Connexinek és sejtkommunikációs csatornák szerepe az emlőrák progressziójában és prognózisában

Doktori értekezés

Dr. Teleki Ivett

Semmelweis Egyetem
Patológiai Tudományok Doktori Iskola

Témavezető: Dr. Krenács Tibor, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Hivatalos bírálók: Dr. Vörös András, Ph.D., egyetemi adjunktus
Dr. Lotz Gábor, Ph.D., egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Schaff Zsuzsa, MTA levelező tagja, professzor emerita
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Simon Károly, egyetemi magántanár, osztályvezető főorvos
Dr. Langmár Zoltán, Ph.D., részlegvezető főorvos

Budapest
2015

TARTALOMJEGYZÉK

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE 5

2. BEVEZETÉS 7

2.1. Emlőrákok 7

2.1.1. Epidemiológia.....7

2.1.2. Diagnosztika 7

2.1.3. Az emlőrák szövettani típusai 8

2.1.4. Kezelés.....8

2.1.4.1. Sebészi kezelés 8

2.1.4.2. Sugárterápia 8

2.1.4.3. Gyógyszeres kezelés.....8

2.1.4.4. A primer szisztémás kezelésre adott válasz megítélése.....9

2.1.5. Prognosztikus és prediktív markerek.....11

2.2. Sejtkapcsoló struktúrák, gap junction, connexinek 12

2.2.1. Gap junction és connexin fehérje felépítése, előfordulása 13

2.2.2. Gap junction csatornák összeszerelődése és lebomlása 15

2.2.3. Gap junction és connexinek funkciója.....16

2.2.4. Connexinek és betegségek.....17

2.2.5. Connexin fehérjék expressziója és szerepük normál emlőszövetben és emlőrákban18

3. CÉLKITŰZÉSEK 20

4. MÓDSZEREK 21

4.1. Hazai beteganyag.....21

4.2. Külföldi beteganyag 21

4.3. Connexin expresszió in silico analízise.....23

4.4. Szöveti multiblokkok.....25

4.5. Hormonreceptorok vizsgálata.....26

4.6. A connexinek és a proliferáció immunhisztokémiai vizsgálata 27

4.7. A metszetek digitalizálása és értekelése.....28

4.8. A neoadjuváns terápiára adott regressziós válasz megítélése szövetttani és klinikai klasszifikációs rendszerekkel 29

4.9. Adatbázisok elemzése, statisztikai értékelés 30

5. EREDMÉNYEK 32

5.1. A connexin mRNS expresszió prognosztikus értéke in silico analízis alapján 32

5.1.1. Affymetrix adatbázis 32

5.1.2. Illumina adatbázis.....35

5.2. Connexin fehérjék kifejeződése normál emlőben 37

5.3. Connexin fehérjék kifejeződése primer emlőrákokban és összehasonlítása prognosztikus faktorokkal 39

5.4. Connexin fehérjék önnálló prognosztikus értéke 40

5.5. Connexin fehérjék kifejeződése neoadjuváns terápia előtt és után 42

5.6. Connexinek kifejeződésének összefüggése klinikopatológiai paraméterekkel neoadjuváns terápia előtt és után.....45

5.7. Neoadjuváns kezelésre adott terápiás válasz megítélésére használatos klasszifikációs rendszerek összefüggése beteganyagunkban a túléléssel 46

5.8. Klasszifikációs rendszerek közti átfedések neoadjuvánsan kezelt beteganyagunkban47

5.9. Connexin fehérjék kifejeződésének prognosztikus értéke a klasszifikációs rendszerekben 48

5.10. Cx26 és Cx46 kifejeződésének prognosztikus értéke neoadjuvánsan kezelt primer emlőrákokban 51

6. MEGBESZÉLÉS 53

7. KÖVETKEZTETÉSEK.....63

8. ÖSSZEFOGLALÁS 65

9. ABSTRACT 66

10. IRODALOMJEGYZÉK 67

11. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE.....81

11.1. Az értekezés témájában megjelent közlemények 81

11.2. Egyéb témában megjelent közlemények 81

12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....83

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

APERT: akcelerált parciális emlőbesugárzás

ATP: adenozin triszfoszfát

BMRS1: breast cancer metasztázis suppressor 1

cAMP: ciklikus adenozin monofoszfát

CI: konfidencia intervallum

CMTX: Charcot-Marie-Tooth betegség

CPS EG: Clinical Pathological Stage combined with Estrogen receptor status and Grade

Cx: connexin

DMFS: távoli áttétmentes túlélés

EKV: erythrokeratoderma variabilis

ER: ösztrogén receptor

EWGBSP: European Working Group for Breast Screening Pathology

FNAB: vékonytű biopszia

GJ: gap junction

GJIC: gap junction intercellularis kommunikáció

GnRH: gonadrotrop releasing hormon

HER2: humán epidermális növekedési faktor receptor 2, és azonos nevű emlőrák alcsoport

HE: hematoxilin-eosin

HR: hormonreceptor

IDC: invazív ductalis carcinoma

ILC: invazív lobularis carcinoma

LN: nyirokcsomó

MI: mitotikus index

NPI: Nottingham prognosztikus index

NSABP: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project

ODDD: oculodentodigitalis dysplasia

OS: teljes túlélés

pCR: patológiai komplett remisszió

pINV: szövettanilag van kimutatható tumor

PgR: progeszteron receptor

PST: primer szisztémás terápia

RFS: relapszusmentes túlélés

SD: standard deviáció

TMA: ”tissue microarray”, szöveti multiblokk

TNBC: tripla negatív emlőrák alcsoport

WHO: Egészségügyi Világszervezet

2. BEVEZETÉS

2.1. Emlőrákok

2.1.1. Epidemiológia

Az emlőrák népegészségügyi problémát jelent. 2012-ben a második leggyakrabban diagnosztizált daganat (1,67 millió) volt világszerte (1). Magyarországon 2012-ben a rákregiszternek bejelentett esetek száma 7915 volt. A nyugati fejlett országokban és Magyarországon is az egyik legnagyobb mortalitással járó megbetegedés. A halálozási ráta 1951 és 1990 között a legtöbb európai államban emelkedett. Ezt követően azonban csökkenés mutatkozott, köszönhetően a szűrővizsgálatoknak, a korai diagnózisnak és a személyre szabott terápiának (2). Magyarországon is csökkenést mutat a mortalitás, azonban az emlőrák prevalenciája évről évre nő a nyugatias életmód, az elhízás, a későbbi életkorra tolódott gyermekvállalás miatt.

2.1.2. Diagnosztika

Az emlő képalkotó vizsgálatai közül a nem tapintható elváltozások kimutatására a mammográfia a legjobb módszer, amelyet önmagában szűrővizsgálat céljából végzünk. A szűrés nagy arányban képes csökkenteni az emlőrák mortalitását (3). Harminc év alatti nőknél az elsőnek választandó diagnosztikus vizsgálat az ultrahang. Javasolt azoknál a betegeknél is, akiknél a röntgen vizsgálat bizonytalan eredményt ad. Mágneses rezonancia valamint pozitron emissziós tomográfia csak akkor jön szóba, ha a röntgen és ultrahang vizsgálattal a tumor jelenléte kérdéses (4).

Tapintható elváltozások illetve szűrés során kiemelt daganatok műtét előtti tipizálása ultrahang vezérelt vékonytű biopsziával (FNAB) vagy vastagtű biopsziával (core) történik (5). Az intraoperatív fagyasztásos szövettani vizsgálatok egyre inkább háttérbe szorulnak a komplex preoperatív radiológiai, citológiai és szövettani vizsgálatok miatt. Diagnózist követően a beteg személyre szabott terápiáját több szakemberből álló csoport, ún. oncoteam határozza meg.

2.1.3. Az emlőrák szövettani típusai

Az emlő malignus daganatainak nagy része hám eredetű, ún. carcinoma, kisebb részük stromális eredetű, ún. sarcoma. Szövettani osztályozásuk a World Health Organisation (WHO) alapján történik.

A legújabb, 2013 WHO alapján leggyakoribb szövettani típus az invazív emlőrák, külön ductalis elnevezés már nem szükséges (6). Gyakoriságban ezt követi az invazív lobuláris carcinoma. Ezen kívül vannak ritkábban előforduló tumorok, így tubuláris, cribriform, mucinosus, medullaris, mikropapilláris, inflammatórikus carcinoma, az emlő Paget-kórja stb.

2.1.4. Kezelés

2.1.4.1. Sebészi kezelés

Napjainkban egyre inkább előtérbe kerülnek az emlőmegtartó műtétek, amelynek feltétele a korai diagnózis. A nem tapintható tumor műtét előtti dróthorgos jelölésére illetve radioizotópos jelölésére van lehetőség. A tumor eltávolítása az azonos oldali hónalji ún. őrszem (sentinel) nyirokcsomó eltávolításával együtt történik. Gondos feldolgozás során, amennyiben az őrszem nyirokcsomó tumormentes, úgy az axilláris nyirokcsomók eltávolítása nem szükséges (7, 8).

2.1.4.2. Sugárterápia

Korai invazív emlőrák szervmegtartó műtétjét követően a teljes maradék emlő besugárzása mára standard kezeléssé vált (9). Ugyanakkor korai stádiumú, alacsony rizikójú emlőrákok esetén csak a tumorágyra és közvetlen környezetére korlátozott ún. akcelerált parciális emlőbesugárzással (APERT) is hasonló eredmények érhetőek el (10). Mastectomiát követően, ha 4 vagy több hónalji nyirokcsomó metasztázis van, az axillára adott sugárterápia javítja a betegek túlélését (11).

2.1.4.3. Gyógyszeres kezelés

Az emlőrákok gyógyszeres kezelésére a kemoterápia, az endokrin terápia valamint a biológiai terápia jön szóba. A gyógyszeres kezelés alkalmazható műtét előtt (neoadjuváns/primer szisztémás kezelés), műtét után (adjuváns), valamint előrehaladott

emlődaganatok során az életminőség javítására (palliatív). Korai emlőrákok esetében a gyógyszeres terápia ajánlott, míg előrehaladott emlőrákoknál csaknem kizárólagos (12).

Kemoterápiás kezelésben a polikemoterápia előnyt élvez a monoterápiával szemben. Manapság az antraciklin alapú kombinációkat és a taxán származékokat részesítik előnyben.

Az endokrin terápia lényege az ösztrogénhatás csökkentése receptor szinten tamoxifennel vagy szintézis szinten GnRH (gonadrotrop releasing hormon) analóggal. A terápia javasolt minden ER (ösztrogén receptor) pozitív tumor esetében.

A biológiai terápiát HER2 (human epidermális növekedés faktor receptor 2-es típusa) pozitív daganatok esetében egy monoklonális antitest, a trastuzumab, illetve egy tirozin-kináz inhibitor, a lapatinib alkalmazása jelenti (13). Lehetőség van a tumor érújraképződés gátlására is monoklonális antitesttel (bevacizumab) (14). Ezen kívül klinikai vizsgálat alatt vannak (fázis I-III) mTOR illetve PI3K gátlók is, amelyeknek az endokrin terápia rezisztens tumorok kezelésében lehet fontos szerepük (15). Az emlőrák komplex onkológiai kezelése magában foglalja a sebészi eltávolítást, a gyógyszeres kezelést és a sugárterápiát együttvéve.

2.1.4.4 A primer szisztémás kezelésre adott válasz megítélése

Számos klasszifikációs rendszer létezik a neoadjuváns kemoterápia/primer szisztémás terápiára (PST) adott válasz megítélésére. A legtöbb közülük az emlőben és az axillában visszamaradt tumor mennyiségét veszi figyelembe (NSABP, Miller-Payne, Sataloff, EWGBSP, CPS EG) (**1. táblázat**) (16-20). Ezzel szemben a CPS EG rendszer a klinikai és patológiai kiterjedtséget, a magi grade-t valamint a hormonreceptor státuszt veszi figyelembe (21, 22).

A mai napig nincs azonban olyan megbízható biomarker a kezünkben, amely előre jelezné PST-re adott választ.

1. táblázat. *Neoadjuváns terápia hatékonyságát felmérő néhány klasszifikációs rendszer.*

Klasszifikációs rendszer		Patológiai válasz
[1]NSABP	pCR	Szövettanilag nincs kimutatható tumorsejt
	pINV	Szövettanilag van kimutatható tumor
Miller-Payne	Primer tumor (Grade-G)	
	1	A malignus sejtek változnak, de számuk nem csökken a kezelést megelőző biopsziával összehasonlítva
	2	A tumorsejtek kis arányú csökkenése figyelhető meg, de a teljes tumormennyiség még magas (<30%)
	3	A tumorsejtek közepes fokú csökkenése látható, bár a 90%-ot nem éri el (30-90%)
	4	A tumorsejtek nagy része eltűnt, csak kis csoportjaik maradtak meg (>90%)
	5	Nincs invazív tumor vagy csak in situ tumor vagy tumor stroma mutatható ki
	Nyirokcsomó (N) válasz	
	1	Nyirokcsomó negatív
	2	Nyirokcsomó pozitív és nincs terápiás hatás
	3	Nyirokcsomó pozitív és van részleges terápiás hatás
	4	A nyirokcsomó kezelés hatására negatívvá vált
Sataloff	Primer tumor (T)	
	A	Teljes vagy közel teljes terápis hatás
	B	Több mint 50%-os terápiás hatás, de a teljest ill. közel teljest nem éri el
	C	Kevesebb, mint 50%-os hatás
	D	Nincs terápiás hatás
	Nyirokcsomó (N)	
	A	Van terápiás hatás, áttét nem mutatható ki
	B	Nincs metasztázis vagy terápiás hatás
	C	Van terápiás hatás, de áttét kimutatható
	D	Áttét kimutatható, nincs terápiás hatás
EWGBSP	Primer tumor (TR)	
	1	Teljes patológiai regresszió
	a	Nincs reziduális carcinoma
	b	Nincs reziduális invazív carcinoma, de van reziduális DCIS
	2	Részleges terápiás válasz
	a	Minimális (<10%) reziduális (invazív) daganat
	b	egyértelmű terápiás válasz 10-50% közötti reziduális (invazív) daganattal
	c	Egyértelmű terápiás válasz, de >50% reziduális (invazív) daganattal
	3	Nincs regresszióra utaló jel
	Nyirokcsomók (NR)	
	1	Nincs metasztázis, regressziós jelek sem láthatóak
	2	Nincs metasztázis, de regresszió jelei láthatóak

Klasszifikációs rendszer		Patológiai válasz		
EWGBSP	Nyirokcsomók (NR) 3 4	Metasztázis, regresszió jeleivel Metasztázis, regressziós jelek nélkül		
CPS EG	0-6	Klinikai stage I;IIA=0 IIB;IIIA=1 IIIB;IIIC=2	Pontozás Patológiai stage 0;I=0 IIA/B=1 IIIA/B=1 IIIC=2	Tumor marker ER negatív=1 G3[4]=1

[1]NSABP: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project
[2]EWGBSP: European Working Group for Breast Screening Pathology;
[3]CPS EG: Clinical Pathological Stage combined with Estrogen receptor status and Grade by M.D. Anderson Center (MDACC)
[4]G3: grade 3

2.1.5. Prognosztikai és prediktív markerek

A mindennapi gyakorlatban számos prognosztikai és prediktív marker használatos. Számos közülük azonban csak korlátozott jelentőséggel bír. A beteg életkora a diagnózis időpontjában fontos információ. A fiatal korban (35 év alatt) kialakuló emlőrák rosszabb prognózisú és rövidebb túlélésre lehet számítani (23). A tumor mérete szintén fontos információval szolgálhat a daganat felfedezésekor. Általánosságban elmondható, hogy a kisebb daganat jobb prognózissal bír (24). Az egyik legrégebb óta használt és nagyon fontos információval szolgáló prognosztikus tényező a nyirokcsomó áttét, vagy annak hiánya a daganat felfedezésekor (25).

A mindennapi gyakorlatban szintén használt szövettani grade, Nottingham Prognostic Index (NPI= 0,2x tumor méret+hónalji nyirokcsomó státusz +grade), érbetörés, nekrózis, p53 kifejeződés, szintén hasznos lehet, bár sokszor csak korlátozott információt ad (16, 26, 27).

Nagy érdeklődés övezi a sejtciklus szabályozásban szereplő molekulák kifejeződése, a sejtciklus frakciók elemzése és az emlőrák prognózisának kapcsolatát, ami a daganatok agresszivitásáról adhat tájékoztatást (28). Például, a Ki67 és a geminin pozitív sejtfrakciók szignifikáns emelkedését megfigyelték metasztatizáló emlőrákokban (29).

Immunhisztokémiai vizsgálatokkal az emlőrák altípusai jól elkülöníthetők. Az E-cadherin kifejeződés alapján a ductális (pozitív) és a lobuláris (negatív) emlőrákok nagy biztonsággal elkülöníthetők. Ezen kívül a hormonreceptor státusz (ösztrogén- és progeszteron-receptor/ER, PgR), valamint HER2 expresszió meghatározásával olyan,

genetikai vizsgálatokkal is alátámasztott, különböző fenotípusú daganatok differenciálhatók, amelyek eltérő klinikai kimenettel jellemezhetők (30). Expressziós profiljuk alapján megkülönböztetünk hormon receptor pozitív és negatív daganatokat. A hormon receptor pozitív tumorok proliferációs aktivitásuk alapján lehetnek luminalis A (Ki67<20%) illetve luminalis B (Ki67>20%) típusúak. A hormon receptor negatív tumorok lehetnek HER2 pozitívak, amelyek fokozott HER2 fehérje expressziót és génamplifikácót mutatnak, valamint receptor negatívak, ún. tripla negatív tumorok (TNBC: ER-, PgR-, HER2-). Utóbbiakon belül bazális típusú, valamint alacsony claudin szintet mutató (claudin low) daganatokat különböztetünk meg. A hormon receptor negatív tumorok rosszabb prognózissal bírnak. A HER2 pozitivitás szintén negatív prognózist jelent. A claudin low alcsoportra a fokozott terápia rezisztencia jellemző (31).

Napjainkban a genomika térhódításával RNS szintű vizsgálatok segítségével a tumorok minél pontosabb egyedi karakterizálására törekszenek. Ilyenek az Agendia Mammaprint, a Genomic Health Oncotype Dx valamint az Ipsogen Mapquant DX. Ezek a sokgénes eljárások, fagyasztott tumorszövetet igényelnek és drágák (32-34). Az emlőrák molekuláris jellemzése lehetőséget ad olyan klinikailag releváns alcsoportok létrehozására, amelyek prognosztikai jelentőségűek és a kezelésre adott válasz előrejelzését is támogatják (prediktívek). Így a személyre szabott terápia optimalizálható. Napjainkban célzott/molekuláris célpontú eljárások is hozzáférhetőek és számos fázis vizsgálat is folyik.

