texas. 30:539.
  47. Lee S, Lee J, Sim SH, Lee Y, Moon KC, Lee C, Park WY, Kim NK, Lee SH, Lee H. Comprehensive somatic genome alterations of urachal carcinoma. *J Med Genet*. 2017;54(8):572-578.
  48. Pires-Luis AS, Martinek P, Alaghebandan R, Trpkov K, Comperat EM, Perez Montiel DM, Bulimbasic S, Lobo J, Henrique R, Vanecek T, Pivovarcikova K, Michalova K, Pitra T, Hora M, Marques A, Lopes JM, Rogala J, Mareckova J, Michal

- M, Hes O. Molecular Genetic Features of Primary Nonurachal Enteric-type Adenocarcinoma, Urachal Adenocarcinoma, Mucinous Adenocarcinoma, and Intestinal Metaplasia/Adenoma: Review of the Literature and Next-generation Sequencing Study. *Adv Anat Pathol.* 2020;27(5):303-310.
49. Maurer A, Ortiz-Bruechle N, Guricova K, Rose M, Morsch R, Garczyk S, Stöhr R, Bertz S, Golz R, Reis H, Bremmer F, Zimpfer A, Siegert S, Kristiansen G, Schwamborn K, Gassler N, Knuechel R, Gaisa NT; German study group of bladder cancer. Comparative genomic profiling of glandular bladder tumours. *Virchows Arch.* 2020;477(3):445-454.
50. Zhao P, Li L, Jiang X, Li Q. Mismatch repair deficiency/microsatellite instability-high as a predictor for anti-PD-1/PD-L1 immunotherapy efficacy. *J Hematol Oncol.* 2019;12(1):54.
51. Yamamoto H, Imai K. Microsatellite instability: an update. *Arch Toxicol.* 2015;89(6):899-921.
52. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209-249.
53. Thomas DG, Ward AM, Williams JL. A study of 52 cases of adenocarcinoma of the bladder. *Br J Urol.* 1971;43(1):4-15.
54. Bates AW, Baithun SI. Secondary neoplasms of the bladder are histological mimics of nontransitional cell primary tumours: clinicopathological and histological features of 282 cases. *Histopathology.* 2000;36(1):32-40.
55. Grignon DJ, Ro JY, Ayala AG, Johnson DE, Ordóñez NG. Primary adenocarcinoma of the urinary bladder. A clinicopathologic analysis of 72 cases. *Cancer.* 1991;67(8):2165-72.
56. Zaghloul MS, Nouh A, Nazmy M, Ramzy S, Zaghloul AS, Sedira MA, Khalil E. Long-term results of primary adenocarcinoma of the urinary bladder: a report on 192 patients. *Urol Oncol.* 2006;24(1):13-20.
57. Epstein JI, Amin MB, Reuter VE. Glandular Lesions. In: Epstein JI, Amin MB, Reuter VE, editors. *Biopsy Interpretation of the Bladder* 2nd edition. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2010. pp. 180-213.

58. Ghoneim MA, Abdel-Latif M, el-Mekresh M, Abol-Enein H, Mosbah A, Ashamalla A, el-Baz MA. Radical cystectomy for carcinoma of the bladder: 2,720 consecutive cases 5 years later. *J Urol.* 2008;180(1):121-7.
59. el-Mekresh MM, el-Baz MA, Abol-Enein H, Ghoneim MA. Primary adenocarcinoma of the urinary bladder: a report of 185 cases. *Br J Urol.* 1998;82(2):206-12.
60. Eble J, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. Lyon, France: IARC Press; 2004. 128-130 p.
61. Smith AK, Hansel DE, Jones JS. Role of cystitis cystica et glandularis and intestinal metaplasia in development of bladder carcinoma. *Urology.* 2008;71(5):915-8.
62. Melicow MM. Tumors of the urinary bladder: a clinico-pathological analysis of over 2500 specimens and biopsies. *J Urol.* 1955;74(4):498-521.
63. Dean AL, Mostofi FK, Thomson RV, Clark ML. A restudy of the first fourteen hundred tumors in the Bladder Tumor Registry, Armed Forces Institute of Pathology. *J Urol.* 1954;71(5):571-90.
64. Poore TE, Egbert B, Jahnke R, Kraft JK. Signet ring cell adenocarcinoma of the bladder: linitis plastica variant. *Arch Pathol Lab Med.* 1981;105(4):203-4.
65. Williamson SR, Lopez-Beltran A, Montironi R, Cheng L. Glandular lesions of the urinary bladder: clinical significance and differential diagnosis. *Histopathology.* 2011;58(6):811-34.
66. Young RH. Tumor-like lesions of the urinary bladder. *Mod Pathol.* 2009 Suppl 2:S37-52.
67. Bardales RH, Pitman MB, Stanley MW, Korourian S, Suhrland MJ. Urine cytology of primary and secondary urinary bladder adenocarcinoma. *Cancer.* 1998;84(6):335-43.
68. Wong VK, Ganeshan D, Jensen CT, Devine CE. Imaging and Management of Bladder Cancer. *Cancers (Basel).* 2021;13(6):1396.
69. Matolcsy A, Tulassay Zs. Az onkológia tankönyve, Semmelweis Kiadó, Budapest, 2011:442 p.