2.2. 2.2 Sejtkapcsoló struktúrák, gap junction, connexinek

A multicellularitás alapvető feltétele a sejtek kommunikációja és funkciójuk összehangolása. Ez alapvetően két úton jöhet létre: receptor-ligand interakcióval és direkt sejt-sejt kommunikáció útján. Az előbbi különböző szolubilis növekedési faktorok és sejthez kötött ligandok, vagy adhéziós molekulák és kapcsolódó receptorok segítségével valósul meg sejt-sejt, ill. sejt-matrix viszonylatban. Receptor-ligand kapcsolódás során, a sejtmembrán receptoron átjutó jel másodlagos hírvivőkön keresztül terjed (pl. Ca^{2+}, MAPK, Akt/mTOR, STAT stb…jelutakon), hogy a sejtmagban megfelelő adaptációs választ indukáljon. Ez a fajta kommunikáció viszonylag időigényes (35). Ezzel szemben a metabolikus direkt sejt-sejt kommunikáció

rendkívül gyors és szabályozott jelátvitelt tesz lehetővé. Ennek magyarázata az, hogy a sejtek citoplazmái sejtmembrán csatornákon keresztül közvetlen kapcsolatban állnak egymással, így ionok, kis molekulasúlyú metabolitok és szabályozó molekulák az extracellularis tér kizárásával közvetlenül juthatnak az érintkező szomszédos sejtekbe. Ez utóbbi mechanizmus az ún. gap junction (GJ) csatornákon keresztül valósul meg. A csatornák connexin fehérjékből formálódnak a szomszédos sejtek között és szelektív permeabilitást tesznek lehetővé az 1-1,8 kDa nagyságú metabolitok, morfogének, másodlagos hírvivők (Ca^{2+}, IP_3, cAMP, glükóz, linearizált peptidek stb…) számára. Ezen kívül gap junction csatornák segítségével a két sejt közti távolság jelentősen csökken, szoros adhéziót biztosítva ezzel (36).

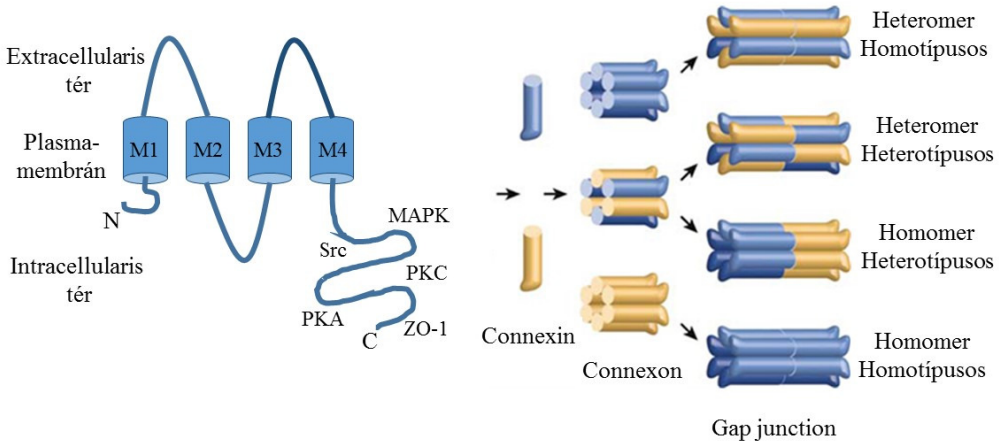
2.2.1. Gap junction és connexin fehérje felépítése, előfordulása

A gap junction kommunikációs csatorna connexonnak nevezett, egymással szemben álló ún. félcsatornákból épül fel. A félcsatornát 6 connexin (Cx) alkotja. Homotípusos a csatorna amennyiben a szemben álló connexon félcsatornák egyformák, heterotípusos ha nem. A félcsatorna lehet homomer, ha azonos connexinekből épül fel és heteromer ha különböző connexinek alkotják (**1. ábra**). Ezek alapján 4 különböző intercellularis csatorna fordulhat elő: homomer homotípusos, homomer heterotípusos, heteromer homotípusos és heteromer heterotípusos (36). Cx26-ból és Cx32-ből álló heterotípusos csatorna található például a májsejtek között. Cx46-ból és Cx50-ből álló connexon figyelhető meg a szemlencsében, Cx43 és Cx45 connexonok találhatóak a myocardiumban. A legtöbb szövetben a connexon homomer. Nem minden connexin képes heteromer vagy heterotípusos kapcsolatra. A Cx26 például nem tud a Cx43-mal kapcsolódni (37).

Emberben összesen 21 különböző connexin gént klónoztak (**2. táblázat**). Egy szövetben általában több mint egyféle izotípus fordul elő. Érett vörösvértestben, érett harántcsíkolt izomban, valamint az érett spermiumban nem mutatható ki connexin molekula. A legősibb és leggyakrabban előforduló a Cx43 izotípus. Mindegyik connexinnek hasonló a szerkezete (**1. ábra**) (38). Ún. négy-transzmembrán fehérjék, amelyek két extracellularis és 1 intracellularis loop-ot valamint egy N és egy C terminalis véget tartalmaznak. A molekula mindkét vége a sejten belül helyezkedik el. Az N terminalis szakasz fontos szerepet játszik a csatorna feszültség-szabályozásában.

A két extracellularis huroknak a szomszédos félcsatornák összekapcsolódásában van szerepe, kialakítva ezzel a funkcionáló gap junction csatornákat. A membránon átívelő domének szerepe kevésbé ismert. A harmadik (3M) transzmembrán domén formázza a csatorna belső falát, így az izotípusok szelektív áteresztőképességében van döntő szerepe. A többi transzmembrán szakasz a transz-Golgi régióban összeállt connexin csatornák sejtmembrába történő transzportjában és a csatornák stabilizálásában fontos. A molekula legvariábilisabb régiója a C terminalis, amelyen számos foszforilációs hely található (MAP-kináz, PKC, PKA, CK1), melyek szerepe a csatornák összeszerelődésében, transzportjánban, valamint a csatornák nyitásának és zárásának szabályozásában van.

Két nevezéktan használatos a connexinek megjelölésére. Az egyik és egyben elterjedtebb a molekulatömegükre utal (Cx43=43 kDa). A másik különböző alosztályokba sorolja a connexineket (α, β, γ vagy δ) a C terminalis vég hasonlósága és hossza szerint (39).



1. ábra. *Connexin molekula szerkezete és a Gap junction csatornák felépítése/ Mese közleményéből módosítva (36).*

2. táblázat. *A connexin (Cx) molekulacsalád kromoszomális előfordulása és megjelenése emberi szervezetben.*

Típus	Gén	Kromoszóma	Előfordulás
Cx23	na	6	na
Cx25	na	na	na
Cx26	GJB2	13	máj, bőr, emlő
Cx30	GJB6	13	bőr
Cx30.2	GJE1	7	agy
Cx30.3	GJB4	1	bőr
Cx31	GJB3	1	bőr
Cx31.1	GJB5	1	bőr
Cx31.9	GJA11	17	here
Cx32	GJB1	X	máj, Schwann-sejt
Cx36	GJA9	15	retina, neuron
Cx37	GJA4	1	érendothel
Cx40	GJA5	1	szív, bőr
Cx40.1	na	10	harántcsíkolt izom
Cx43	GJA1	6	legtöbb szolid szövet
Cx45	GJA7	17	szív, bőr
Cx46	GJA3	13	szemlencse
Cx47	GJA12	1	oligodendrocyta
Cx50	GJA8	1	szemlencse
Cx59	GJA10	1	na
Cx62	na	6	retina

na: nincs adat

2.2.2. 2.2.2. Gap junction csatornák összeszerelődése és lebomlása

A connexinek féléletideje meglehetősen rövid, mindössze néhány óra, a Cx43 izotípusúaké 60-90 perc. Ez lehetővé teszi a környezeti változásra adott gyors adaptációs válaszukat akár felül-, akár alulregulációval (40). A connexinek az endoplazmás retikulumban szintetizálódnak és vagy itt, vagy a Golgi apparátusban szerelődnek össze félcsatornává. Innen vagy közvetlenül kerülnek ki a sejtmembránra vesiculába csomagoltan. A sejtmembránon ún. plakkokba (10-10000 csatorna) rendeződnek és vagy félcsatornaként vagy intercellularis gap junction csatornaként működnek. Az új csatornák mindig a plakk szélén, a régebbiek pedig a plakk belsejében

találhatóak. Az elöregedett csatornák ubiquitinálódhatnak és ún. connexosomákat alkothatnak és a lysosomákban vagy proteosomákban degradálódhatnak.

2.2.3. Gap junction és a connexinek funkciója

A connexin csatornák jelentőségét jól mutatja szerkezetük evolúciós konzerváltsága, ubiquiter és szolid szövetekben való nagy mennyiségű előfordulásuk (41, 42). A connexinek a sejtosztódás, a proliferáció és az apoptosis befolyásolása révén gap junction csatornaként és félcsatornaként egyaránt fontos szerepet játszanak a sejtek homeosztázisában. Csatornaként részt vesznek az akciós potenciál továbbításában például a szívben. Félcsatornaként parakrin szignálok továbbítását végzik (cAMP, ATP, Ca^{2+}) (40). Ezen kívül intracellularis fehérje-fehérje interakciót képesek létrehozni onkogén termékekkel, protein kinázokkal, citoszkeletális fehérjékkel és tigh junction struktúrákkal (ZO1-2) egyaránt (41-45). Tehát funkcionáló connexin molekulák kimutathatók a sejtmembránon kívül (csatorna-független funkciók) a citoplazmában is (46).

A gap junction csatornán keresztüli kommunikáció negatív összefüggést mutat a sejt osztódásával. Tanulmányok kimutatták, hogy a GJIC csökken késői G1, S és M fázisban is (47). Ezen kívül a connexinek jelenléte pozitív összefüggést mutat az apoptotikus kapacitással. Számos kísérleti modell alátámasztotta, hogy connexin gén transzfektálása elősegítette a sejtek apoptózisát (48, 49). A sejthalál összefüggésbe hozható a Ca^{2+} szint megváltozásával, amely connexin csatornákon könnyen cserélődhet.

A connexinek és a gap junction csatornák szerepét a carcinogenesisben már régen felvetették (50). Habár a connexinek dysplasiákban és korai rákokban fokozottabban expresszálódhatnak (51), kifejeződésük és funkciójuk rendszerint csökken malignus tumorokban (52) és teljesen el is tűnhet előrehaladott daganatokban (53). A legújabb kutatások azonban arra engednek következtetni, hogy a connexinek expressziója a tumor progressziója során dinamikusan változhat (54). Egyesek tumorszupresszorként hatnak, mások elősegíthetik a tumor progresszióját metasztatizáló képességük növelésével. A diapedesis során például a connexin az endothel sejttel léphet kapcsolatba (55, 56). Ezen kívül olyan izotípusok is megjelenhetnek a daganatban, amelyeket az adott normál szövet nem expresszál (57).

2.2.4. Connexinek és betegségek

A connexinek fontos szerepet játszanak az embriogenesisben. Már 2-4 sejtes embrióban kimutatható a Cx30, Cx31, Cx36, Cx43, Cx45 és Cx47. Ezen kívül Cx43-nak az implantációban van fontos szerepe. Cx37 figyelhető meg az oocyta és a granulosa sejtek között. A gén mutációja női sterilitást okoz (58).

Connexin gén mutációkat igazoltak számos nemdaganatos öröklött humán megbetegedésben. A Charcot-Marie-Tooth (CMTX) betegség volt az első, amelyet leírtak a connexinek károsodásával kapcsolatban. A CMTX jellemzően X-hez kötött, progresszív demielinizációval és motoros valamint szenzoros neuropátiával járó megbetegedés. Hátterében a Cx32/GJB1 gén mutációja áll. Összesen több mint 160 féle mutációt írtak le (missense, nonsense, frameshift, deléció). A mutációk következtében a Schwann-sejtek tápanyagellátása, így következményesen az ideg károsodik (59).

A Cx26/GJB2 mutációit írták le ún. nem-szindrómás süketségben is. A mutáció lehet autoszomális domináns (DFNA3) és autoszomális recesszív is (DFNB1). A betegség jellemzően a cochleát érinti, ahol a K^+ transzportjában történik zavar. Ezidáig összesen 21 különféle mutációt írtak le a betegséggel összefüggésben (37).

A Cx31/GJB3 mutációi süketséget, valamint bőrbetegséget, az ún. erythrokeratoderma variabilist (EKV) okozzák. Cx50/GJA8 mutációt találtak az ún. „zonular pulverulent" szürkehályogban. A Cx46/GJA3 mutációit írták le familiáris autoszomális domináns kongenitális cataractában. (37, 60).

A Cx47/GJA12 mutációja okozza a Pelizaeus-Merzbacher-szerű betegséget, amelyre a központi idegrendszeri fehérállomány progresszív degenerációja, hypomyelinizációs leukoencephalopathia jellemző. A betegség autoszomális domináns öröklődést mutat, amely fizikális és mentális leépüléssel jár (61).

A Cx43/GJA1 mutációit szívfejlődési rendellenességgel hozzák összefüggésbe (62). Ugyancsak ennek a génnek a mutációja okozza az oculodentodigitalis dysplasiát (ODDD), amely testszerte csontfejlődési rendellenességekkel jár, de érinti a szemet (microophtalmia), a fogakat és összenőtt ujjakat (syndactilia) okoz. Számos betegnek vannak neurológiai problémái (ataxia, vizelet- és széklettartási zavarok, dysarthria stb). (63).

2.2.5. Connexin fehérjék expressziója és szerepük normál emlőszövetben és emlőrákban

A mai napig ellentmondásos az irodalom mind a normál emlőszövet, mind az emlőrák connexin expresszióját illetően. A connexinek kifejeződését nehéz vizsgálni paraffinos metszeten a megfelelő antitestek limitált elérhetősége, valamint a gap junction plakkok igen kis mérete (<1µm) miatt.

Emberben ez idáig Cx43-at és a Cx26-ot, egérben ezen kívül a Cx30 és Cx32-t sikerült kimutatni normál emlőszövetben *in situ*. Ezek hozzájárulnak a normál emlőszövet fejlődéséhez és a tejelválasztáshoz (64-68). A Cx43 volt az első, amelyet *in situ* kimutattak normál humán emlőszövetben (69). A myoepithelialis sejtek között jelenik meg elsősorban, de kimutatták a myoepithelialis és epithelialis junkcióban valamint a myoepithel sejtek és a fibroblastok között egyaránt. A Cx43-nak fontos szerepet játszik a myoepithelialis sejtek differenciációjában és osztódásában. Kifejeződése csökken a második trimeszterben, a laktáció során eltűnik, majd az involúció során újra expresszálódik (70). A Cx26 a luminalis sejtek között jelenik meg. Egér emlőszövetben mutatták ki, hogy szintje a laktáció során megemelkedik, az involúció során pedig lecsökken. A Cx26-nak is fontos szerepe van a luminalis sejtek differenciációjában és homeostasisában. Hormonok befolyásolják expresszióját, így részt vesz a tej termelésében és elválasztásában is.

A connexinek szerepe primer emlőrákokban a mai napig ellenmondásos és tisztázatlan. Egyes munkacsoportok primer emlőrákban a Cx43-nak és Cx26-nak tumorszupresszor szerepet tulajdonítanak (71, 72). Kanzuga-Koda és munkatársai a Cx43, Cx26 és Cx32 emelkedett kifejeződését találták emlőcarcinomák nyirokcsomó áttétjeiben a primer emlőtumorhoz képest (73, 74). Conklin és munkatársai ugyanezen connexinek kifejeződését vizsgálták szöveti multiblokkon. Hasonló eredményre jutottak, azonban a connexin expresszió és a betegség prognózisa között nem találtak szignifikáns összefüggést (75). Ezzel szemben Naoi és munkatársai pozitív korrelációt találtak a Cx26 expresszió és a tumor mérete, valamint a rosszabb differenciáltsági fok között (76). Egy másik munkacsoport új connexin izotípust talált emlőtumorokban, a Cx46-ot, amely úgy tűnik MCF-7 (öszrogénreceptor pozitív) tumoros sejtvonal hypoxiához való adaptációját segítheti (77).

A connexinek szerepe emlőrák metasztázisaiban ugyanúgy számos kérdést vet fel. Nem világos, vajon a connexinek elősegítik vagy gátolják a tumorsejtek migrációját, intravasatióját. Ez idáig úgy tűnik, hogy a connexinek kifejeződése a metasztázisokban is dinamikusan változik, egyes connexinek elősegíthetik, mások gátolják a tumor metasztatizáló képességét. Több munkacsoport megerősíti, hogy a tumorsejt képes kapcsolatot kialakítani osteoblast sejtekkel és endothel sejtekkel egyaránt, ami segíthet a tumor metasztázis képzésében (78, 79). Azt is tudjuk, hogy az emlőrák metasztázis-gátló BMRS1 (breast cancer metasztázis suppressor 1) gén csökkenti az emlőrák áttétképző hajlamát (80). Egy munkacsoport azt találta, hogy ha BRMS1 cDNS-t juttatják be MDA-MB-435 emlőrák sejtvonalba, képes csökkenteni annak metasztatizáló potenciálját és visszaállítani a homotípusos gap junction intercellularis kapcsolatokat (81). Stoletov és munkatársai állatmodellen tanulmányozták emlőrák és melanoma sejtek agyi áttétképződését. A *twist* metasztázis gén aktiválása emlőrákban megnövelte a Cx43 expresszióját és a tumor agyi kolonizációját (82).

A fentiekből látható, hogy a connexinek vizsgálati eredményei primer és áttétképző emlő tumorokban számos ellentmondást hordoznak a mai napig. Az világos, hogy e fehérjék kifejeződése dinamikusan változik a tumor fejlődése és progressziója során. Elképzelhető, hogy a primer tumor korai progressziója során bizonyos connexinek szintje csökken, hogy a tumorsejtek közötti fizikai kapcsolat ténylegesen megszűnjön. Majd a tumor újra kifejezheti a connexin fehérjéket, annak érdekében, hogy terjedni tudjon akár a strómában, vagy be tudjon lépni az érpályába és a metasztázis képzés utolsó lépéseként kolonizálni tudjon egy új szövetben.

3. CÉLKITŰZÉSEK

A connexin expresszió szisztémás tanulmányozását patológiás szövetminták formalinban-rögzített paraffinos metszetein az utóbbi időkig jelentősen nehezítette 1) az archivált szöveteken megbízhatóan működő antitestek hiánya; 2) a connexin plakkok gyakran 1µm-nél is kisebb mérete, ami miatt inkább fluoreszcens jelölés jöhet szóba; 3) a kis fluoreszcens jelek gyors elhalványodása; és 4) a statisztikai elemzéshez szükséges nagyszámú minta kiértékelésének körülményessége. A módszertan fejlődésével egy a fenti nehézségeket kiküszöbölő eljárást dolgoztunk ki. Módszerünk a ma már elérhető megbízható connexin specifikus antitestekkel emlőcarcinomák szöveti multiblokkjain (TMA) végzett szimpla és kettős immunfluoreszcens jelölést kombinálja a többszintű, többcsatornás teljes metszet digitalizálással. A módszer lehetővé tette a kisméretű permanens jelek hatékony analízisét nagyszámú emlőcarcinoma mintában. A connexin fehérje szintek mRNS szintű validálását expressziós adatbázisok elemzésével végeztük.

Célkitűzésként vizsgáltuk:

1. A normál emlőszövet connexin expresszióját a már leírt Cx26 és Cx43 mellett más izotípusokra is.
2. Hogy a primer emlőrákokban a Cx43, Cx26, Cx32 és Cx46 izotípusokon kívül kimutatható-e egyéb connexin.
3. Hogy van-e a connexin mRNS vagy fehérje szintek meghatározásának prognosztikus jelentősége adjuvánsan kezelt emlőrákokban.
4. Hogyan függ össze a connexinek szintje a ma használt prognosztikus faktorokkal.
5. Hogy képes-e a connexin mRNS vagy fehérje szinten tovább finomítani az emlőrákok alcsoportjait.
6. Hogyan befolyásolja a connexinek expresszióját a neoadjuváns kemoterápia.
7. Hogy a connexin expresszió segít-e a neoadjuváns terápia eredményességét előrejelezni a klasszifikációs rendszerekbe illesztve.
8. Hogy van-e a connexin szinteknek önálló prognosztikus értékük a neoadjuváns terápiában.

4. MÓDSZEREK

4.1. Hazai beteganyag

A szövettani vizsgálatokat két különböző (127 és 96 beteg) beteganyagon végeztük. A 127 emlődaganatos beteg mintája a Budai MÁV kórház anyagából (1999-2002) származik átlagosan 101 hónapos követési idővel. A betegek kezelési információi is rendelkezésünkre álltak. Parciális vagy totalis mastectomiát követően 50 beteg (39,7%) nem kapott további kezelést, 16 beteg (12,6%) részesült kizárólag sugárkezelésben, 12 beteg (9,4%) kapott csak kemoterápiát (taxán és antraciklin), 40 beteg részesült sugár és kemoterápiában is a sebészi kezelést követően. Csupán 9 betegnél nem volt elérhető információ a sebészi kezelést követő terápiára vonatkozóan. A tumorok közül 89 volt ER pozitív és 36 ER negatív. Az ER pozitívakon belül 70 volt luminalis A és 19 luminalis B típusú. Az ER negatívak közül 15 volt HER2 pozitív és 21 TNBC. Összesen 2 tumorról nem álltak rendelkezésünkre az altípusra vonatkozó információk. Mindhárom differenciáltsági fokú daganat rendelkezésünkre állt, közel azonos számban (grade 1: n=41, grade 2: n=42, grade 3: n=44). A betegek túlélési adatainak vizsgálatakor relapszusig eltelt időt vettük figyelembe, akár helyi recidíváról, akár távoli áttétről volt szó. A vizsgálatot a Semmelweis Egyetem Tudományos Kutatási és Etikai Bizottsága jóváhagyta (#85/2007).

4.2. Külföldi beteganyag

A 96 neoadjuvánsan kezelt emlődaganatos beteg mintája Svájcból, az Institute of Surgical Pathology, University Hospital Zürich-ből származik 2-10 éves túlélési idővel (1998-2009). Kemoterápiaként a betegek docetaxelt (75mg/m^2), epirubicint (90mg/m^2), cyclophophamidet (500mg/m^2), doxorubicint (50mg/m^2), vinorelbint (30mg/m^2), fluorouracilt (500mg/) és trastuzumabot (250mg/m^2) kaptak. A preoperatív kemoterápiás információk 73 betegnél voltak elérhetőek. Docetaxel/epirubicint 24 beteg, epirubicin/cyclophophamid/fluorouracilt 23 beteg, docetaxel/trastuzumabot 7 beteg, vinorelbin/trastuzumabot 5 beteg kapott. A betegek 2-6 ciklus kemoterápiában részesültek.

A formalin-fixált, paraffinba ágyazott preoperatív core biopsziák a hozzájuk tartozó posztoperatív szövettel 64 esetben állt rendelkezésünkre. Csak a neoadjuváns terápia előtti core biopszia műtéti anyag nélkül 17 esetben állt rendelkezésünkre. Kemoterápia

utáni műtéti anyag megelőző biopszia nélkül 15 esetben volt elérhető. A daganatok közül 75 (78%) volt invazív ductalis carcinoma, 18 (19%) invazív lobularis, 2 (2%) metaplasticus és 1 kissejtes carcinoma volt. A betegek átlagéletkora 54 év volt (30-74 év). A tumorok differenciáltsági foka 81 esetben állt rendelkezésünkre (grade 3: n=38 (40%), grade 2: n=42 (44%), grade 1: n=1). 15 esetben olyan kis mennyiségű tumorszövetünk volt, amely alkalmatlan volt a differenciáltsági fok megállapítására (83).

Mastectomiában 60 beteg (62%), segmentectomiában 28 beteg (29%) részesült. Összesen 8 beteg esetében nem történt műtéti beavatkozás vagy nem álltak rendelkezésre ez irányú információk. Ezen kívül 15 betegnek (16%) volt a multifokális tumora a sebészi beavatkozás idején. A primer szisztémás terápiát követő reziduális tumor mennyiségének megállapítása a tumorágyban megmaradt tumorsejtek százalékos aránya szerint történt (84). A tumorok szövettani altípusa a műtét előtti szövettani mintákból történt. A mintáink az ER/PgR és HER2 pozitív tumorokat nagyjából az emlőrák átlagos populációi megfelelően reprezentálták. A vizsgálatokat és a TMA készítését az Ethical Committee of Canton Zurich (KEK ZH NR: 2009-0065) és az Internal Review Board of the Institute of Surgical Pathology jóváhagyta. Neoadjuváns terápián átesett tumor mintáink klinikai, patológiai valamint proliferációs paramétereit a **3. táblázat** tartalmazza.

Normál emlőszövet vizsgálatához 3, menopausa előtti nő emlőmintáit használtuk.

3. táblázat. *Neoadjuvánsan kezelt emlőrákok klinikai, patológiai és proliferációs paraméterei.*

n=96	**Kemoterápia előtt**		**Kemoterápia után**	
Tumor méret	1,5-13 cm		0,3-14 cm	
	cT1	1 (1%)	ypT0	6 (6%)
	a		ypT1	20 (21%)
	b		a	2
	c	1	b	11
	cT2	25 (26%)	c	7
	cT3	22 (23%)	ypT2	31 (32%)
	cT4	41 (43%)	ypT3	24 (25%)
	b	19	ypT4	7 (7%)
	d	22	b	6
	na: 7 (7%)		d	1
			nincs műtét	8 (9%)
Nyirokcsomó státusz	cN0	10 (11%)	pN0	25 (26%)
	cN1	62 (64%)	pN1	27 (28%)
	cN2		pN2	12 (12%)
	cN3	3 (3%)	pN3	14 (15%)
			nincs műtét	8 (9%)
Ki67 státusz	0	2 (2%)	0	22 (28%)
	1 (0-1%)	12 (15%)	1	21 (27%)
	2 (1-5%)	19 (23%)	2	11 (14%)
	3 (5-10%)	13 (16%)	3	3 (4%)
	4 (10-15%)	6 (7%)	4	1 (1%)
	5 (15-20%)	4 (5%)	5	6 (8%)
	6 (20-33%)	2 (2%)	6	1 (1%)
	7 (33-50%)	4 (5%)	7	2 (3%)
	8 (50-66%)	1 (1%)	8	0 (0%)
	9 (66-80%)	3 (4%)	9	3 (4%)
	10 (80-100%)	1 (1%)	10	2 (3%)
	na	14 (17%)	na	7 (9%)
	Σ	64+17 (100%)	Σ	64+15 (100%)

na: pontos adat nem áll rendelkezésre

4.3. Connexin expresszió in silico analízise

Az *in silico* analízishez nyilvánosan elérhető adatbázisban található összesen 1809 (Affymetrix), valamint 1899 (Illumina) emlőrákos beteg adatait és túlélési információit

használtuk fel (85). Az egyes adatbázisok Affymetrix HGU 133A és HGU133+2 microarray platformon, illetve Illumina HT-12v3 platform alapján készültek (86). Az Affymetrix adatbázisban Cx32, Cx43 és Cx46 expressziós adatai voltak elérhetőek. Az Illumina adatbázisban tudtuk vizsgálni a Cx26 és Cx30 kifejeződését. Az itt található Cx32, Cx43 és Cx46 expressziós eredményeit használtuk fel az Affymetrix array eredményeink igazolására. A magas és alacsony connexin expresszió a median expressziónál lett szétválasztva minden izotípusnál és a relapszusmentes- (RFS), a teljes- (OS) és a távoli metasztázis mentes túléléssel (DMFS) lett összehasonlítva. Az expressziós mintázatokat megvizsgáltuk az emlőrákok különböző altípusaiban, a nyirokcsomó státusz valamint a tumor grade tekintetében is. Külön csoportosítottuk továbbá a kezelésben nem részesült eseteket, az endokrin terápiában részesült ER pozitív tumorokat valamint azokat az eseteket, amelyek hasonlítanak a SEER-hez (Surveillance Epidemiology and End Results). A SEER egy olyan programja a Nemzeti Rákkutató Intézetnek az Egyesült Államokban, amely hiteles információt nyújt a rákos megbetegedések incidenciájáról és túléléséről. A program 1973-ban indult és a mai napig gyűjti a rákos megbetegedésekről az információkat annak érdekében, hogy csökkentse az amerikai lakosság körében a rák okozta terheket. Az általunk használt biostatisztikai adatbázis, az ebben a programban résztvevő esetekhez hasonló eseteket külön csoportosította.

Az *in silico* valamint protein analízishez felhasznált tumormintáink klinikopatológiai adatait a **4. táblázat** foglalja össze.

4. táblázat. *A vizsgálatban felhasznált adatbázisok és TMA minták klinikopatológiai jellemzői.*

	In silico adatbázisok		**TMA minták**		
			Adjuvánsan kezelt	Neoadjuvánsan kezelt	
Beteganyag	Affymetrix	Illumina		PST előtt	PST után
Betegszám (n)	1809	1988	127	96	
Életkor (év ± SD)	57 ± 13	61,8 (median)	59 ± 12	52 (median)	
Követési idő (év, hó ± SD)	123 ± 82	86,4 (median)	101 ± 40	2-10 év	
Relapszus/Halál (n %)	690 (38,1%)	643 (32,3%)	42 (33,1%)	18 (18,8%)	
Grade1	198 (10,9%)	170 (8,6%)	41 (32,3%)	1 (1%)	
Grade 2	534 (29,5%)	775 (39%)	41 (32,3%)	42 (44%)	
Grade 3	312 (17,2%)	954 (48%)	44 (34,6%)	38 (40%)	
nincs adat	745 (41,2%)	89 (4,4%)	1 (0,8%)	15 (15%)	
IDC	NA	NA	88 (69,3%)	75 (78%)	
ILC	NA	NA	13 (10,2%)	18 (19%)	
Egyéb	NA	NA	14 (11,0%)	3 (3,2%)	
Ismeretlen	1809	1988	12 (9,4%)	0	
ER pozitív	968 (53,5%)	1517 (76,3%)	89 (70,1%)	68 (71%)	59 (62%)
Luminális A	969 (53,6%)	825 (41,5%)	70 (56%)	NA	NA
Luminális B	536 (29,6%)	668 (33,6%)	19 (15,2%)	NA	NA
ER negatív	578 (31,9%)	471 (23,7%)	36 (28,3%)	25 (26%)	16 (17%)
HER2 pozitív	295 (16,3%)	242 (12,1%)	15 (12%)	28 (29%)	18 (19%)
TNBC	230 (12,7%)	331 (16,7)	21 (16,8%)	8 (8%)	8 (8%)
Ismeretlen	0	0	2 (1,6%)	3 (3%)	21 (21%)

TMA: szöveti multiblokk; SD: standard deviáció; IDC: invazív ductalis carcinoma
ILC: invazív lobularis carcinoma; ER: ösztrogén receptor; TNBC: tripla negatív emlőcarcinoma csoport
PST: primer szisztémás terápia

4.4. Szöveti multiblokkok

A 127 hazai beteg szövettani mintáját tartalmazó multiblokkok a megfelelő HE-festett metszetek ellenőrzése mellett lettek kiválogatva. A tumorokból reprezentatív területek lettek kiszúrva egy erre a célra kifejlesztett eszközzel (Histopathology Kft., Pécs, 3DHistech Kft, Budapest, Magyarország). Minden beteghez 2, egyenként 2mm átmérőjű szövethenger tartozik. Egy TMA blokkban összesen 84 szövethenger lett elhelyezve, amelyek azonos graddel rendelkeztek.

A 96 külföldi beteg anyagából származó TMA blokkok 0,6 mm átmérőjű duplikátumokat tartalmaznak, amelyek szintén a megfelelő, HE festett metszetek

ellenőrzése mellett lettek kiválogatva. Az egyik TMA blokkban neoadjuváns kemoterápia előtti 81 core biopszia található (64 párosított eset, 17 csak core biopsziás anyag) a másikon 79 beteg (64 párosított eset, 15 csak műtéti anyag) kemoterápia utáni mintája helyezkedik el.

4.5. Hormonreceptorok vizsgálata

A 127 magyar esetet tartalmazó mintán az emlőrákok altípusának (ER: Novocastra NCL-ER-6F11, 1:200; PgR: Novocastra NCL-PGR-312 1:600; HER2: Novocastra, BCL-CB11, 1:400; Ki67: DAKO, M7240; 1:100) meghatározása a TMA blokkokból készült metszeteken történt Ventana Benchmark készülékben (Roche Diagnostics, Mannheim, Németország) iVIEW DAB detektáló kit segítségével.

A fluoreszcens *in situ* hibridizációt (FISH) Poseidon kittel végeztük, amely HER2 és CE17 próbákat tartalmaz (Kreatech Poseidon KBI-10735). A deparaffinálást követő feltárás Vector antigén feltáró pufferben (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA), mikrohullámú berendezésben végzett 10 perces forralással történt. Ezt követően 0,25%-os pepszines emésztés (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Németország) következett 15 percig 37 ºC-on. A dehidratálást és szárítást követő hibridizáció 10 percig 75 ºC-on majd 37 ºC egy éjszakán át történt. Végül a mintákat DAPI (kék) magfestőt tartalmazó vizes fedőanyaggal (Vectashield H-1200) fedtük.

A 96 svájci eset ER (klón: 6F11) és progeszteron receptor (PgR, klón: 1A6) meghatározása a rutin diagnosztika során iVIEW DAB detektáló kit segítségével szintén Ventana Benchmark immunfestő készülékben (Ventana Basel, Svájc) CC1 pufferes antigénfeltárás után történt. Az 1% fölötti magi festődés pozitívnak minősült (83). A HER2 meghatározás az ASCO kritériumoknak megfelelően zajlott immunhisztokémiával és/vagy fluoreszcens *in situ* hibridizációval (FISH) (1998-2004 IHC és FISH, 2004-2009 csak FISH) (87). HER2 immunmeghatározás 1998-2004 között a Pathwav^{TM} HER2 FDA kittel (Ventana) történt a fent említett automatában. A több mint 10%-os komplett erős membránfestődés számított 3+ pozitívnak. A több mint 10%-os közepesen erős, de komplett membránfestődésű eseteket 2+ pozitívak tekintettük, ilyenkor kiegészítő FISH vizsgálat is készült. 1998-2009 között a HER2 gén amplifikáció a PathVysion dual color FISH kittel (Vysis, Abbott AG, Baar, Svájc) a gyártó előírása szerint zajlott.

4.6. A connexinek és a proliferáció immunhisztokémiai vizsgálata

A sejtkapcsoló struktúrák és a proliferáció vizsgálatát 4 µm vastag TMA blokkból készült paraffinos metszeteken végeztük. A deparaffinálás követően 0,1M-os TRIS és 0,001 M-os EDTA tartalmú pufferben antigén feltárást végeztünk mikrohullámú sütőben (Aivar, Biofa, Veszprém, Magyarország) 20 percig 105ºC-on. Ezt 10 másodperces emésztés követte 0,25%-os fenolvörös tartalmú tripszinnel (1:50; Life Technologies, Carlsbad, CA, 25050-014). A 20 perces fehérjeblokkolást követően (1%-os BSA puffer) a primer antitestekkel (**5. táblázat**) egész éjszakán át inkubáltuk szobahőmérsékleten a mintákat (Invitrogen/Life Technologies, Eugene, OR; Millipore, Billerica, MA; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO; Cell Signaling, Beverly, MA). A primer antitestek humán, egér valamint patkány szekvenciát is felismernek. Minden állat specifikus antitest nagyfokú keresztreakciót mutat a releváns humán antitesttel (88). A connexinek mellett párhuzamosan vizsgáltuk a tumorok proliferációs képességét is a Ki67 fehérje vizsgálatával (MIB-1, 1:2, „ready-to-use", IR626, Dako Glostrup, Denmark; SP6 Thermo Lab Fremont, CA). Ezt követően fluoreszcensen jelölt másodlagos antitestekkel 90 perces inkubálást végeztünk szintén szobahőmérsékleten (Alexa Fluor 546-vörös színű kecske anti nyúl IgG A11001, Alexa Fluor 488-zöld színű kecske anti egér IgG A11001, mindkét antitest hígítása 1:200). A sejtmagok detektálásához Hoechst reagenst használtunk (1:1000, 90 másodperc, kék színű, B2883). Mindegyik fluoreszcensen jelölt szekunder antitest az Invitrogen-Life Technologies-től (Eugene, OR) származik. Az egyes inkubációk között mintáinkat 0,1M-os 7,4 pH-jú TBS (Tris-puffer) pufferben mostuk 2x5 percig.

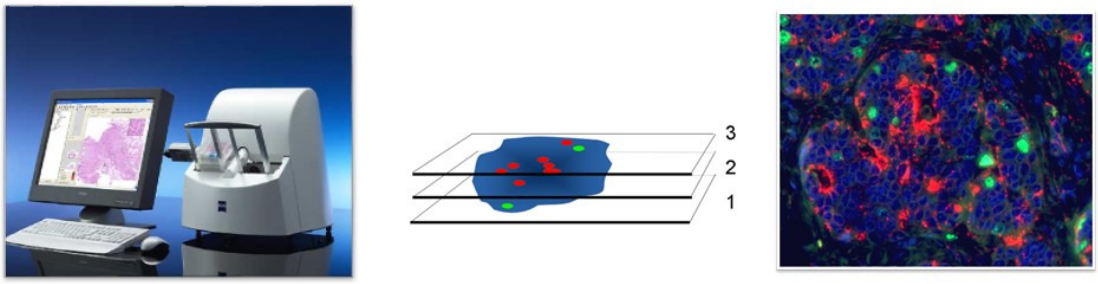
5. táblázat. *A vizsgálatban használt connexin specifikus antitestek.*

Cx antitest	Gyártó	Gyári szám	Klón	Higítás
$Cx26_1$	Invitrogén/Life Technologies	CX-1E8	egér	1:500
$Cx26_2$	Millipore	AB8143	nyúl	1:4000
Cx30	Sigma-Aldrich	HPA014846	nyúl	1:75
Cx32	Sigma-Aldrich	HPA010663	nyúl	1:30
Cx43	Cell Signaling	#3512	nyúl	1:100
Cx46	Sigma Aldrich	SAB130557	nyúl	1:100

Cx: connexin

4.7. A metszetek digitalizálása és értékelése

Az immunfluoreszcensen festett metszeteinket Pannoramic Scan metszetszkennerrel digitalizáltuk (3DHISTECH). A digitalizálást több (3-7) optikai szinten, több csatornán végeztük, a kisméretű (<1µm) connexinek formálta gap junction plakkok megfelelő felbontására. Így lehetővé vált a connexin molekulák pontos detektálása és értékelése a TMA metszet teljes vastagságában anélkül, hogy a fluoreszcens jelünk elhalványodott volna (**2. ábra**).



2. ábra. *A TMA metszetek többszintű, többcsatornás (connexin-vörös, Ki67-zöld) digitalizálásra alkalmas Pannoramic Scan, amely segítségével a connexinek expresszió meghatározható a fluoreszcens jel elhalványodása nélkül.*

Az fluoreszcens immunreakciókat két független vizsgáló értékelte TMA modul szoftver segítségével a megegyezésig. A connexinek kifejeződését 4 fokozatú skálán értékeltük a pozitív tumorsejtek gyakoriságának figyelembe vételével (0:<5%, 1+:5-20%, 2+:20-60%, 3+:>60%). Pozitív reakciónak a membrán illetve citoplazmatikus festődést tekintettük. Invazív tumorokban a connexin festődés elsősorban a citoplazmában jelentkezett. Belső kontrollként a stróma, a simaizom, a zsírsejtek, a bőr illetve a normál emlőhám szolgált. A Ki67 értékelése 10 fokozatú lineáris skálán történt szintén a pozitív tumorsejtek gyakoriságának figyelembe vételével (0: 0, 1: 0-1%, 2: 1-5%, 3: 5-10%, 4: 10-15%, 5: 15-20%, 6: 20-33%, 7: 33-50%, 8: 50-66%, 9: 66-80%, 10: 80-100%). Amennyiben a tumor heterogénnek bizonyult egy festést illetően, akkor a magasabb pontértéket vettük figyelembe.