70. Lughezzani G, Sun M, Jeldres C, Alasker A, Budäus L, Shariat SF, Latour M, Widmer H, Duclos A, Jolivet-Tremblay M, Montorsi F, Perrotte P, Karakiewicz PI. Adenocarcinoma versus urothelial carcinoma of the urinary bladder: comparison between pathologic stage at radical cystectomy and cancer-specific mortality. *Urology*. 2010;75(2):376-81.
71. Jones WA, Gibbons RP, Correa RJ Jr, Cummings KB, Mason JT. Primary adenocarcinoma of bladder. *Urology*. 1980;15(2):119-22.
72. Dadhania V, Czerniak B, Guo CC. Adenocarcinoma of the urinary bladder. *Am J Clin Exp Urol*. 2015;3(2):51-63.
73. Tatli AM, Uysal M, Goksu SS, Arslan D, Gunduz S, Ozdogan M, Coskun HS, Bozcuk H, Savas B. Primary mucinous adenocarcinoma of the bladder: complete response with FOLFOX-4 regimen. *Med Oncol*. 2012;29(3):1935-7.
74. Teo M, Swan NC, McDermott RS. Sustained response of adenocarcinoma of the urinary bladder to FOLFOX plus bevacizumab. *Nat Rev Urol*. 2011;8(5):282-5.
75. Tatli AM, Uysal M, Goksu SS, Gunduz S, Arslan D, Ozdogan M. Complete response of primary bladder adenocarcinoma with the FOLFOX4 regimen. *Urol Int*. 2015;94(3):363-5.
76. Yu B, Zhou J, Cai H, Xu T, Xu Z, Zou Q, Gu M. Neoadjuvant chemotherapy for primary adenocarcinomas of the urinary bladder: a single-site experience. *BMC Urol*. 2015;15(1):3.
77. Wang X, Hu W, Xie L. Response to Anti-HER2-Based Treatment in a Patient with Bladder Adenocarcinoma Harboring HER2 Amplification and S310F Mutation Discovered by Next-Generation Sequencing: A Case Report. *Onco Targets Ther*. 2020;13:4249-4255.
78. Alexander RE, Lopez-Beltran A, Montironi R, MacLennan GT, Post KM, Bilbo SA, Jones TD, Huang W, Rao Q, Sen JD, Meehan K, Cornwell A, Miravalle L, Cheng L. KRAS mutation is present in a small subset of primary urinary bladder adenocarcinomas. *Histopathology*. 2012;61(6):1036-42.
79. Cowan ML, Springer S, Nguyen D, Taheri D, Guner G, Mendoza Rodriguez MA, Wang Y, Kinde I, Del Carmen Rodriguez Pena M, VandenBussche CJ, Olson MT, Cunha I, Fujita K, Ertoy D, Kinzler K, Bivalacqua T, Papadopoulos N, Vogelstein B,