4.8. A neoadjuváns terápiára adott regressziós válasz megítélése szövettani és klinikai klasszifikációs rendszerekkel

Tanulmányunkban 5, napjainkban leginkább elterjedt klasszifikációs rendszert használtunk a primer szisztémás terápia regressziós hatásának méréséhez (**6. táblázat**). Ezek közül 4 (NSABP, Miller-Payne, Sataloff T, EWGBSP TR) a reziduális tumorszövet jelenlétét (nincs, *in situ* vagy invazív) vizsgálja. Ez összesen 89 esetben volt retrospektíve meghatározható. A CPS EG pontrendszer ezzel szemben a klinikai és patológiai kiterjedtség mellett a hormonreceptor státuszt valamint a tumor differenciáltságát veszi figyelembe. Ezt a pontrendszert 55 esetben tudtuk használni a hiányzó adatok miatt.

6. táblázat. *A neoadjuvánsan kezelt emlőrákok eloszlása az egyes klasszifikációs rendszerek szerint.*

Klasszifikációs rendszer		Esetek
[1]**NSABP**	pCR	5
	pINV	84
Miller-Payne	G1	10
	G2	20
	G3	40
	G4	14
	G5	5
Sataloff	TA	20
	TB	30
	TC	29
	TD	10
[2]**EWGBSP**	TR1a	4
	TR1b	1
	TR2a	14
	TR2b	31
	TR2c	29
	TR3	10
[3]**CPS EG**	0	0
	1	2
	2	19
	3	17
	4	12
	5	5
	6	0

[1]NSABP: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project
[2]EWGBSP: European Working Group for Breast Screening Pathology;
[3]CPS EG: Clinical Pathological Stage combined with Estrogen receptor status and Grade by M.D. Anderson Center (MDACC)

4.9. Adatbázisok elemzése, statisztikai értékelés

A gén chip mRNS expressziós eredményeket R statisztikai környezetben (R version 2.10.1, R Foundation for Statistical Computing, Bécs, Ausztria) vizsgáltuk (89). Az eredmények Kaplan-Meier görbén jelentek meg hazard funkció (HR) és log rank p mellett.

A fehérje expressziós adatokat SPSS 15.0 statisztikai szoftverrel értékeltük (SPSS Inc., Chicago, IL). A kategorikus változók értékeléséhez chi-négyzet tesztet végeztünk.

Spearman-rank tesztet használtunk a connexinek és a prognosztikus markerek (grade, HR státusz, nekrózis és érinvázió jelenléte, NPI, mitotikus index {MI}, stage) összehasonlításához. Kaplan-Meier görbéken ábrázoltuk a csoportok túlélési eredményeit (teljes túlélés {OS}, betegségmentes túlélés {DFS}, távoli áttétmentes túlélés {DMFS}, amelyek statisztikai összevetéséhez log-rank tesztet használtunk. Több marker prognosztikus értékének összehasonlításához Cox regresszió analízist alkalmaztunk multivariancia modellben 95%-os konfidencia intervallummal. Az eredményeket minden esetben $p<0,05$ értéknél tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

5. EREDMÉNYEK

5.1. A connexin mRNS expresszió prognosztikus értéke in silico analízis alapján

5.1.1. Affymetrix adatbázis

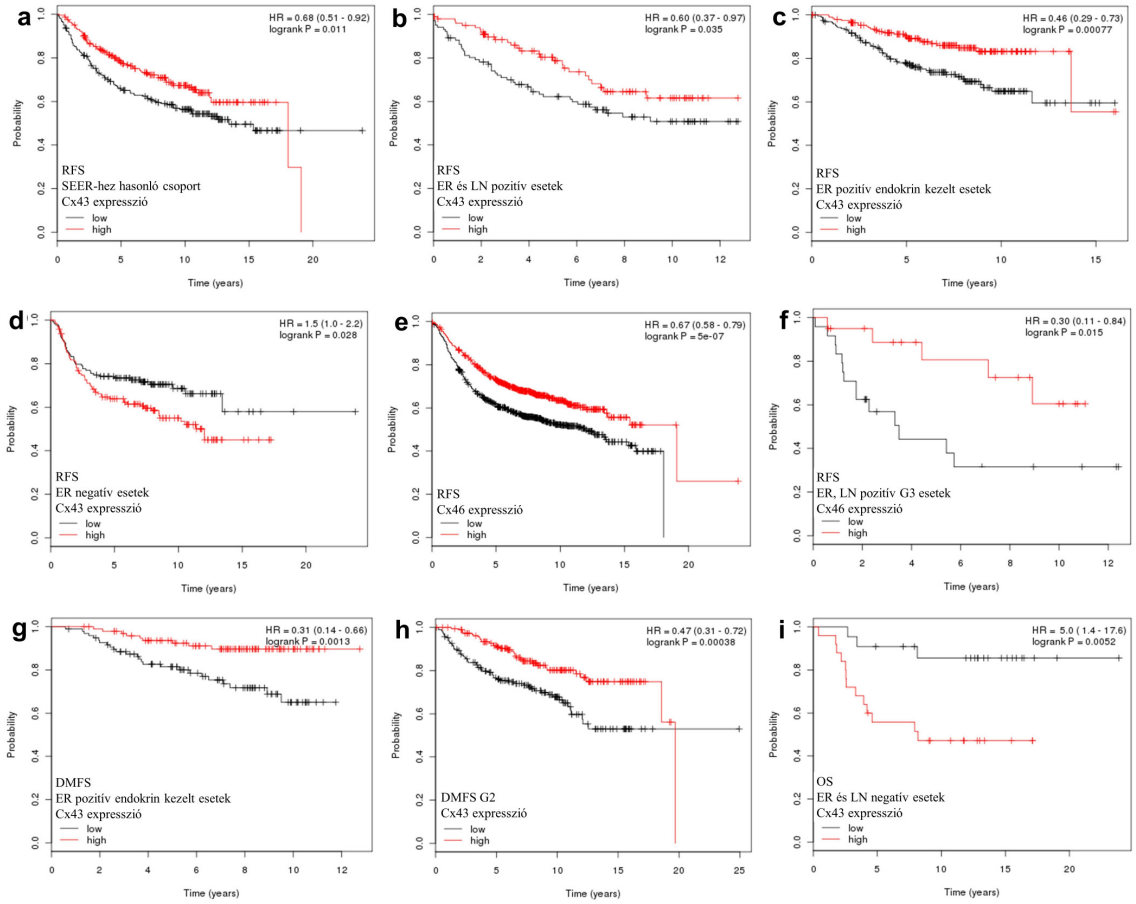
A connexin mRNS-ek kifejeződésének kapcsolatát a túléléssel a **7. táblázat** foglalja össze. Szignifikánsan jobb relapszusmentes túlélés (RFS) mutatkozott: emelkedett (>median) Cx32 mRNS szint mellett az egész beteganyagban, megnövekedett Cx43 mRNS szintnél a SEER prevalenciájú csoportban (**3/a ábra**), ER pozitív tumorok esetében, a luminalis A csoportban, az ER és nyirokcsomó pozitív daganatokban (**3/b ábra**), valamint az ER pozitív endokrin terápiában részesült betegek csoportjában (**3/c ábra**). A megnövekedett Cx43 mRNS expressziós szint szignifikánsan rosszabb relapszusmentes túlélést csupán az ER negatív csoportban mutatott (**3/d ábra**). Az emelkedett Cx46 mRNS szint szignifikánsan jobb RFS-t mutatott az egész beteganyagban (**3/e ábra**) valamint az ER és nyirokcsomó kettős pozitív grade 3-as daganatokban (**3/f ábra**). Az emelkedett Cx43 mRNS szint szignifikánsan jobb távoli metasztázismentes túléléshez (DMFS) kapcsolódott az egész beteganyagban továbbá a nyirokcsomó negatív betegekben, az ER pozitív endokrin terápiában részesült betegekben (**3/g ábra**) továbbá a grade 2-es tumorokban (**3/h ábra**). Ezzel szemben, a teljes túlélést (OS) tekintve a Cx43 mRNS expresszió az ER negatív esetekben fordított korrelációt mutatott (**3/i ábra**).

7. táblázat. *1809 (Affymetrix) és 1899 (Illumina) emlőrák in silico mRNS analízise és prognosztikus korrelációjuk.*

Connexin izotípus	Szignifikáns prognosztikus összefüggés		Hazard funkció	95% Konfidencia intervallum	Log-rank p szignifikancia
	Pozitív	Negatív			
GJA1 (Cx43)	Egész beteganyag (I)		0,67	0,57-0,79	2,5e-06
	Egész beteganyag (A/M)		0,63	0,47-0,85	0,002
	SEER prevalencia (A)		0,68	0,51-0,92	0,011
	ER pozitív (A)		0,79	0,63-0,99	0,036
	ER pozitív (I)		0,68	0,56-0,83	9,3e-05
	Luminalis A (I)		0,70	0,52-0,93	0,015
	G2 tumorok (A/M)		0,47	0,31-0,72	0,00038
	ER és LN pozitív (A)		0,63	0,41-0,98	0,039
	Endokrin kezelt (A)		0,46	0,29-0,73	0,00077
	Endokrin kezelt (A/M)		0,31	0,14-0,66	0,0013
	Endokrin kezelt (I)		0,63	0,49-0,84	0,0004
		ER negatív (A)	1,5	1,00-2,20	0,028
		ER és LN negatív (A/OS)	5,0	1,40-17,6	0,0052
		ER negatív (I)	1,31	096-1,18	0,09 (trend)
GJA3 (Cx46)	Egész beteganyag (A)		0,67	0,58-0,79	5,00E-7
	Egész beteganyag (I)		0,83	0,70-0,97	0,021
	Luminalis A (I)		0,72	0,53-0,98	0,036
	ER negatív (I)		0,74	0,55-0,99	0,045
	HER2 pozitív (I)		0,66	0,45-0,95	0,026
	Kemoterápia (I)		0,73	0,55-0,98	0,035
GJB1 (Cx32)	Egész beteganyag (A)		0,63	0,54-0,73	2,4e-09
	Egész beteganyag (I)		0,81	0,70-0,95	0,0095
	ER pozitív (I)		0,82	0,68-0,99	0,043
	Luminalis B (I)		0,77	0,60-0,98	0,034
	Endokrin kezelt (I)		0,81	0,66-1,00	0,046
GJB2 (Cx26)		Luminalis B (I)	1,40	1,10-1,80	0,012
		Egész beteganyag (I)	1,20	1,00-1,40	0,058 (trend)

Connexin izotípus	Szignifikáns prognosztikus összefüggés		Hazard funkció	95% Konfidencia intervallum	Log-rank p szignifikancia
	Pozitív	Negatív			
GJB6 (Cx30)		Egész beteganyag (I)	1,20	1,10-1,50	0,0088
		ER pozitív (I)	1,40	1,10-1,70	0,0012
		Luminalis A (I)	1,50	1,10-2,10	0,0088
		Luminalis B (I)	1,50	1,10-1,90	0,0058
		Endokrin kezelt	1,40	1,20-1,80	0,00082
	HER2 pozitív		0,73	0,50-1,06	0,1 (trend)
	Tripla negatív		0,72	0,49-1,05	0,085 (trend)

A: Affymetrix platform relapszusmentes túlélést használva (RFS), amely külön nincs jelölve, távoli metasztázis mentes túlélést használva (DMFS), M-mel jelölve és teljes túlélés (OS).
I: Illumina platform OS adatokat használva, amely nincs külön jelölve.
doi:10.1371/journal.pone.0112541.t002



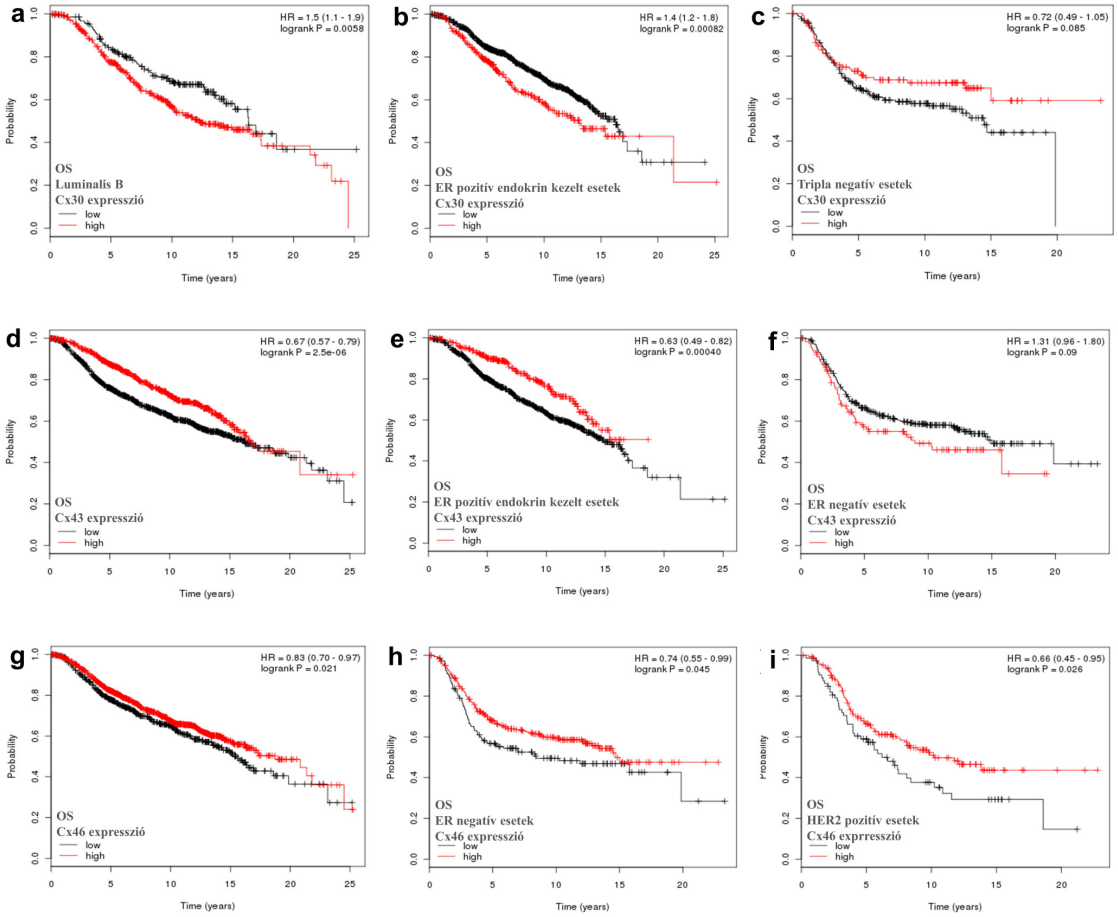
3. ábra. Emelkedett (>median) Cx43 (a-d, g-i) és Cx46 (e-f) expresszió prognosztikus értéke Kaplan-Meier görbéken ábrázolva a relapszusmentes, a távoli áttéttől mentes és a teljes túlélés tekintetében 1809 emlőrák Affymetrix chip eredménye alapján. *A Cx43 mRNS expresszió szignifikánsan jobb relapszusmentes túlélést (RFS) mutatott a SEER prevalenciához hasonló csoportban (a), az ER és nyirokcsomó (LN) pozitív esetekben (b), az ER pozitív endokrin terápiában részesült betegcsoportban (c), de csökkent RFS-t mutatott az ER negatív esetekben (d). Az emelkedett Cx46 mRNS expresszió prediktív a jobb RFS-re az egész beteganyagban (e) és az ER és LN pozitív grade 3-as betegek esetében (f). Az emelkedett Cx43 mRNS szint szintén jobb távoli áttétmentes túléléshez (DMFS) kapcsolódott az ER pozitív endokrin kezelt tumorokban (g) és a grade 2-es daganatokban (h). Az emelkedett Cx43 expresszió az ER és LN negatív esetekben csökkent teljes túléléshez kapcsolódott (i). Log-rank teszttel támasztottuk alá a szignifikancia (p<0,05) erejét. HR: hazard funkció (95%-os konfidencia intervallummal).*
doi10.1371/journal.pone0112541.g001

5.1.2. Illumina adatbázis

Az Affymetrix adatbázis nem tartalmaz Cx26 és Cx30 mRNS expressziós adatokat, ezért ezeket a connexineket az Illumina adatbázisban elemeztük a Cx32, Cx43 és Cx46

mellett. Az ezekkel kapcsolatos összefüggéseket szintén a **7. táblázat** tartalmazza. Azon kívül, hogy a Cx26 mRNS expresszió az OS-t tekintve fordított korrelációt mutatott luminalis B típusú daganatokban, egyéb összefüggést nem mutat az emlőrák progressziójával. Habár a Cx30 mRNS szintje negatív összefüggést mutat az OS-sel az egész beteganyagban, az ER pozitív csoportban, valamint a luminalis A illetve B altípusban (**4/a ábra**) és az ER pozitív endokrin terápiában részesült betegcsoportban (**4/b ábra**), addig a megemelkedett Cx30 mRNS kifejeződése jobb túlélést mutat az ER negatív valamint a HER2 pozitív és tripla negatív tumorokban (**4/c ábra**).

Az Illumina platformon elérhető Cx43, Cx46 és Cx32-re vonatkozó prognosztikus teljes túlélési adatok jól korrelálnak az Affymetrix platform DFS eredményeivel. Ennek megfelelően, az emelkedett Cx43 expresszió pozitív korrelációt mutat az OS-sel a teljes beteganyagban (**4/d ábra**), az ER pozitív csoportban, a luminalis A alcsoportban és az ER pozitív endokrin terápiában részesült betegcsoportban (**4/e ábra**). Ezzel szemben, az emelkedett Cx43 mRNS expresszió fordított statisztikai összefüggést mutatott az OS-sel ER negatív tumorokban (**4/f ábra**) és a tripla negatív esetekben. A megemelkedett Cx46 expresszió pozitív összefüggést mutatott az OS-sel a teljes beteganyagban (**4/g ábra**), a luminalis A alcsoportban, ER negatív daganatokban (**4/h ábra**), a HER2 pozitív esetekben (**4/i ábra**), valamint a kemoterápiával kezelt betegekben. Az emelkedett Cx32 mRNS expesszió pozitív szignifikáns összefüggést mutat az OS-sel az egész beteganyagban, az ER pozitív esetekben, különösen a luminalis B alcsoportban és az ER pozitív endokrin terápiában részesült betegekben.

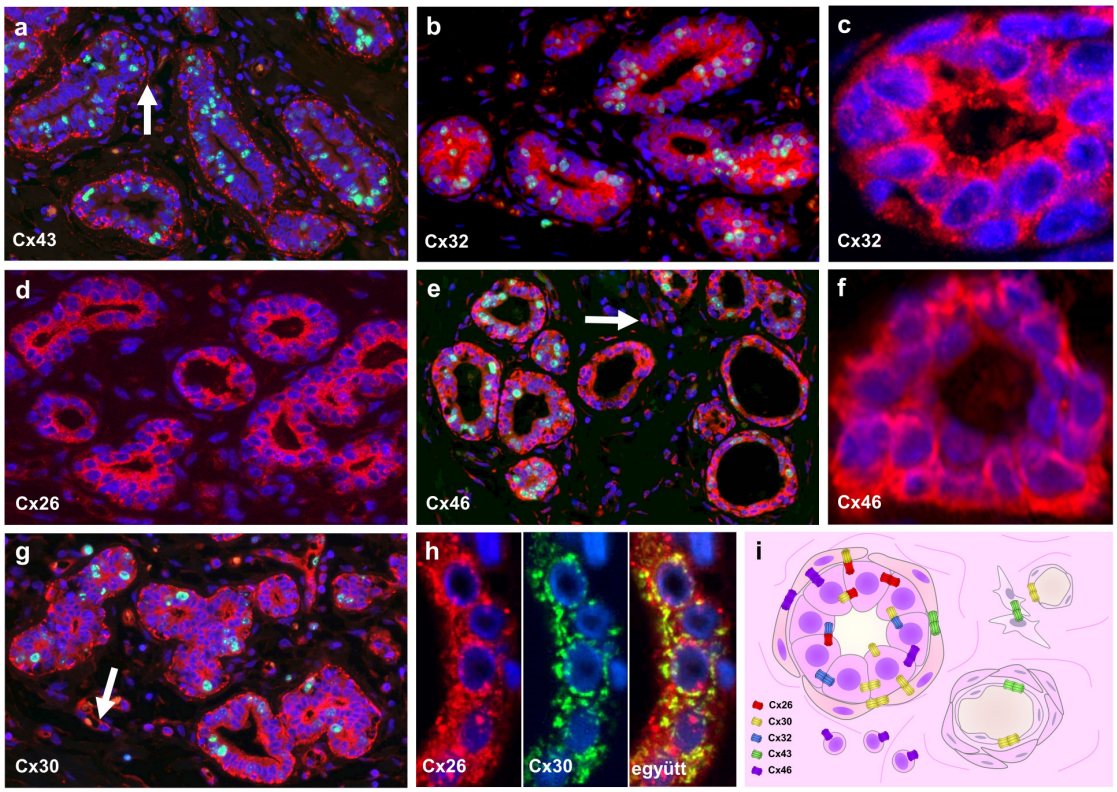


4. ábra. Emelkedett (>median) Cx30 (a-c), Cx43 (d-f) és Cx46 (g-i) mRNS expresszió prognosztikus értéke teljes túlélés (OS) tekintetében Kaplan Meier metodikát használva az 1899 emlőrákos esetet tartalmazó Illumina adatbázisban. *Az emelkedett Cx30 mRNS expresszió szignifikánsan csökkent OS-t mutatott a luminalis B tumorokban (a), az ER pozitív endokrin terápiában részesült esetekben (b), de szoros összefüggést mutatott a jobb túlélés tekintetében az ER negatív esetekben (c). Az emelkedett Cx43 mRNS expresszió szignifikánsan jobb túlélést mutatott OS tekintetében az egész beteganyagban (d), az ER pozitív endokrin kezelt betegekben (e), de erős tendenciát mutatott a rosszabb túléléssel az ER negatív esetekben (f). Az emelkedett Cx46 expresszió szignifikánsan jobb túlélést mutatott az egész beteganyagban (g), az ER negatív esetekben (h) és a HER2 pozitív tumorokban (i). Log-rank teszttel támasztottuk alá a szignifikancia ($p<0,05$) erejét. HR: hazard funkció (95%-os konfidencia intervallummal).*

5.2. Connexin fehérjék kifejeződése normál emlőben

Normál emlőmirigyben a connexin fehérjék elsősorban a sejtmembránra lokalizálódnak. Mi is megerősítettük, hogy a Cx43 a myoepithelialis réteg mentén illetve a stromális és endothelialis sejtek között helyezkedik el (**5/a ábra**), a Cx26 pedig a luminalis hámsejtek között fejeződik ki (**5/b ábra**). Elsőként detektáltunk Cx32

fehérjét a luminalis hámsejtek között (**5/c ábra**). Cx30 fehérje figyelhető meg a myoepithelialis és a luminalis sejteknek főleg az apicalis oldalán (**5/d ábra**). Ezen kívül elsőnek sikerült Cx46 fehérjét detektálnunk a myoepithelialis és luminalis sejtek között, ami számos stromalis gyulladásos sejt felszínén is kimutatható volt (**5/e ábra**). Megfigyeléseinket az **5/f ábra** foglalja össze.

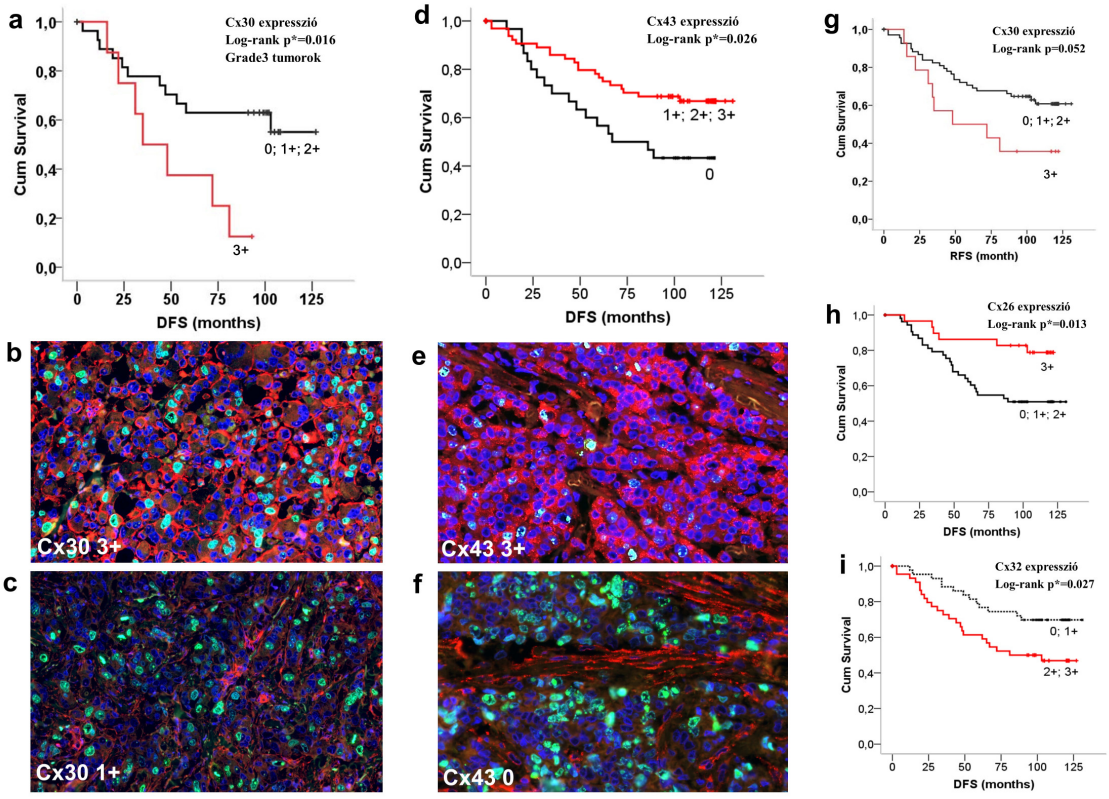


5. ábra. Connexin fehérje izotípusok (Alexa-546, vörös) és Ki67 proliferációs marker (Alexa-488, zöld) detektálása menopauza előtt álló nők normál emlőszövetében. *Pontszerű Cx43 reakció volt megfigyelhető a myoepithelialis sejtek mentén valamint a környező stromalis sejteken (nyíl) (a). Cx32 (b-c) és Cx26 (d) fehérje jelent meg főleg a luminalis sejtek között. Cx46 expresszió volt detektálható a myoepithelialis és a luminalis sejtekben és kis mennyiségben a környező gyulladásos sejtekben (nyíl) (e-f). A nagy nagyítású képen látható, hogy a Cx32 főleg a luminalis sejtekhez kapcsolódott (c), a Cx46 pedig főleg a basalis sejteken jelent meg (f), és mindkét connexin a sejtmembránon illetve a citoplazmában is megjelent. A Cx30 a myoepithelialis sejtek mentén, a luminalis sejtek apicalis oldalán valamint az ér endothel sejtekben jelent meg (nyíl) (g). A Cx26 (vörös) valamint a Cx30 (zöld) együttes expressziója figyelhető meg a luminalis sejtek között (sárga), beleértve az intercellularis határt is (h). A kettős immunfluorescens mintáinkon a sejtmagokat Hoechst festés segítségével tettük láthatóvá (kék). Összefoglaló ábra mutatja az eredményeinkből következő lehetséges homo- és heterocellularis/típusos Cx26 (vörös), Cx30 (sárga), Cx32 (kék), Cx43 (zöld) és Cx46 (lila) gap junction csatornákat normál emlőmirigyben (i).*

5.3. Connexin fehérjék kifejeződése primer emlőrákokban, összehasonlítás prognosztikus faktorokkal

Primer emlőrákokban a connexin fehérjék a citoplazmában és/vagy a sejtmembránban helyezkednek el. Log-rank tesztet alkalmaztunk a prognosztikus értékük meghatározásához, Spearman-rank tesztet (ρ) pedig a prognosztikus markerekkel való összehasonlításhoz. Hasonlóan az mRNS adatokkal, szignifikáns összefüggést találtunk az emelkedett (3+) Cx30 fehérje expresszió és a csökkent RFS között grade 3-as tumorokban (p=0,016) (**6/a-c ábra**) és közel szignifikáns összefüggést kaptunk a teljes beteganyagon is (p=0,052) (**6/g ábra**). A magas Cx30 kifejeződés (3+) pozitív összefüggést mutat a mitotikus indexszel (MI) (ρ=0,29). Hasonlóképpen megerősítve a Cx43 mRNS eredményeket, a Cx43 fehérje expressziója (1-3+) szignifikáns összefüggést mutat a jobb RFS-sel az egész beteganyagban (p=0,026) (**6/d-f ábra**) és a grade 2-es tumorokban (p=0,032). Ezen kívül pozitív összefüggést mutat a HR státusszal (ρ=0,23) és negatív korrelációt a tumor differenciáltságával (ρ=-0,22). A Cx46 kifejeződése negatív összefüggést mutat a tumor grade-del (ρ=-0,2) de csak pozitív tendenciát a betegség prognózisával.

A Cx26 és Cx32 fehérjéket tekintve ellentétes eredményeket találtunk az mRNS eredményekhez képest. A magas Cx26 expresszió (3+) szignifikánsan jobb RFS-t mutatott az egész beteganyagban (p=0,013) (**6/h ábra**), az ER pozitív (p=0,007) és a luminalis A alcsoportban (p=0,017). Negatív összefüggést találtunk a Cx26 expresszió és az NPI között (ρ=-0,25). A közepes és magas Cx32 fehérje szint (2-3+) negatív összefüggést mutatott az RFS-sel az egész beteganyagban (p=0,033) és a luminalis B-HER2 pozitív csoportban (p=0,025). Ezen kívül pozitív szignifikáns összefüggés volt megfigyelhető a tumor grade-del (ρ=0,34), a nekrózis jelenlétével (ρ=0,19), az NPI-vel (ρ=0,28), a MI-vel (ρ=0,27) és a Ki67 expresszióval (ρ=0,21), negatív összefüggés pedig a HR státusszal (ρ=-0,3).



6. ábra. Connexin fehérje izotípusok detektálása invazív emlőrákokban (b, c, e, f) és szignifikáns összefüggésük a betegségmentes túléléssel (RFS) Kaplan-Meier görbéken ábrázolva. (a, d, g, h, i)*. Az emelkedett Cx30 (3+) expresszió rosszabb RFS-t mutatott grade 3-as tumorokban (a-c) és erős tendenciát az egész beteganyagban (g). Erős sejtmembrán és kevés citoplazmatikus Cx43 festődés (Alexa-546, vörös) figyelhető meg a b ábrán (3+) összehasonlítva a c ábrával (1+) grade 3-as tumorokban. Az emelkedett Cx43 expresszió (1-3+) jobb RFS-t mutatott az egész beteganyagban (d-f). Erős citoplazmatikus és gyenge Cx43 (vörös) membránfestődés volt detektálható az alacsony proliferációs indexszel rendelkező tumorokban (zöld mag) és stromalis Cx43 expresszió volt megfigyelhető az erősen osztódó daganatokban (f). Ellentétben az mRNS eredménnyel, az emelkedett Cx26 fehérjeexpresszió (3+) jobb RFS-t mutatott (h), addig a közepes vagy erős (2-3+) Cx32 kifejeződés negatív összefüggést mutatott a túléléssel az egész beteganyagban (i). Log-rank teszttel támasztottuk alá a szignifikancia ($p<0,05$) erejét. A kettős immunfluoreszcens festéseknél Hoechst festést használtunk a sejtmagok láthatóvá tételéhez (kék).*

5.4. Connexin fehérjék önálló prognosztikus értéke

Először a napjainkban is használatos prognosztikus faktorok jelentőségét vizsgáltuk beteganyagunkban. Az NPI>4, MI>25 és Ki67 expresszió >50% (7-es a mi pontrendszerünkben) statisztikailag rosszabb RFS-t mutatott ($p_{NPI}=0,011$, $p_{MI}=0,002$, $p_{Ki67}=0,001$), míg a HR pozitivitás a jobb RFS-sel állt statisztikai összefüggésben ($p=0,002$).

A Cox multivariancia analízis eredményeit a **8. táblázat** foglalja össze. A Cx26, Cx30 és Cx43 prognosztikus értékét tudtuk összehasonlítani a nekrózissal, érinvázióval, MI-vel, Ki67 expresszióval és a HR státusszal, a Cx32 expressziót pedig az érinvázióval. A többi paraméter nem volt független a connexinek expressziójától.

Primer emlőrákokban >50% Cx26 expresszió (3+), illetve >5% Cx43 expresszió (1-3+) szignifikánsan erősebb, független prognosztikus faktornak bizonyult, mint a nekrózis és az érinvázió. Ezen kívül, a 3+ Cx26 expresszió közel olyan jó prognosztikus faktornak bizonyult, mint a HR státusz és a Ki67 index. Az erős Cx43 pozitivitás (>50%, 3+) közel olyan jó prognosztikus faktornak tűnik, mint a MI. Az erős Cx30 pozitivitás (>50%, 3+) a grade 3-as tumorokban erősebb, független negatív prognosztikus faktornak bizonyult, mint az MI vagy a nekrózis. Ezen felül, az alacsony Cx32 pozitivitás (<20%, 0-1+) erősebb prognosztikus faktornak tűnik, mint az érinvázió.

8. táblázat. *Connexin fehérjék expressziójának prognosztikus értéke primer emlőrákokban Cox regressziós multivariancia analízissel.*

Paraméter	p-érték	HR	95% CI	
			Alsó	Felső
Cx43 (0_123)	0,027	0,470	0,241	0,916
Érinvázió	0,371	0,718	0,348	1,483
Nekrózis	0,643	1,184	0,579	2,419
Cx43 (012_3)	0,048	0,518	0,271	0,993
Érinvázió	0,474	0,766	0,369	1,589
Mitotikus index	0,329	1,386	0,719	2,671
Cx26 (012_3)	0,022	0,354	0,146	0,863
Érinvázió	0,047	0,404	0,165	0,987
Hormon receptor	0,007	0,368	0,179	0,759
Cx26 (012_3)	0,015	0,329	0,134	0,809
Érinvázió	0,073	0,443	0,182	1,079
Nekrózis	0,395	1,402	0,643	3,058
Ki67	0,009	5,384	1,535	18,881
Cx26 (012_3)	0,019	0,314	0,119	0,829
Érinvázió	0,091	0,462	0,189	1,130
Cx30 (012_3)	0,016	4,209	1,309	13,539
Mitotikus index	0,885	0,856	0,130	7,102
Nekrózis	0,178	2,153	0,706	6,569
Cx32 (01_23)	0,032	2,103	1,064	4,155
Érinvázió	0,319	0,670	0,305	1,471

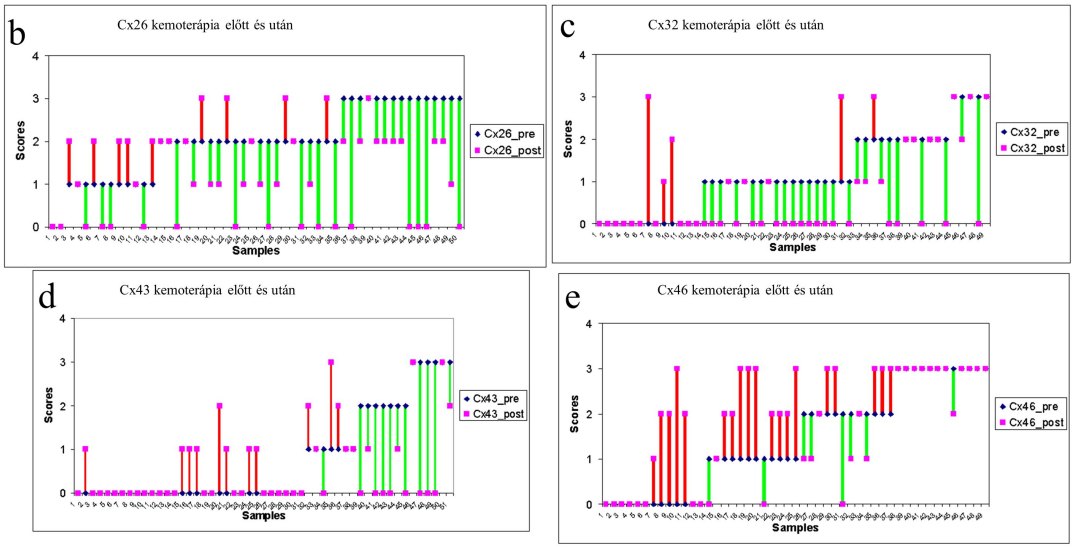
HR: Hazard funkció, CI: Konfidencia intervallum,
0123: pontozási kategóriák, ahol _ a küszöbérték
doi:10.1371/journal.pone0112541.t003