- Netto GJ. Detection of TERT promoter mutations in primary adenocarcinoma of the urinary bladder. *Hum Pathol.* 2016;53:8-13.
80. Alexander RE, Montironi R, Lopez-Beltran A, Williamson SR, Wang M, Post KM, Sen JD, Arnold AK, Zhang S, Wang X, Koch MO, Hahn NM, Masterson TA, MacLennan GT, Davidson DD, Comp erat E, Cheng L. EGFR alterations and EML4-ALK rearrangement in primary adenocarcinoma of the urinary bladder. *Mod Pathol.* 2014;27(1):107-12.
81. Roy S, Pradhan D, Ernst WL, Mercurio S, Najjar Y, Parikh R, Parwani AV, Pai RK, Dhir R, Nikiforova MN. Next-generation sequencing-based molecular characterization of primary urinary bladder adenocarcinoma. *Mod Pathol.* 2017;30(8):1133-1143.
82. Kriehoff E, Behrens J, Mayr B. Nucleo-cytoplasmic distribution of beta-catenin is regulated by retention. *J Cell Sci.* 2006;119(Pt 7):1453-63.
83. Wasserman I, Lee LH, Ogino S, Marco MR, Wu C, Chen X, Datta J, Sadot E, Szeglin B, Guillem JG, Paty PB, Weiser MR, Nash GM, Saltz L, Barlas A, Manova-Todorova K, Uppada SPB, Elghouayel AE, Ntiamoah P, Glickman JN, Hamada T, Kosumi K, Inamura K, Chan AT, Nishihara R, Cercek A, Ganesh K, Kemeny NE, Dhawan P, Yaeger R, Sawyers CL, Garcia-Aguilar J, Giannakis M, Shia J, Smith JJ. SMAD4 Loss in Colorectal Cancer Patients Correlates with Recurrence, Loss of Immune Infiltrate, and Chemoresistance. *Clin Cancer Res.* 2019;25(6):1948-1956.
84. Dogruluk T, Tsang YH, Espitia M, Chen F, Chen T, Chong Z, Appadurai V, Dogruluk A, Eterovic AK, Bonnen PE, Creighton CJ, Chen K, Mills GB, Scott KL. Identification of Variant-Specific Functions of PIK3CA by Rapid Phenotyping of Rare Mutations. *Cancer Res.* 2015;75(24):5341-54.
85. Tolcher AW, Peng W, Calvo E. Rational Approaches for Combination Therapy Strategies Targeting the MAP Kinase Pathway in Solid Tumors. *Mol Cancer Ther.* 2018;17(1):3-16.
86. Huang DS, Wang Z, He XJ, Diplas BH, Yang R, Killela PJ, Meng Q, Ye ZY, Wang W, Jiang XT, Xu L, He XL, Zhao ZS, Xu WJ, Wang HJ, Ma YY, Xia YJ, Li L, Zhang RX, Jin T, Zhao ZK, Xu J, Yu S, Wu F, Liang J, Wang S, Jiao Y, Yan H, Tao HQ. Recurrent TERT promoter mutations identified in a large-scale study of multiple

- tumour types are associated with increased TERT expression and telomerase activation. *Eur J Cancer*. 2015;51(8):969-76.
87. Li MM, Datto M, Duncavage EJ, Kulkarni S, Lindeman NI, Roy S, Tsimberidou AM, Vnencak-Jones CL, Wolff DJ, Younes A, Nikiforova MN. Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists. *J Mol Diagn*. 2017;19(1):4-23.
  88. Wright JL, Porter MP, Li CI, Lange PH, Lin DW. Differences in survival among patients with urachal and nonurachal adenocarcinomas of the bladder. *Cancer*. 2006;107(4):721-8.
  89. Pinthus JH, Haddad R, Trachtenberg J, Holowaty E, Bowler J, Herzenberg AM, Jewett M, Fleshner NE. Population based survival data on urachal tumors. *J Urol*. 2006;175(6):2042-7;
  90. Collins DC, Velázquez-Kennedy K, Deady S, Brady AP, Sweeney P, Power DG. National Incidence, Management and Survival of Urachal Carcinoma. *Rare Tumors*. 2016;8(3):6257.
  91. Hager T, Kraywinkel K, Szarvas T, Hadaschik B, Schmid KW, Reis H. Urachal Cancer in Germany and the USA: An RKI/SEER Population-Based Comparison Study. *Urol Int*. 2020;104(9-10):803-809.
  92. Nagumo Y, Kojima T, Shiga M, Kojo K, Tanaka K, Kandori S, Kimura T, Kawahara T, Kawai K, Okuyama A, Higashi T, Nishiyama H. Clinicopathological features of malignant urachal tumor: A hospital-based cancer registry data in Japan. *Int J Urol*. 2020;27(2):157-162.
  93. Ploeg M, Aben KK, Hulsbergen-van de Kaa CA, Schoenberg MP, Witjes JA, Kiemeny LA. Clinical epidemiology of nonurothelial bladder cancer: analysis of the Netherlands Cancer Registry. *J Urol*. 2010;183(3):915-20.
  94. Davaro F, Schaefer J, May A, Raza J, Siddiqui S, Hamilton Z. Invasive non-urachal adenocarcinoma of the bladder: analysis of the National Cancer Database. *World J Urol*. 2019;37(3):497-505.