5.5. Connexin fehérjék kifejeződése neoadjuváns terápia előtt és után

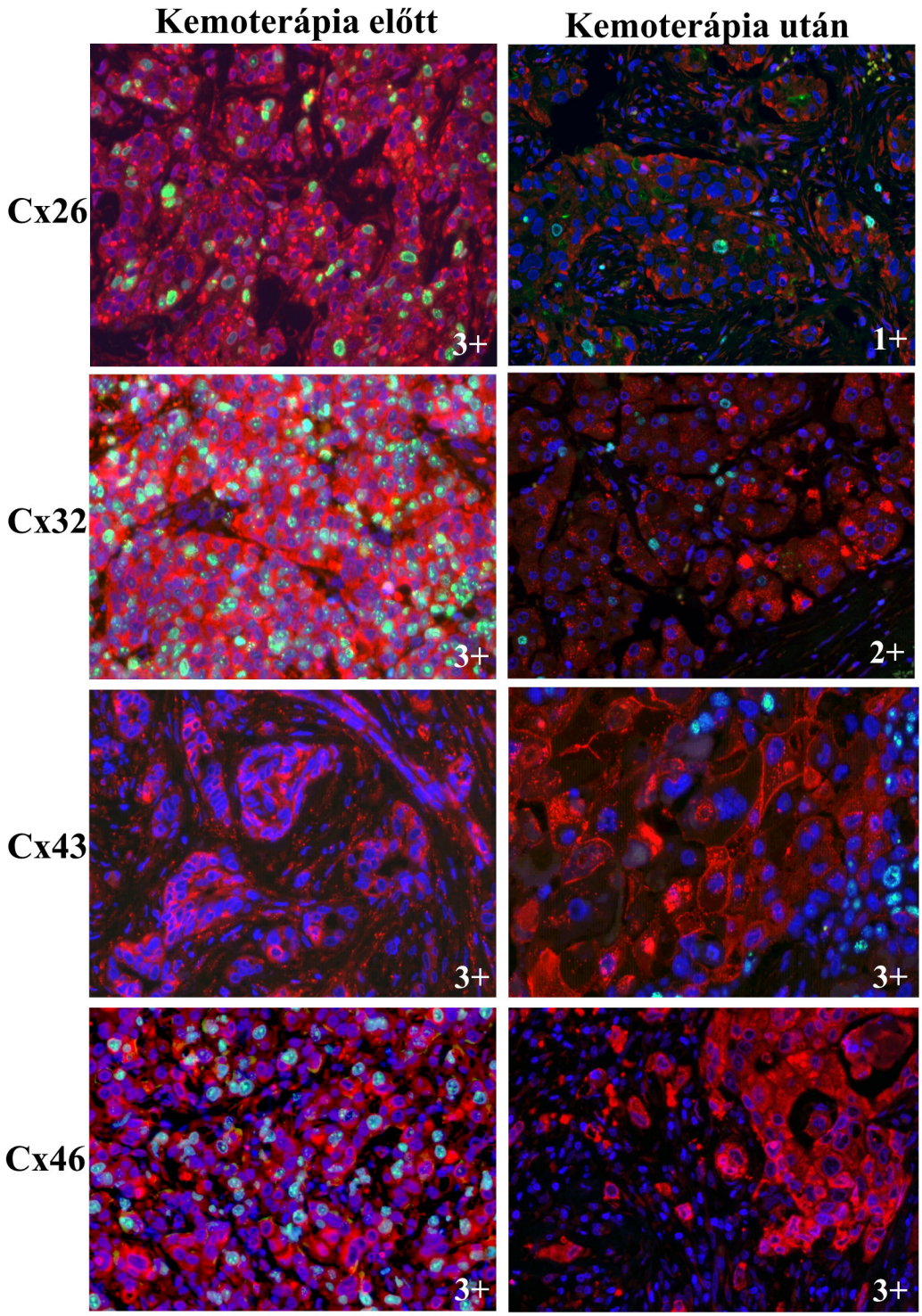
Kemoterápiát követően a különböző connexin fehérje izotípusok kifejeződése dinamikusan változik. Az egyes esetekben bekövetkezett változásokat a **7. ábra** foglalja össze, a változásokhoz kapcsolódó connexin immunfluoreszcens festődések a **8. ábrán** láthatóak. Az egész beteganyagban a Cx26-ot expresszáló tumorok száma, valamint egyes tumorokban a Cx26-ot expresszáló tumorsejtek száma is lecsökkent. Értékelés során a 0 pontot kapó esetek száma 3%-ról 25%-ra emelkedett ($p < 0{,}001$). A 3 pontot kapó esetek száma 32%-ról 10%-ra csökkent ($p < 0{,}006$). A köztes pontszámot (1, 2) kapó esetek száma a kemoterápiát követően nem változott szignifikánsan. A Cx32 expressziója szignifikánsan csökkent a kemoterápia következtében. A 0 pontot kapó esetek száma 10%-ról 49%-ra nőtt ($p < 0{,}004$, addig az 1 pontot (gyengén pozitív) kapó tumorok száma 35%-ról 17%-ra csökkent ($p < 0{,}043$). Sem a Cx43-at, sem a Cx46-ot expresszáló esetek száma nem nőtt szignifikánsan a kemoterápiát követően, bár a Cx46-ot erősen expresszáló (3+) tumorok száma emelkedő tendenciát mutat primer szisztémás kezelésre (PST). A 64 párosított esetből 50-nél (Cx43 esetében 51) tudtuk megbízhatóan értékelni. A Cx26 és Cx32 expressziós szintje főleg csökkent, a Cx43 kifejeződése változott a legkevésbé, míg a Cx46 szintje emelkedő tendenciát mutat neoadjuváns terápia hatására (**7/b-g ábra**).

a	Kemoterápia előtt (n=81)	Kemoterápia után (n=79)	p-érték
Connexin26			
0	2 (3%)	20 (25%)	p<0,001
1+	17 (21%)	17 (22%)	nsz
2+	24 (30%)	24 (31%)	nsz
3+	26 (32%)	8 (10%)	p<0,006
na	12 (14%)	10 (12%)	
Connexin32			
0	15 (19%)	39 (49%)	p<0,004
1+	28 (35%)	13 (17%)	p<0,043
2+	17 (21%)	11 (14%)	nsz
3+	7 (8%)	7 (9%)	nsz
na	14 (17%)	9 (11%)	
Connexin43			
0	42 (51%)	44 (56%)	nsz
1+	9 (11%)	16 (20%)	nsz
2+	8 (10%)	7 (9%)	nsz
3+	11 (14%)	4 (5%)	nsz
na	11 (14%)	8 (10%)	
Connexin46			
0	18 (22%)	19 (24%)	nsz
1+	19 (23%)	9 (11%)	nsz
2+	16 (20%)	12 (15%)	nsz
3+	16 (20%)	27 (35%)	nsz
na	12 (15%)	12 (15%)	

na: hiányzott a TMA-ból, nsz: nem szignifikáns



7. ábra. Connexin izotípusok kifejeződése emlőrákokban neoadjuváns terápia előtt és után (a). *Connexin izotípusok expressziójának dinamikus változása 50 (Cx43 esetében 51) párosított emlőrák mintán a terápiát követően (b-e). A Cx26 (b) és Cx32 (c) szintje főleg csökkent, a Cx43 (d) szintje változott a legkevésbé; a Cx46 (e) expressziója főleg növekedett. A zöld vonal mutatja a csökkenést, a vörös a növekedést. A lila jel önmagában azt mutatja, hogy nem történt változás az expresszióban.*



8. ábra. Cx26, Cx32, Cx43 és Cx46 (Alexa 546, vörös) és Ki67 (Alexa 488, zöld) fehérjék immunfluoreszcens detektálása invazív ductalis emlőrákokban neoadjuváns terápia előtt és után. *Hoechst festést használtunk a sejtmagokhoz (kék). A pontszerű sejtmembrán és citoplazmatikus Cx26 (1. sor) és Cx32 (2. sor) expresszió és a proliferáló (zöld) sejtek száma lecsökkent a kemoterápiát követően az eredetileg 3+ tumorok esetében. A Cx43 (3. sor) és Cx46 (4. sor) szintje a 3+ pozitív esetekben nem változott a kemoterápiát követően. A terápia előtti Cx43 és terápia utáni Cx46 minták nem lettek Ki67-tel jelölve.*

5.6. Connexinek kifejeződésének összefüggése klinikopatológiai paraméterekkel neoadjuváns terápia előtt és után

A connexin expresszió, sejtosztódás, valamint a klinikopatológiai jellemzők közötti összefüggést a **9. táblázat** foglalja össze.

9. táblázat. *A connexin és a Ki67 expresszió összefüggései a neoadjuvánsan kezelt emlőrákok klinikopatológiai jellemzőivel (Spearman-rank korreláció).*

	Cx43		Cx26		Cx32		Cx46		Ki67	
	k.e.	k.u.	k.e.	k.u.	k.e.	k.u.	k.e.	k.u.	k.e.	k.u.
ER k.e.	0,30	x	nsz	x	nsz	x	nsz	x	-0,46	-0,35
ER k.u.	0,36	nsz	nsz	nsz	nsz	nsz	nsz	nsz	-0,40	-0,38
PgR k.e.	0,34	x	nsz	x	nsz	x	nsz	x	-0,45	x
PgR k.u.	0,33	nsz	nsz	nsz	nsz	nsz	nsz	nsz	-0,52	nsz
HER2 k.e.	-0,27	x	nsz	x	0,31	x	nsz	x	nsz	x
HER2 k.u.	nsz	nsz	nsz	nsz	nsz	nsz	nsz	nsz	nsz	0,26
cT k.e.	0,29	x	nsz	x	nsz	x	nsz	x	nsz	x
cN k.e.	nsz	x	nsz	x	nsz	x	nsz	x	nsz	x
pT k.u.	nsz	nsz	nsz	nsz	-0,29	nsz	nsz	nsz	nsz	nsz
pN k.u.	nsz	nsz	nsz	nsz	nsz	nsz	0,39	0,32	nsz	nsz
grade k.e.	nsz	x	nsz	x	nsz	x	nsz	x	nsz	nsz
Ki67 k.e.	nsz	x	nsz	x	nsz	x	-0,29	x	x	0,46
Ki67 k.u.	nsz	nsz	nsz	nsz	nsz	0,46	nsz	nsz	0,46	x

nsz: nem szignifikáns, x: nem releváns, k.e.: kezelés előtt, k.u.: kezelés után

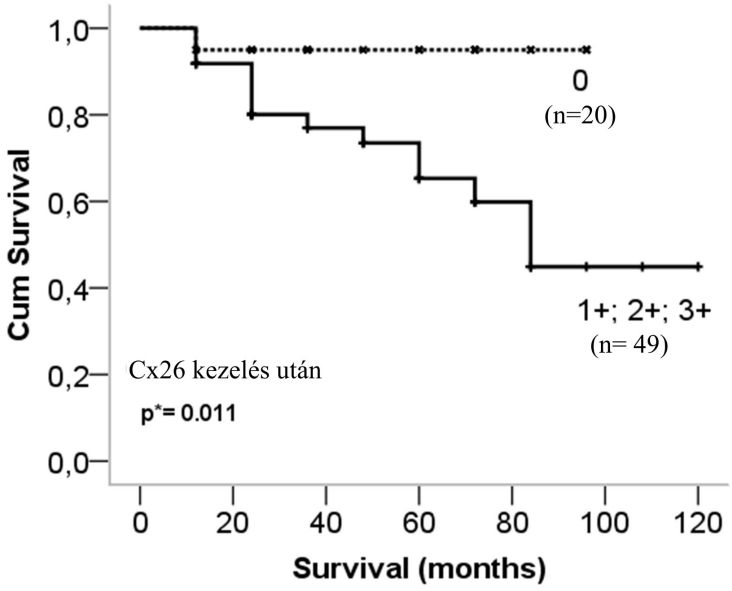
A kemoterápia utáni alacsony (<5%) Cx26 expressziót mutató esetek szignifikánsan jobb túlélést mutattak (p= 0,011), összehasonlítva a Cx26-ot magasabb szinten kifejező (1-3+, >5%) esetekhez képest (**9. ábra**). A Cx26 más klinikopatológiai paraméterekkel nem mutatott szignifikáns összefüggést (Spearman-rank teszttel, ρ).

Ugyanakkor a Cx32 expresszió szignifikáns pozitív összefüggést mutatott a HER2 státusszal kemoterápia előtt (ρ=0,31) és negatív összefüggést mutatott a patológiai tumor mérettel (pT) (ρ=-0,29). Kemoterápia után a Cx32 szintje és a Ki67 index között pozitív korreláció volt megfigyelhető (ρ=0,46).

A kezelés előtti Cx43 fehérjeszint pozitív összefüggést mutatott a kemoterápia előtti és utáni ER és PR szinttel és a klinikai tumor mérettel (cT) (ρ=0,29-0,36) és negatív összefüggést a szisztémás terápia előtti HER2 státusszal (ρ=-0,27).

A kezelés előtti és utáni Cx46 szint pozitív statisztikai korrelációt adott a nyirokcsomó státusszal (pN) (ρ=0,39 és 0,32).

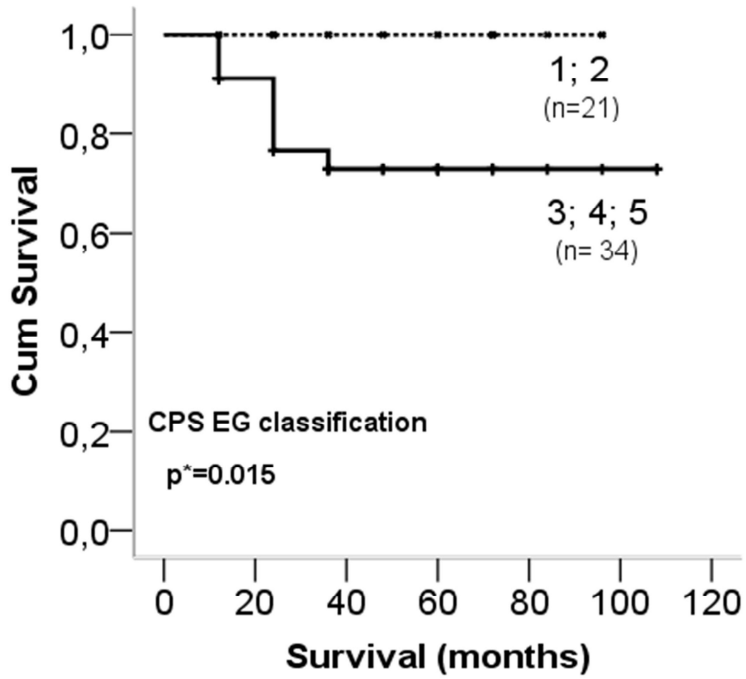
A kemoterápia előtti és utáni ER és Ki67 index (ρ=-0,46, -0,35, -0,40, -0,38) valamint a kezelés előtti PR és Ki67 index között negatív összefüggés volt megfigyelhető (ρ=-0,45, -0,52). Ezen kívül a kemoterápiát követő Ki67 és HER2 szint, valamint a kezelés előtti és a kezelést követő proliferációs index között is pozitív összefüggés volt kimutatható (ρ=0,26, ρ=0,46).



9. ábra. A teljes túlélés a kemoterápia utáni Cx26 függvényében Kaplan-Meier görbéken ábrázolva. *Az alacsony (0, <5%) Cx26 expressziójú eseteknek szignifikánsan jobb volt a túlélése (p=0,011) az egész beteganyagban.*

5.7. Neoadjuváns kezelésre adott terápiás válasz megítélésére használatos klasszifikációs rendszerek összefüggése a túléléssel beteganyagunkban

A neoadjuváns kemoterápiában részesült emlőtumorokat a tumor választ megítélő klasszifikációs rendszerek szerint csoportosítottuk (NSABP, Miller-Payne, Sataloff, EWGBSP, CPS EG). Egyedül a CPS EG klasszifikációs rendszer mutatott összefüggést a túléléssel. Azok a betegek, akik 1 vagy 2 pontot kaptak a rendszer szerint, szignifikánsan jobb túlélést mutattak a magasabb pontszámot (3-5) kapóknál (p=0,015) (**10. ábra**).

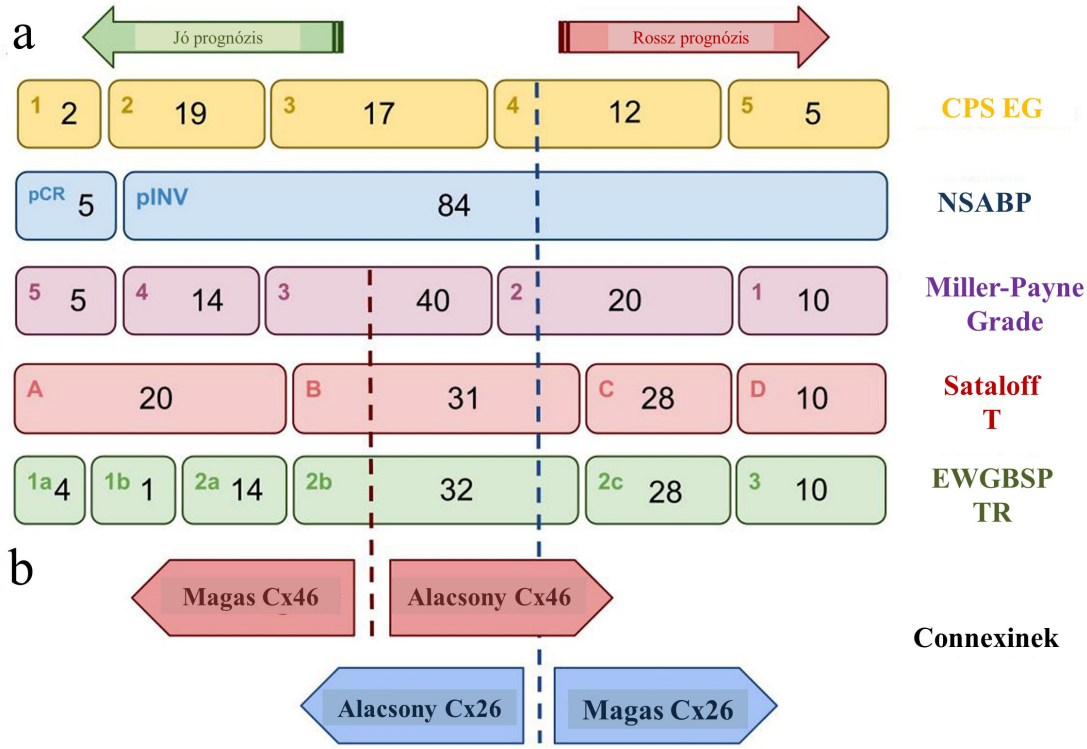


10. ábra. A teljes túlélés a CPS EG klasszifikáció függvényében Kaplan-Meier görbéken. *Az 1-2 pont esetében szignifikánsan jobb túlélés, (p=0,015) mint a 3-5 pont esetében.*

5.8. Klasszifikációs rendszerek közti átfedések neoadjuvánsan kezelt beteganyagunkban

Megvizsgáltuk továbbá, hogy a klasszifikációs rendszerek alcsoportjai között mekkora átfedések vannak beteganyagunkban (**11/a. ábra**). Általánosságban elmondhatjuk, hogy csak néhány eset kerül a rendszerek szélső csoportjaiba, úgymint a EWGBSP TR1a-b-be vagy TR3-ba, a CPS EG 1 és 5 alcsoportokba, a Sataloff TA és TD-be, valamint a Miller-Payne G1 és G5-be. Ezek azok a nagy átfedést mutató esetek, amelyek a terápiára különösen jól, illetve nem vagy alig reagáltak. Vagyis az összes általunk használt klasszifikációs rendszer két szélső kategóriáiba általában ugyanazok az esetek tartoztak. A többi tumor heterogén eloszlást mutatott a klasszifikációk közbenső kategóriáiban (EWGBSP TR2a-c, CPS EG 2-4, Sataloff TB-C, Miller-Payne G2-4). Az NSABP bináris rendszer, amely a reziduális tumor hiányán illetve jelenlétén alapszik, nincsenek benne közbenső alcsoportok. Összesen 5 eset tartozott a pCR kategóriába és 84 a pINV csoportba.

Ezek után kíváncsiak voltunk, vajon a connexin expresszió finomít-e a klasszifikációs rendszerek közbenső csoportjain, segítve ezzel az emlőrákok stratifikációját.



11. ábra. Beteganyagunk klasszifikációs rendszerekben való eloszlása valamint a Cx26 és Cx46 prognosztikus ereje. A Cx26 és Cx46 jó és rossz prognózisú csoportra bontja a bizonytalan kategóriákat az NSABP pINV, a Miller-Payne G, a Sataloff T, az EWGBSP TR valamint a CPS EG klasszifikációs rendszerben (a). *A magas Cx46 és az alacsony Cx26 szint korrelált a jó prognózissal (b).*

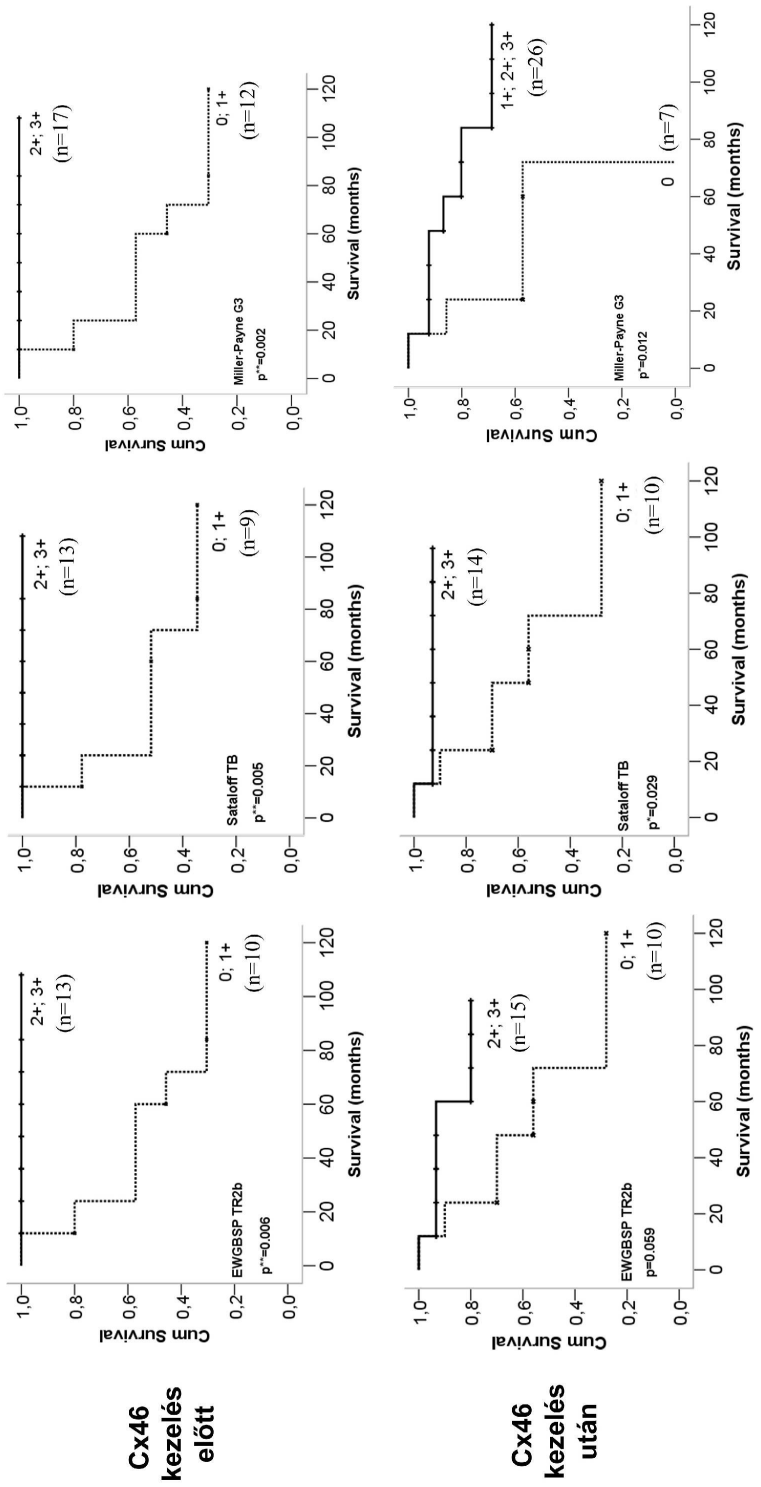
5.9. Connexin fehérjék kifejeződésének prognosztikus értéke a klasszifikációs rendszerekben

Elemeztük a Cx26, Cx32, Cx43 és Cx46 expresszióját a klasszifikációs rendszerek csoportjaiban a teljes túléléssel összefüggésben. Mivel az esetek Gauss görbe alapján oszlottak meg a klasszifikációs rendszerek alcsoportjaiban, és csak néhány eset került a szélső csoportokba, így a közbülső csoportokra fókuszáltunk.

Kemoterápia előtt a >20% Cx46 (2, 3+) expressziójú tumorok szignifikánsan jobb túlélést mutattak az EWGBSP TR2b (p=0,006), a Sataloff TB (p= 0,005) és a Miller-Payne G3 (p=0,002) alcsoportban összehasonlítva a <20% (0, 1+) Cx46 expressziójú esetekhez képest. Hasonló összefüggést találtunk a kemoterápia utáni Cx46 expresszióval is. A Sataloff TB alcsoportban a >20% Cx46 expressziójú esetek (2, 3+) szignifikánsan jobb túlélést mutattak (p= 0,029), mint a <20% Cx46 expressziójú daganatok (0, 1+). A Miller-Payne G3 alkategóriában a >5% Cx46 expresszió (1-3+)

szignifikánsan jobb túlélést mutatott a <5% Cx46 expressziójú eseteknél (p=0,012). Az EWGBSP TR2b alcsoportban a >20% Cx46 expresszió (2, 3+) szignifikánsan jobb túlélést jelentett, mint a <20% (0, 1+) Cx46 expresszió (**11/b. és 12. ábrák**).

Kemoterápia után a <5% Cx26 (0) expressziójú esetekben a túlélés szignifikánsan jobbnak bizonyult az NSABP pINV csoportban, mint a >5 % Cx26 expressziójú esetekben (1,2,3+) (p=0,013). Egyéb alkategóriákban is hasonló, közel szignifikáns tendencia volt megfigyelhető: EWGBSP TR2b (p=0,08), Sataloff TB (p=0,092), Miller-Payne (p=0,053) és CPS EG 4 (p=0,06).



12. ábra Kemoterápia előtti és utáni Cx46 expresszió az EWGBSP TR2b, Sataloff TB és Miller-Payne G3 klasszifikációs rendszerek alcsoportjaiban Kaplan-Meier görbéken ábrázolva. *A kemoterápia előtti és utáni emelkedett Cx46 expresszió szignifikánsan jobb teljes túlélést mutatott az összes alkategóriában (p=0,002-0,005).*

5.10. Cx26 és Cx46 kifejeződésének prognosztikus értéke neoadjuvánsan kezelt primer emlőrákokban

Log-rank teszttel a kezelés utáni Cx26, ER és PgR státusz, a kezelés előtti és utáni Cx46 expresszió, valamint a CPS EG klasszifikáció mutatott szignifikáns összefüggést a túléléssel. Azokat a klinikopatológiai jellemzőket, amelyek nem mutattak statisztikai összefüggést egymással, multivariancia analízisnek vetettük alá (**9. táblázat**). A HER2 státusz, a proliferáció, a grade, a stádium, a kemoterápia előtti tumorméret, a kezelésre adott patológiai válasz (tumor cellularitás %) nem függött össze a túléléssel, így ezeket nem vettük bele az analízisbe.

Az egész beteganyagot tekintve a kemoterápia utáni hormon receptor pozitív esetek szignifikánsan jobb túlélést mutattak, mint a hormon negatív esetek (p_{ER}=0,012, p_{PgR}=0,002). A kemoterápia utáni ER és PgR státusz szignifikánsan jobb független prognosztikus faktornak bizonyult, mint a kemoterápia utáni Cx26 és a CPS EG klasszifikációs rendszer (**9. táblázat**). Az utóbbi kettő nem mutatott szignifikanciát.

A klasszifikációs rendszerek közbülső csoportjaiban (EWGBSP TR2b, Sataloff TB, Miller-Payne G3) a kemoterápia előtti Cx46 expresszió volt az egyetlen potenciális prognosztikus faktor, amely szignifikáns összefüggést mutatott a túléléssel. Kemoterápia után csak a PgR pozitív esetek mutattak szignifikánsan jobb túlélést az EWGBSP TR2b (p=0,03), a Sataloff TB (p=0,05) és a Miller-Payne G3 (p=0,006) alcsoportokban. Ezek közül egyik sem bizonyult szignifikánsan független prognosztikus markernek a Cox-regressziós multivariancia analízis során (**9. táblázat**).

9. táblázat *Connexin expresszió, hormonreceptor és a CPS EG tumor klasszifikáció Cox-regressziós multivariancia analízise emlőrákok csoportjaiban.*

Betegcsoport	Paraméter	p érték	HR	95% CI	
				Alsó	Felső
Egész beteganyag	Cx26 k.u.	0,303	0,450	0,098	2,055
	ER k.u.	0,050	2,739	0,999	7,504
	Cx26 k.u.	0,157	0,134	0,008	2,173
	PgR k.u.	0,027	6,509	1,241	34,140
	CPS EG	0,967	0,000	0,000	1,381E26
EWGBSP TR2b	Cx46 k.u.	0,790	4,400	0,844	22,950
	PgR k.u.	0,115	3,809	0,722	20,111
Sataloff TB	Cx46 k.u.	0,226	3,789	0,439	32,600
	PgR k.u.	0,244	2,791	0,496	15,711
Miller-Payne G3	Cx46 k.u.	0,104	3,322	0,782	14,105
	PgR k.u.	0,075	4,400	0,861	22,481

k.u.: kezelés után, HR: hazard funkció, CI: Konfidencia intervallum

6. MEGBESZÉLÉS

A hagyományos és molekuláris prognosztikus és prediktív markerek vizsgálata és használata ellenére az emlőrák heterogenitása és terápia rezisztenciája a betegség további molekuláris stratifikációját sürgeti (90, 91). Napjainkban a neoadjuváns kemoterápia az egyik standard kezelési mód a helyileg előrehaladott és a primer operábilis emlőrákokban egyaránt (18-21). A patológiai válasz és a prognózis felmérésére morfológiai klasszifikációs rendszerek állnak rendelkezésünkre. Ezek olyan patológiai sajátosságokat vesznek figyelembe a nyirokcsomó státusszal vagy anélkül, mint a reziduális tumorsejtek százalékos aránya vagy az *in situ* komponens hiánya illetve megléte (16, 18-21). Olyan biomarker azonban, amely megbízhatóan megjósolná a primer szisztémás terápiára adott választ, vagy segítene a betegség lefolyásának pontosabb megítélésében, egyelőre még nem elérhető.

A connexinek funkcionálhatnak a sejtmembránban csatornaként vagy félcsatornaként, illetve intracitoplazmatikus fehérjékkel való kapcsolataik révén fontos szerepet játszanak a sejtek homeosztázisában, beleértve a sejtciklus szabályozását is (38, 40, 42, 43, 46, 92). A legtöbb összefüggést a connexinek és a sejtciklus gátlása között eddig a Cx43-mal kapcsolatban találtak (57). Az emelkedett Cx43 kifejeződés blokkolni tudja a G1/S fázis átmenetet vagy késlelteti a G2/M átmenetet a $p21^{waf1}$ növelésén és a Cdk2 szint csökkentésén keresztül (93). A Cdk1/cyclinB komplex képes foszforilálni a Cx43 fehérjét a G2/M fázis átmenetnél és ezáltal csökken a gap junction csatornák összeszerelődése a sejtmembránban (57). Tehát a connexinek expressziója dinamikusan változik a sejtciklus során. Emlőrák sejtvonalakon G1/S fázisban alacsony Cx26 szintet figyeltek meg, késői S/G2 fázisban emelkedett, M fázisban pedig csökkent Cx26 expressziót találtak (94). A connexinek által alkotott membráncsatornák deregulációjának szerepe felvetődött az emlőmirigy karcinogenezisben és az emlőrák progressziójában, de a connexinek és a betegség prognózisával lehetséges kapcsolatát alig vizsgálták (54, 95).

Munkánk során a connexinek mRNS és fehérje expresszióját vizsgáltuk az emlőrák progressziójával kapcsolatban. Két, közel 2000 esetet tartalmazó mRNS expressziós array adatbázis (Affymetrix és Illumina) connexinekre vonatkozó eredményeinek elemzését végeztük el és keresztvalidáltuk egymással. Analizáltuk a connexin mRNS-ek (Cx26, Cx30, Cx32, Cx43, Cx46) kifejeződését és ezek összefüggéseit a

relapszusmentes túléléssel (RFS), a távoli áttétmentes túléléssel (DMFS), valamint a teljes túléléssel (OS). Elemeztük továbbá neoadjuvánsan és adjuvánsan kezelt emlőrákok connexin fehérje izotípus és proliferációs marker kifejeződését a klinikopatológiai paraméterek és a prognózis függvényében, összevetve az mRNS expresszió eredményeivel. A connexin fehérje szintek és a neoadjuváns terápiára adott válasz összefüggéseit is vizsgáltuk a terápia eredményességét értékelő klasszifikációs rendszerekben. A TMA mintáink többszintű, többcsatornás digitalizálása pedig lehetővé tette a connexin fehérjék pontos detektálását, anélkül, hogy azok elhalványodtak volna.

Kimutattuk 5 connexin izotípus, köztük a korábban már leírt GJA1/Cx43, GJB2/Cx26 fehérje expresszióját normál emlőhámban, illetve elsőként írtuk le a GJA5/Cx30, GJB1/Cx32 és GJA3/Cx46 fehérjét normál emlőben (71, 77, 81, 94, 96), valamint a GJA5/Cx30 izotípust emlőrákokban.

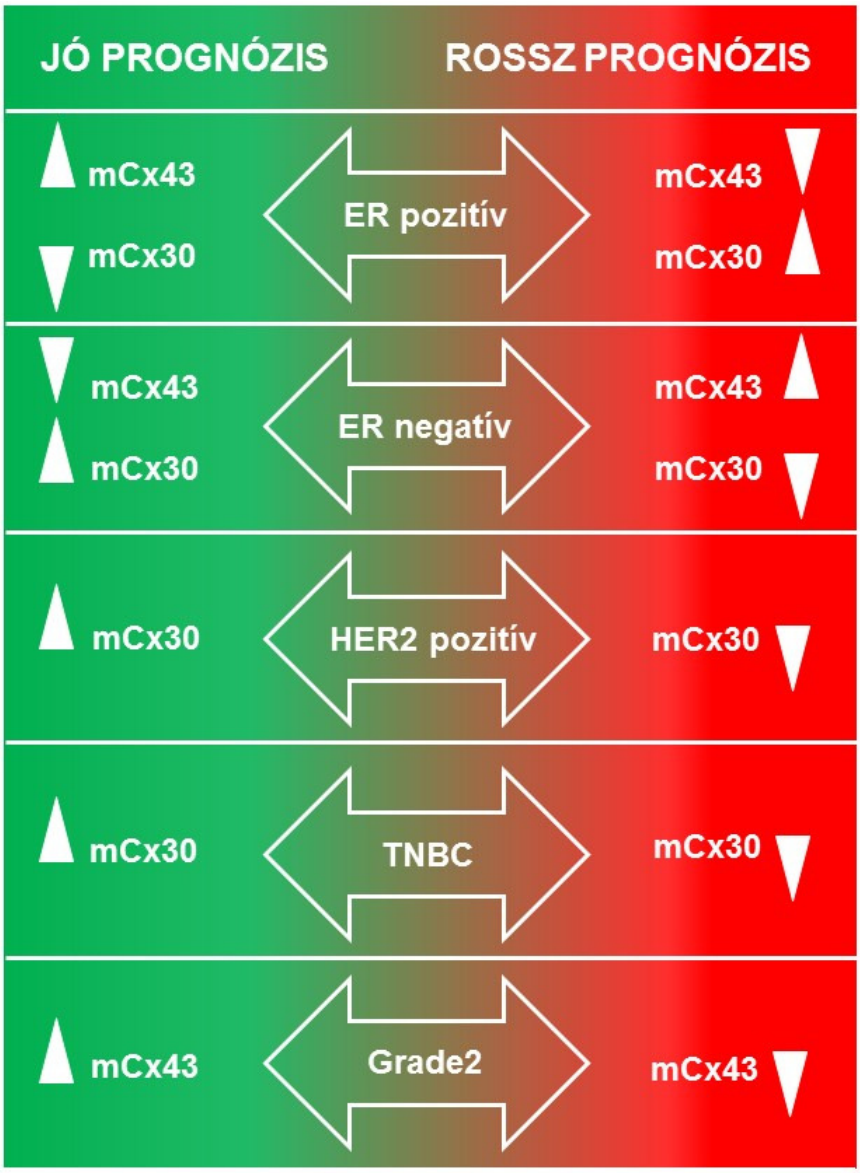
Az mRNS eredményekkel egyezően, az emelkedett Cx43 fehérjeszint szignifikánsan jobb túléléssel járt együtt az adjuvánsan kezelt emlőrákokban; sőt, a Cx43 fehérje az érinvációnál és a nekrózisnál jobb független prognosztikus markernek bizonyult az adjuvánsan kezelt tumorokban. Ezek az eredményeink ellent mondanak Conklin és munkatársai eredményének, amely szerint a Cx43 szint nem korrelál a túléléssel (75). Munkájukban az immunhisztokémiai eljárás során citrátos antigén feltárót használtak 60-90ºC között. A mi tapasztalatunk az, hogy citrátos feltáró nem „mutatja meg” az összes connexin molekulát. Illetve a 60-90ºC nem elegendő a megfelelő reakció eléréséhez. Munkánkban Tris EDTA feltárót használtunk 105ºC-on. Tapasztalatunk az, hogy ezzel a feltárási technikával kapjuk a legmegfelelőbb reakciót. Továbbá az ő munkacsoportjuk peroxidázos immunhisztokémiai eljárást alkalmazott. Az immunfluoreszcens technika azonban munkacsoportunk szerint egyelőre biztosabb eredményt hoz. Mi többszintű szkennelést alkalmaztunk a minél pontosabb detektálás érdekében. Valamint Conklin és munkatársai Sigma-Aldrich által forgalmazott Cx43-at használta, míg munkacsoportunkunk a Cell Signaling által forgalmazottal dolgozott.

A Cx43 eredményeinktől eltérően az emelkedett Cx30 mRNS és fehérje expresszió csökkent túlélést mutatott, és a Cx30 fehérje a mitotikus indexnél és a nekrózisnál jobb negatív prognosztikus markernek bizonyult. A többi connexin mRNS szinten megfigyelt prognosztikus értéke vagy elveszik (Cx46), vagy ellentmond (Cx26 és Cx32) fehérje szinten. Ez azt jelzi, hogy ezeknek az izotípusoknak a regulációja

összetett, valószínűleg poszt-transzkripciós (pl. micro-RNS) és poszt-transzlációs (módosult fehérje) mechanizmusok is befolyásolják. Eredményeink arra utalnak, hogy a connexin expresszió detektálása alkalmas lehet az emlőrák biológiai viselkedésének (prognózis) és akár terápiás válaszkészségének (predikció) előrejelzésére.

A legtöbb adat a connexinek expressziójának regulációja kapcsán a jó prognózist jelző Cx43-hoz kapcsolódik (97), amit a mi mRNS és fehérje adataink is alátámasztanak. A vizsgált gén array adatok azt mutatják, hogy az ER pozitív primer emlőrákokban a Cx43 mRNS expresszió a tumorszupresszióhoz kapcsolódik (98), míg az ER negatív esetekben tumorprotektív szerepe lehet (79). A 17β ösztradiol az ERα-n keresztül elősegíti mind az emlő epithelialis sejtek proliferációját (99), mind pedig a Cx43 csatornák képződését és működését, utóbbiak ugyanakkor részt vesznek a sejtciklus kontrolljában is (100, 101). Ezért a Cx43 csatornák hozzájárulnak a tumorsejtek jobb differenciációjához és a kedvezőbb túléléshez ER pozitív tumorokban (102). Az ER negatív emlőrákok esetében a Cx43 expressziót főleg más jelutak – pl. a Wnt-1 és/vagy a Ras-Raf-MAPK – szabályozzák, (97), amelyek mitogén szignálutak részei is, így hozzájárulhatnak a differenciálatlanabb fenotípus kialakulásához és a rosszabb prognózishoz (103). Ennek megfelelően az adjuvánsan kezelt előrehaladott ER negatív eseteinkben a connexinek is hozzájárulhatnak a metasztázis kialakításához, a tumorsejtek endothelen átjutásához, az emlőrák sejtek áttéti kolonizációjához, ahogy ezt számos tanulmány leírta (52, 78, 79, 82, 104). Az ER altípus is hatással lehet a betegség kimenetelére, mert az ERβ aktiváció például gátolja a Cx43 kifejeződést és a tumor növekedését (100). A Cx43 prognosztikus értéke megmaradt a hormonterápia után is, így feltételezhető, hogy a tamoxifen és az aromatáz inhibitorok blokkolhatják a mitogén szignálokat anélkül, hogy a Cx43 expressziójában és funkciójában érdemi változás bekövetkezne (103).