95. Szarvas T, Reis H. Editorial Comment from Dr Szarvas and Dr Reis to Clinicopathological features of malignant urachal tumor: A hospital-based cancer registry data in Japan. *Int J Urol.* 2020;27(2):163-164.
96. Mylonas KS, O Malley P, Ziogas IA, El-Kabab L, Nasioudis D. Malignant urachal neoplasms: A population-based study and systematic review of literature. *Urol Oncol.* 2017;35(1):33.e11-33.e19.
97. Tusnády G, Gaudi I, Rejto L, Kásler M, Szentirmay Z. A magyar daganatos betegek túlélési esélye a Nemzeti Rákregiszter adatai alapján [Survival chances of Hungarian cancer patients in the National Cancer Registry]. *Magy Onkol.* 2008;52(4):339-49. Hungarian.
98. Kenessey I, Wéber A, Szilágyi I, Nagy P, Polgár C, Kásler M. Az orvosi kódtárak gyakorlati alkalmazása az onkológiában – szakmai útmutató a Nemzeti Rákregiszter tapasztalatai alapján. *Magy Onkol.* 2022;66(1):4-10. Hungarian.
99. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature.* 2012;487(7407):330-7.
100. Aoki K, Taketo MM. Adenomatous polyposis coli (APC): a multi-functional tumor suppressor gene. *J Cell Sci.* 2007;120(Pt 19):3327-35.
101. 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.
102. Wong SC, Lo ES, Lee KC, Chan JK, Hsiao WL. Prognostic and diagnostic significance of beta-catenin nuclear immunostaining in colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2004;10(4):1401-8.
103. Roy S, Smith MA, Cieply KM, Acquafondata MB, Parwani AV. Primary bladder adenocarcinoma versus metastatic colorectal adenocarcinoma: a persisting diagnostic challenge. *Diagn Pathol.* 2012;7:151.
104. Alomar SY, Mansour L, Abuderman A, Alkhuriji A, Arafah M, Alwasel S, Harrath AH, Almutairi M, Trayhyrn P, Dar JA.  $\beta$ -Catenin accumulation and S33F mutation of CTNNB1 gene in colorectal cancer in Saudi Arabia. *Pol J Pathol.* 2016;67(2):156-62.

105. Perrone F, Lampis A, Orsenigo M, Di Bartolomeo M, Gevorgyan A, Losa M, Frattini M, Riva C, Andreola S, Bajetta E, Bertario L, Leo E, Pierotti MA, Pilotti S. PI3KCA/PTEN deregulation contributes to impaired responses to cetuximab in metastatic colorectal cancer patients. *Ann Oncol.* 2009;20(1):84-90.
106. Yazdani Y, Farazmandfar T, Azadeh H, Zekavatian Z. The prognostic effect of PTEN expression status in colorectal cancer development and evaluation of factors affecting it: miR-21 and promoter methylation. *J Biomed Sci.* 2016;23:9.
107. Frattini M, Saletti P, Romagnani E, Martin V, Molinari F, Ghisletta M, Camponovo A, Etienne LL, Cavalli F, Mazzucchelli L. PTEN loss of expression predicts cetuximab efficacy in metastatic colorectal cancer patients. *Br J Cancer.* 2007;97(8):1139-45.
108. Hsu CP, Kao TY, Chang WL, Nieh S, Wang HL, Chung YC. Clinical significance of tumor suppressor PTEN in colorectal carcinoma. *Eur J Surg Oncol.* 2011;37(2):140-7.
109. Naguib A, Cooke JC, Happerfield L, Kerr L, Gay LJ, Luben RN, Ball RY, Mitrou PN, McTaggart A, Arends MJ. Alterations in PTEN and PIK3CA in colorectal cancers in the EPIC Norfolk study: associations with clinicopathological and dietary factors. *BMC Cancer.* 2011;11:123.
110. Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell.* 1997;88(3):323-31.
111. Sabapathy K, Lane DP. Therapeutic targeting of p53: all mutants are equal, but some mutants are more equal than others. *Nat Rev Clin Oncol.* 2018;15(1):13-30.
112. Hu J, Cao J, Topatana W, Juengpanich S, Li S, Zhang B, Shen J, Cai L, Cai X, Chen M. Targeting mutant p53 for cancer therapy: direct and indirect strategies. *J Hematol Oncol.* 2021;14(1):157.
113. Duffy MJ, Synnott NC, O'Grady S, Crown J. Targeting p53 for the treatment of cancer. *Semin Cancer Biol.* 2022;79:58-67.
114. Caudron-Herger M, Diederichs S. Insights from the degradation mechanism of cyclin D into targeted therapy of the cancer cell cycle. *Signal Transduct Target Ther.* 2021;6(1):311.
115. Otto T, Sicinski P. Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2017;17(2):93-115.



116. Pomerantz J, Schreiber-Agus N, Liégeois NJ, Silverman A, Alland L, Chin L, Potes J, Chen K, Orlov I, Lee HW, Cordon-Cardo C, DePinho RA. The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell*. 1998;92(6):713-23.
117. Ahn ER, Mangat PK, Garrett-Mayer E, Halabi S, Dib EG, Haggstrom DE, Alguire KB, Calfa CJ, Cannon TL, Crilley PA, Gaba AG, Marr AS, Sangal A, Thota R, Antonelli KR, Islam S, Rygiel AL, Bruinooge SS, Schilsky RL. Palbociclib in Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer With CDKN2A Alterations: Results From the Targeted Agent and Profiling Utilization Registry Study. *JCO Precis Oncol*. 2020;4:757-766.
118. Lord CJ, Ashworth A. PARP inhibitors: Synthetic lethality in the clinic. *Science*. 2017;355(6330):1152-1158.
119. Seto T, Pujare D, Song MN, Lee J, Huber R, Sam D, Pan M. Germline BRCA1 Deletion as Driver Mutation for Metastatic Urachal Adenocarcinoma in Patient Who Achieved Complete Response to Rucaparib. *J Oncol Pract*. 2019;15(5):293-295.
120. Yonemori K, Shimizu T, Kondo S, Iwasa S, Koyama T, Kitano S, Sato J, Shimomura A, Shibaki R, Suri A, Kase Y, Sumino S, Tamura K, Yamamoto N. The safety, tolerability and pharmacokinetics of niraparib in Japanese patients with solid tumours: results of a phase I dose-escalation study. *Jpn J Clin Oncol*. 2021;51(5):693-699.
121. Saraswati AP, Relitti N, Brindisi M, Gemma S, Zisterer D, Butini S, Campiani G. Raising the bar in anticancer therapy: recent advances in, and perspectives on, telomerase inhibitors. *Drug Discov Today*. 2019;24(7):1370-1388.
122. Ohnami S, Maruyama K, Chen K, Takahashi Y, Hatakeyama K, Ohshima K, Shimoda Y, Sakai A, Kamada F, Nakatani S, Naruoka A, Ohnami S, Kusuhara M, Akiyama Y, Kagawa H, Shiomi A, Nagashima T, Urakami K, Yamaguchi K. BMP4 and PHLDA1 are plausible drug-targetable candidate genes for KRAS G12A-, G12D-, and G12V-driven colorectal cancer. *Mol Cell Biochem*. 2021;476(9):3469-3482.
123. Simanshu DK, Nissley DV, McCormick F. RAS Proteins and Their Regulators in Human Disease. *Cell*. 2017;170(1):17-33.
124. Huang L, Guo Z, Wang F, Fu L. KRAS mutation: from undruggable to druggable in cancer. *Signal Transduct Target Ther*. 2021;6(1):386.

125. FDA Approves First KRAS Inhibitor: Sotorasib. *Cancer Discov.* 2021;11(8):OF4.
126. Abourehab MAS, Alqahtani AM, Youssif BGM, Gouda AM. Globally Approved EGFR Inhibitors: Insights into Their Syntheses, Target Kinases, Biological Activities, Receptor Interactions, and Metabolism. *Molecules.* 2021;26(21):6677.
127. Dumbrava EEI, Balaji K, Raghav K, Hess K, Javle M, Blum-Murphy M, Ajani J, Kopetz S, Broaddus R, Routbort M, Demirhan M, Zheng X, Pant S, Tsimberidou AM, Subbiah V, Hong DS, Rodon J, Shaw KM, Piha-Paul SA, Meric-Bernstam F. Targeting ERBB2 (HER2) Amplification Identified by Next-Generation Sequencing in Patients With Advanced or Metastatic Solid Tumors Beyond Conventional Indications. *JCO Precis Oncol.* 2019;3:PO.18.00345.
128. De Mello RA, Neves NM, Amaral GA, Lippo EG, Castelo-Branco P, Pozza DH, Tajima CC, Antoniou G. The Role of MET Inhibitor Therapies in the Treatment of Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *J Clin Med.* 2020;9(6):1918.
129. Guo R, Luo J, Chang J, Rekhtman N, Arcila M, Drilon A. MET-dependent solid tumours - molecular diagnosis and targeted therapy. *Nat Rev Clin Oncol.* 2020;17(9):569-587.
130. Chen CH, Shen J, Lee WJ, Chow SN. Overexpression of cyclin D1 and c-Myc gene products in human primary epithelial ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer.* 2005;15(5):878-83.
131. Takahashi Y, Kawate S, Watanabe M, Fukushima J, Mori S, Fukusato T. Amplification of c-myc and cyclin D1 genes in primary and metastatic carcinomas of the liver. *Pathol Int.* 2007;57(7):437-42.
132. Mitani S, Kamata H, Fujiwara M, Aoki N, Tango T, Fukuchi K, Oka T. Analysis of c-myc DNA amplification in non-small cell lung carcinoma in comparison with small cell lung carcinoma using polymerase chain reaction. *Clin Exp Med.* 2001;1(2):105-11.
133. Dang CV, Reddy EP, Shokat KM, Soucek L. Drugging the 'undruggable' cancer targets. *Nat Rev Cancer.* 2017;17(8):502-508.
134. Wang C, Zhang J, Yin J, Gan Y, Xu S, Gu Y, Huang W. Alternative approaches to target Myc for cancer treatment. *Signal Transduct Target Ther.* 2021;6(1):117.
135. Hause RJ, Pritchard CC, Shendure J, Salipante SJ. Classification and characterization of microsatellite instability across 18 cancer types. *Nat Med.* 2016

- Nov;22(11):1342-1350. doi: 10.1038/nm.4191. Epub 2016 Oct 3. Erratum in: *Nat Med*. 2017;23 (10 ):1241.
136. Chang L, Chang M, Chang HM, Chang F. Microsatellite Instability: A Predictive Biomarker for Cancer Immunotherapy. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2018;26(2):e15-e21.
137. Le DT, Durham JN, Smith KN, Wang H, Bartlett BR, Aulakh LK, Lu S, Kemberling H, Wilt C, Luber BS, Wong F, Azad NS, Rucki AA, Laheru D, Donehower R, Zaheer A, Fisher GA, Crocenzi TS, Lee JJ, Greten TF, Duffy AG, Ciombor KK, Eyring AD, Lam BH, Joe A, Kang SP, Holdhoff M, Danilova L, Cope L, Meyer C, Zhou S, Goldberg RM, Armstrong DK, Bever KM, Fader AN, Taube J, Housseau F, Spetzler D, Xiao N, Pardoll DM, Papadopoulos N, Kinzler KW, Eshleman JR, Vogelstein B, Anders RA, Diaz LA Jr. Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science*. 2017;357(6349):409-413.
138. Jones D, Guan JJ, Calagua C, Hansel DE, Epstein JI, Ye H. Primary adenocarcinoma of the bladder lacks mismatch repair deficiency and demonstrates PD-L1 expression in tumor-infiltrating immune cells, with implications in both diagnosis and therapeutics. *Hum Pathol*. 2019;94:58-63.
139. Yu Y. Molecular classification and precision therapy of cancer: immune checkpoint inhibitors. *Front Med*. 2018;12(2):229-235.
140. Le DT, Uram JN, Wang H, Bartlett BR, Kemberling H, Eyring AD, Skora AD, Luber BS, Azad NS, Laheru D, Biedrzycki B, Donehower RC, Zaheer A, Fisher GA, Crocenzi TS, Lee JJ, Duffy SM, Goldberg RM, de la Chapelle A, Koshiji M, Bhajee F, Huebner T, Hruban RH, Wood LD, Cuka N, Pardoll DM, Papadopoulos N, Kinzler KW, Zhou S, Cornish TC, Taube JM, Anders RA, Eshleman JR, Vogelstein B, Diaz LA Jr. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N Engl J Med*. 2015;372(26):2509-20.
141. Overman MJ, McDermott R, Leach JL, Lonardi S, Lenz HJ, Morse MA, Desai J, Hill A, Axelson M, Moss RA, Goldberg MV, Cao ZA, Ledezne JM, Maglinte GA, Kopetz S, André T. Nivolumab in patients with metastatic DNA mismatch repair-deficient or microsatellite instability-high colorectal cancer (CheckMate 142): an open-label, multicentre, phase 2 study. *Lancet Oncol*. 2017;18(9):1182-1191.

142. Galsky MD, Iasonos A, Mironov S, Scattergood J, Donat SM, Bochner BH, Herr HW, Russo P, Boyle MG, Bajorin DF. Prospective trial of ifosfamide, paclitaxel, and cisplatin in patients with advanced non-transitional cell carcinoma of the urothelial tract. *Urology*. 2007;69(2):255-9.
143. Hong JY, Choi MK, Uhm JE, Park MJ, Lee J, Park SH, Park JO, Kim WS, Kang WK, Lee HM, Choi HY, Lim H. Palliative chemotherapy for non-transitional cell carcinomas of the urothelial tract. *Med Oncol*. 2009;26(2):186-92.

## 9. Saját publikációk jegyzéke

### 9.1 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.
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. German.
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, Rübber 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.

### 9.2 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 Jun 11.
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.
3. Olah C, Hahnen C, Nagy N, Musial J, Varadi M, Nyiro G, Gyorffy B, Hadaschik B, Rawitzer J, Ting S, Sjødahl 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.

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. Hungarian.

## 10. Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt hálámat szeretném kifejezni a Semmelweis Egyetem Urológiai Klinika igazgatójának, az urológiai program vezetőjének, Nyirády Péter professzor úrnak, hogy bizalmával kitüntetett és helyet biztosított nekem a Klinikán. Köszönöm, hogy az első pillanattól kezdve ösztönzött a tudományos munkára és jóvoltából egy megújult kutatólaboratóriumban dolgozhattam, korszerű eszközökkel a doktori képzésem folyamán.

Hálás köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőmnek, Professzor Szarvas Tibornak, aki megismerkedésünktől fogva biztatott a kutatói pálya választásában. Munkám során megismertette és megszeretette velem az urológia témakörét, lelkiismeretesen támogatott, illetve mindig a segítségemre volt. Iránymutatásával elsajátítottam a kutatásomhoz nélkülözhetetlen technikák pontos kivitelezését, hasznos tanácsai révén pedig az eredmények helyes kiértékelését. Témavezetőmnek köszönhetem továbbá, hogy megtanultam hogyan kell cikket írni, melyet nagy alaposággal és figyelemmel korrektúrázott, aminek köszönhetően az színvonalas lapban jelenhetett meg. Ezen felül fáradhatatlanul támogatott számos hazai és egy nemzetközi konferenciára való felkészülésben is, melyek remek lehetőséget nyújtottak számomra a szakmai életbe való betekintésre. Szeretném megköszönni, hogy lehetőséget biztosított a saját kutatási témámon túl más kutatási projektben is aktívan részt vehettem, mellyel tovább gyarapíthattam a szakmai tapasztalatom, valamint, hogy a Klinikán folyó mintagyűjtés menetével is megismertett.

Öszinte hálámat és köszönetemet szeretném kifejezni PhD társaimnak: Keresztes Dávidnak, Hermann-Várad Melindának és Pásztor-Csizmarik Anitának, akikkel jó hangulatban teltek a dolgozó hétköznapok. Pályám elején Dávid vezetett be az UrC-s minták rendszerezésébe és a mintafeldolgozás folyamatába, illetve a későbbiekben is mindig számíthattam a szakmai segítségére. Melindának hálásan köszönöm, hogy szorgalmával és kitartásával mindvégig ösztönzött engem, szakmai kérdésekben mindig készségesen a segítségemre volt. Valamint végül, de nem utolsó sorban szívből köszönöm Anitának, akivel együtt kezdtük el a PhD képzésünket az Uroonkológiai Kutatólaboratóriumban. Közös éveink alatt a szakmai kapcsolat igaz barátsággá alakult át, amiért nem lehetek elég hálás. Mindvégig támogatott emberileg is és átsegített a nehezebb időszakokon. Együtt készültünk és gyakoroltunk a megmérettetésekre és

izgultunk egymásért mindvégig. Emellett természetesen szakmailag is élvezhettem támogatását, számtalan dolgot tanulhattam meg tőle az elmúlt évek alatt.

Hálámat szeretném kifejezni a doktori értekezésem létrejöttéhez nagyban hozzájáruló kollaborációs partnereinknek is, akik nélkül nem sikerült volna létrehozni ezt a nagy adat és szövetbankot e két ritka tumorentitásból. A hazai gyűjtés nem jöhetett volna létre Dr. Kenessey István nélkül, aki a Nemzeti Rákregiszter központi vezetője, és munkatársai nélkül, akik idejüket nem sajnálva, alkalom adtán manuálisan néztek át több száz beteg adatot. Nemzetközi kollaborációs partnereink közül szeretném kiemelni az esseni kutatócsoport tagját, Dr. Henning Reist, aki fáradtságot nem kímélve számtalan minta kikeresésével, patológusként a tumoros minták meghatározásával és az immunhisztokémiai kísérletek gondos kivitelezésével nagyban hozzájárult a színvonalas eredmények létrejöttéhez. Az Urológiai Klinika munkatársai közül külön köszönetet szeretnék mondani Dr. Szendrői Attilának és Dr. Kubik Andrásnak, akik mindig segítségemre voltak az *Urachus Hungaricus* projekt keretein belül a mintagyűjtésben és a klinikai adatok ellenőrzésében.

Hálával tartozom továbbá az I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet munkatársainak, többek között Kovalszky Ilona professzor asszonynak, aki az általa vezetett Molekuláris Patológiai Laboratóriumban lehetőséget biztosított számomra, hogy a munkámhoz szükséges kísérletek egy részét elvégezhessem, illetve mindig készségesen segített a metszeteink kiértékelésében. A Laboratórium további munkatársainak, Egedi Krisztinának és Császár Krisztinának is hálás köszönettel tartozom, amiért kérdéseimmel bármikor fordulhattam hozzájuk, mindig segítőkészen és nagy szakértelemmel válaszolták meg azokat. Köszönettel tartozom az Intézet további munkatársának, Tamási Annának, aki mindig készségesen állt rendelkezésemre a blokkok metszése kapcsán.

Köszönetet szeretnék mondani továbbá Prof. Dr. Bödör Csabának, a HCEMM-SE Molekuláris Onkohematológiai Kutatócsoport vezetőjének, és munkatársának, Hegyi Lajosnak, akik nem csupán rendelkezésemre bocsájtották a QCI programot, hanem türelmesen, alaposan elmagyarázták annak használatát és segítségemre voltak a kérdéseim kapcsán.

Végül, de nem utolsó sorban köszönetemet szeretném kifejezni azoknak, akiknek a legtöbbet köszönhetek, a Családomnak és Barátaimnak. Hálásan köszönöm Szüleimnek, hogy szeretetben és biztonságban neveltetek fel, akikre mindig



számíthattam, valamint, hogy olyan nyugodt környezetet biztosítottak számomra, amivel a tanulmányaimra koncentrálni tudtam mindvégig. A Testvéremnek, aki mindig szakított időt Rám, és felvidített, amikor szükségem volt rá. Végezetül annak az embernek szeretnék köszönetet mondani, aki nélkül ez az értekezés nem jöhetett volna létre, és aki nélkül nem lennék az, aki ma vagyok. Köszönet a Férjemnek, aki mindig mellettem állt, biztatott, és a nehéz időszakokon átsegített. Köszönet illeti továbbá azokat, akik szintén állandó jelleggel biztattak a háttérből, köszönöm a barátaimnak Dórinak, Anitának, Evelinnek, akik mindig kiálltak mellettem, támogattak és tartották bennem a lelket amikor a legnagyobb szükségem volt rá.