Az emelkedett Cx30 mRNS expresszió a Cx43 transzkriptumhoz képest csaknem teljesen ellentétes prognosztikus értékkel bír. Míg az ER pozitív esetekben a csökkent túléléssel mutatott összefüggést, addig HER2 pozitív és tripla negatív daganatokban szoros tendenciát mutatott a jobb túléléssel. Eredményeink rámutatnak a connexinek komplex és egyben egymást kiegészítő regulációjára emlőrákok carcinogenesisében és progressziójában (**13. ábra**).



13. ábra. Cx43 és Cx30 mRNS (m) és fehérje (p) kifejeződése és összefüggése a prognózissal primer emlőrákok alcsoportjaiban és különböző differenciáltságú tumorjaiban. *A magas és alacsony Cx43 fehérje szint tovább finomította jó és rossz prognózisú alcsoportokra a grade 2-es daganatokat a relapszusmentes túléléssel összefüggésben, míg az emelkedett és csökkent Cx30 expresszió a grade 3-as daganatokat bontotta rossz és jó prognózisú alcsoportokra a teljes túlélés tekintetében. Az emelkedett Cx43 szint szignifikánsan jobb túlélést mutatott ER pozitív és grade 2-es tumorokban, viszont a rosszabb túléléshez kapcsolódott ER negatív esetekben. Az emelkedett Cx30 expresszió jobb túlélést mutatott ER negatív, HER2 pozitív és tripla negatív (TNBC) daganatokban, és a rosszabb túléléshez kapcsolódott ER pozitív tumoroknál.*

Az emelkedett Cx46 mRNS expresszió szintén jobb túlélést mutatott adjuvánsan kezelt ER pozitív esetekben, és ez megmaradt az ER negatív tumoroknál is. Ez utóbbi megfigyelés a Cx43 és Cx46 mRNS ellentétes szabályozására utal ER negatív emlődaganatokban, megegyezően azokkal az adatokkal, amelyek szerint a tumor promoter forbol észter (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetát) (105) vagy a MAPK/ERK (106) jelút hatására a Cx43 szint csökken, míg a Cx46 szintje ezzel párhuzamosan emelkedik. A connexinek differenciált szabályozása így hozzájárulhat kondicionális tumorszupresszor szerepükhöz primer emlőrákokban, vagy akár tumorvédő hatásukhoz előrehaladott, áttétes esetekben (74, 78, 79, 82). Nőgyógyászati tumorokban például a forbol észter elősegíti a Cx26 újratermelődését, progeszteron hatására pedig lecsökken a Cx26 szintje. Ugyanakkor progeszteron hatása ellentétes a Cx43 kifejeződésére (94, 107, 108). A 17β ösztradiol szintén elősegíti a Cx43 expresszióját és funkcióját (100), de csökkenti a Cx26 és Cx32 kifejeződését illetve aktivitását (109).

Korábban leírták, hogy a connexinek csatornafüggetlen funkciókat is betölthetnek malignus tumorokban – ezt az általunk detektált connexinek citoplazmatikus megjelenése emlőrákokban alátámaszthatja (45, 104). Szoros összefüggést találtunk a connexinek mRNS és fehérje szintű kifejeződése és az emlőrák prognózisa között azon izotípusoknál, amelyek a normál emlőmirigyben vagy a myoepithelben (Cx43), vagy a myoepithelben és a luminalis sejtekben egyaránt előfordulnak (Cx30 és Cx46). Ezzel szemben a normál emlőhámban csak a luminalis sejtek között kimutatható connexinek (Cx26 és Cx32) összefüggése a prognózissal ellentmondásos. Ez arra enged következtetni, hogy a myoepithelben megjelenő connexinek expressziója következetesebb, mint a luminalis sejtek között megjelenő izotípusoké, legalábbis a malignus daganatokban. Ennek megfelelően, mRNS adataink szerint az emelkedett Cx43 expresszió a jobb, az emelkedett Cx30 szint a rosszabb prognózissal függ össze a relapsusmentes túlélés szempontjából, beteganyagunk egészét tekintve. Eredményeink jelentősége abban rejlik, hogy a különböző connexin izotípusok meghatározásával a prognosztikus csoportokat további releváns alcsoportokra oszthatjuk. A Cx43 expresszió a grade 2-es tumorokat, a Cx30 expresszió a grade 3-as tumorokat bontja jó és rossz prognózisú csoportokra a relapszusmentes túlélés szempontjából (13. ábra). A connexinek prognosztikus jelentőségét szintén

alátámasztja, hogy a Cx43 fehérjeszint pozitív korrelációt mutat az ER pozitivitással, negatív összefüggést a tumor differenciáltságával, a Cx30 protein expresszió pedig pozitív korrelációt mutat a mitotikus indexszel. Ezzel szemben az emelkedett Cx26 mRNS szint luminalis B tumorokban a rossz betegségkimenettel függött össze, de fehérje szinten jobb betegségmentes túléléshez kapcsolódott az egész beteganyagban és az ER pozitív esetekben is. A fokozott Cx32 mRNS expresszió a jobb relapszusmentes túléléshez volt köthető, de fehérje szinten ezzel ellentétes prognózishoz kapcsolódott.

A Cx26 és Cx32 mRNS szintű kifejeződésének és a két beteganyag fehérje szintű vizsgálatainak prognosztikus összefüggései között ellentmondó megfigyelések is vannak. Az adatbázisok elemzése során a csökkent Cx26 mRNS kapcsolódott a jobb túléléshez. Ezt a megfigyelésünket alátámasztja, hogy a neoadjuvánsan kezelt emlődaganatokban a kezelés hatására a Cx26 szintje szignifikánsan lecsökkent, és ez a csökkenés statisztikailag jobb teljes túlélést is mutatott (p=0,011). Az adjuvánsan kezelt emlőrákokban azonban az emelkedett Cx26 expresszióhoz kapcsolódott jobb betegségmentes túlélés. A Cx26 expresszió prognosztikus jelentése mások eredményeiben is mutat ellentmondásokat. Míg pancreas- és prostata carcinomákban az emelkedett Cx26 expresszió hozzájárult a carcinogenesishez (110, 111), addig primer gyomor- és colorectalis daganatokban a csökkent Cx26 kifejeződés csökkent túléléssel járt (112, 113). A Cx32 fehérjével kapcsolatos eredmények a két beteganyagban megegyeznek, ami negatív prognosztikus jelentőségre utal. Az emelkedett Cx32 szint mRNS szinten viszont jobb túléléshez kapcsolódott. Mivel szoros összefüggés van a független mRNS array platformok eredményei között, az alkalmazott antitestjeink Western-blottal validáltak, ezért az mRNS és fehérje szintű prognosztikus eredmények közötti ellentmondás valószínűleg nem a hibás próbák vagy technikai kivitelezés következménye. Transzkripciós faktorok és epigenetikai folyamatok mellett poszttranszlációs útvonalak is részt vehetnek a connexinek szabályozásában emlőrákokban, amelyek a Cx26 és Cx32 esetében valószínűleg jelentősebben hatnak, mint más általunk vizsgált izotípusoknál (114). Ilyen poszttranszkripciós faktorok lehetnek a mikro-RNS-ek, hiszen a connexin génekben számos micro-RNS kötő hely található a 3’ át nem íródó régiókban, amelyek a fehérjeszint sejtspecifikus regulációjához hozzájárulhatnak (115). Ezen kívül a connexineket fehérje szinten – tumorstádiumtól függően több degradációs mechanizmus –a lizoszomális, az autophagia

közvetített vagy proteoszomális lebontás– is befolyásolja. A Cx43 és a TRIM21 (E3 ubiquitin-protein ligáz) interakciója során például csökken a Cx43 szintje (116, 117). Ezen molekulák tumorprogresszióban betöltött szerepe további vizsgálatra szorul. Ráadásul a connexineket egyéb poszttranszlációs módosulások is érhetik (foszforiláció, SUMOyláció, nitroziláció, hidroxiláció, acetiláció vagy metiláció), amelyek megváltoztathatják a fehérjék konformációját, így hatással lehetnek a használt antitestek által felismert antigén epitópokra (118, 119).

A mi eredményeink és más munkacsoportok megfigyelései azt sugallják, hogy a Cx26 regulációja sokkal komplexebb és dinamikusabban változó, mint a Cx43-é vagy Cx46-é. A Cx26 prognosztikai szerepe valószínűleg sejttípus függő. Expresszióját és prognosztikai értékét nagyban befolyásolhatja a tumor kiterjedtsége (stage), a kezelés és a grade is. Az eltérő eredményekben a beteganyagok eltérő összetétele is szerepet játszhat. A 96 svájci eset jórészt grade 2-es illetve grade 3-as differenciáltságú neoadjuvánsan kezelt tumorokból állt, mindössze 1 eset volt grade 1-es tumor. A magyar betegek ezzel szemben adjuváns kezelésben részesültek, a 127 eset egyformán tartalmazott grade 1, grade 2 és grade 3-as daganatokat is. Bioinformatikai elemzéseink során is nagyrészt grade 2-es és grade 3-as daganatokat vizsgáltunk. A két beteganyagban nem azonos Cx26 antitestet használtunk, azonban mindkettő azonos reakciót adott a belső pozitív kontrollként használt normál emlőhámban.

A neoadjuvánsan kezelt emlőrákok tanulmányozása során a legfontosabb megfigyelésünk az volt, hogy a kemoterápia előtti és utáni Cx46 expresszió, illetve a kemoterápia utáni Cx26 expresszió további releváns alcsoportokra oszthatja a klasszifikációs rendszerek által meghatározott közbenső kategóriákat, a Miller-Payne G2-3-at, a Sataloff TB-t, az EWGBSP TR2b-t illetve a CPS EG 4-et (11/b ábra). Ráadásul a kemoterápia előtt a Cx46 fehérje expresszió volt az egyetlen paraméter, amely korrelált a teljes túléléssel. Ez azért lehet jelentős, mert mások is megfigyelték már, hogy a klasszikus biomarkerek, mint a PgR, HER2, grade vagy a tumor méret nem feltétlen korrelálnak a prognózissal sem kemoterápia előtt, sem utána (120).

A connexinek emlőrákok kialakulásában, progressziójában és metasztázis képzésében betöltött szerepét ez idáig csak kevesen vizsgálták (72-74). A connexin43 re-expressziója *in vitro* szenzitizálhatja a tumorsejteket a kemoterápiás szerekre (paclitaxel és doxorubicin) (121). Primer emlőrákok esetében a nyirokcsomó áttétekben

magasabb Cx26, Cx32 és Cx43 expresszió volt megfigyelhető, mint a primer tumorokban (73, 74). Mások emelkedett Cx26 és Cx43 expressziót írtak le emlőrák áttétekben (74). A Cx46-nak szerepe van MCF-7 emlőrák sejtvonalban a tumorsejtek hypoxia elleni védekezésében. Hypoxiás körülmények között a Cx46 szintjének anti-Cx46 siRNS-sel való lecsökkentése a tumorsejtek pusztulását idézte elő, míg normoxiás körülmények között az élő sejtek száma nem változott. Cx46 prognosztikus jelentőségét azonban nem vizsgálták még emlőrákokban (77).

A connexin expresszió változását, illetve potenciális prognosztikus és prediktív szerepét sem vizsgálták korábban az emlőrákok neoadjuváns kezelése kapcsán. Neoadjuvánsan kezelt eseteinkben a connexin expresszió és a klinikopatológiai paraméterek (hormonreceptor státusz, HER2 vagy Ki67 szint) közötti összefüggések elemzésével nyert eredményeink arra engednek következtetni, hogy az egyes connexin izotípusok eltérő módon vesznek részt az emlőrák sejtek funkcióinak szabályozásában. Hasonlóan más tanulmányokhoz, megerősítettük, hogy a Cx43 expresszió és a hormon receptor státusz között pozitív összefüggés figyelhető meg neoadjuváns kemoterápia előtt és után egyaránt (75). Ugyancsak pozitív összefüggést figyeltünk meg a Cx32 és a HER2 szint között, valamint a Cx32 és a Ki67 pozitivitás között. Negatív korrelációt találtunk a Cx43 és a HER2 pozitivitás, valamint a Cx46 és a Ki67 pozitivitás között. Ahogy előre várható volt, a hormon receptor státusz és a Ki67 között negatív összefüggés, a Ki67 és HER2 között pedig pozitív korreláció volt. Eredményeink arra utalnak, hogy a Cx43 és Cx46 tumorszupresszor, míg a Cx26 és Cx32 tumorprotektív szerepet tölthetnek be primer emlőrákokban. A pozitív összefüggés a Cx46 és a nyirokcsomó stádium között azzal magyarázható, hogy beteganyagunkban nincs összefüggés a nyirokcsomó státusz és a teljes túlélés között. A hónalji nyirokcsomó áttét jelenléte az egyik legerősebb prognoszitkusfaktor nypjainkban. Azonban van arra vonatkozó irodalom, hogy ez a prognosztikus faktor nem mutat összefüggést a betegség kimenetelével (122).

Tanulmányunkban a neoadjuváns kemoterápia hatására csökkent Cx26 és Cx32 szintek, valamint az emelkedett Cx46 szint a terápia hatékonyságát jelzik. A connexinek carcinogenesisben és a metasztázis kialakításában betöltött pontos szerepe ellentmondásos és minden valószínűség szerint kontextusfüggő. Számos korábbi tanulmány megállapította, hogy a primer szisztémás terápia hatására a különböző

biomarkerek szintje megváltozik (123-126). A hormon receptor státusz egyes megfigyelések szerint 2,5%-50% gyakorisággal változhat (124-126). A HER2 státusszal kapcsolatban is hasonló eredményekről számoltak be. A csak immunhisztokémiával tesztelt HER2 akár 43%-os eltérést is mutathat a kiinduláshoz képest (125, 126). Bár mi részleteiben nem vizsgáltuk, de anyagunkban <10% volt az eltérés az ER/PgR/HER2 státuszban neoadjuváns kemoterápiát követően.

Emlőrákokban a részleges és teljes patológiai válasz tekintetében a hormon receptor és HER2 státusz szintén intenzíven kutatott terület (127-132). Azok a rosszul differenciált HER2 pozitív és ER negatív daganatok, amelyeknek nincs nyirokcsomó áttétjük, sokkal jobban reagáltak a kemoterápiára, mint azok a tumorok, amelyek nyirokcsomó metasztázist adtak (127, 129-133). A mi beteganyagunkban az ER pozitív HER2 negatív daganatok főként a prognosztikailag köztes kategóriákba tartoztak. Így nem vizsgáltuk a hormon receptor és HER2 státuszt a neoadjuváns tarápiára adott részleges vagy komplett patológiai válasszal összefüggésben.

Munkánkban a primer szisztémás terápiában részesült emlőrákokat a napjainkban legelterjedtebb 5 klasszifikációs rendszerbe soroltuk be. Azt találtuk, hogy a CPS EG rendszerben az 1-2 pontra értékelt esetek szignifikánsan jobb teljes túlélést mutattak a 3-5 pontra értékelt tumoroknál. A többi klasszifikációs rendszer (NSABP, Miller-Payne, Sataloff, EWGBSP) és a teljes túlélés között nem találtunk szignifikáns összefüggést, ami valószínűleg abból adódik, hogy eseteink nagy része a prognosztikailag köztes kategóriákba esik. Tudomásunk szerint ilyen átfogó tanulmányt a klasszifikációs rendszerekkel eddig mások még nem végeztek neoadjuvánsan kezelt emlőrákokban.

A sejtmembránhoz kötött connexinek, amelyeket normál emlőmirigyben találtunk, megfelelnek funkcionáló csatornáknak, amelyek azonos alosztályon, így vagy GJA-n vagy GJB-n belül képesek kialakulni (lásd 5. ábra) (134). A kompatibilis sejtmembrán connexinek normál emlőmirigyben potenciális heterocelluláris csatornákat hozhatnak létre, amit természetesen további funkcionális vizsgálatokkal lehet tisztázni. Elméletileg a myoepithelialis Cx43 (GJA1) heterocellularis csatornát alakíthat ki Cx46 (GJA6) fehérjével, de a szintén myoepithelen illetve a luminalis sejtek között lévő Cx30 (GJB6) proteinnel nem. A Cx26 (GJB2) és Cx32 (GJB1) szintén létrehozhat homo- és hetrotípusos/heteromer csatornákat a luminalis sejtek között (135) és heterocelluláris

kapcsolatot a myoepithelialis Cx30 fehérjével (136, 137). A connexin fehérjék komplex kifejeződése és differenciált szabályozása lehetővé teszi az emlőmirigy működésének finom szabályozását, beleértve a sejtosztódást, sejt differenciációt, a regressziót és a laktációt is (72).

Összefoglalva, a connexin izotípusok expressziójának vizsgálatával és elemzésével tett megfigyeléseink segíthetnek az emlőrákok viselkedésének jobb megértésében, és akár a mindennapi gyakorlatban használhatóak lehetnek a primer szisztémás terápia hatékonyságának felmérésében és a betegség végkimenetelének megjósolásában.

7. KÖVETKEZTETÉSEK

A connexinek és az általuk formált gap junction csatornák kifejeződése dinamikusan változik a carcinogenesis és a tumor progressziója, metasztázis képzése során (54, 95). Emlőrákokban betöltött szerepük a mai napig tisztázatlan és ellentmondásos (71-74, 78, 79).

Munkánkban megállapítottuk, hogy a connexineknek önmagukban is van prognosztikus értékük. Bioinformatikai elemzés kapcsán a legerősebb tényezőnek az ellentétes regulációt mutató Cx43 és Cx30 mRNS bizonyult. Az emelkedett Cx43 szint szignifikánsan jobb túlélést mutatott ER pozitív, nyirokcsomó negatív és grade 2-es tumorokban, viszont a rosszabb túléléshez kapcsolódott ER negatív esetekben. Az emelkedett Cx30 expresszió jobb túlélést mutatott ER negatív, HER2 pozitív és tripla negatív daganatokban, de a rosszabb túléléshez kapcsolódott ER pozitív tumoroknál. Az eredményeket adjuvánsan és neoadjuvánsan kezelt emlőrákokon fluoreszcens immunhisztokémia segítségével validáltuk. A fehérje szintű vizsgálataink eredményei a Cx26 és a Cx32 esetében csak részben fedtek át az mRNS profillal, amit a connexinek komplex, poszttranszlációs, epigenetikai és degradációs változásai mellett a tumor kezelése is befolyásolhat.

Fehérje szinten legmegbízhatóbbnak adjuváns kezelés kapcsán a Cx43 és Cx30 bizonyult, amely önálló pozitív illetve negatív prognosztikus faktorként is megállja a helyét. Ezen felül a Cx43 tovább finomította a grade 2-es daganatokat, a Cx30 pedig a grade 3-as daganatokat jó és rossz prognózisú alcsoportokra.

Neoadjuváns kezelés kapcsán a connexinek kifejeződése dinamikus változást mutat. A terápia hatékonyságát jelzi a Cx26 és Cx32 csökkenése valamint a Cx46 szintjének emelkedése. A terápia hatására lecsökkenő Cx26 szintje szignifikánsan jobb túléléshez kapcsolódott beteganyagunkban. Legfontosabb megfigyelésünk, hogy a kemoterápia előtti és utáni Cx46 expresszió illetve a kemoterápia utáni Cx26 expresszió tovább finomítja a klasszifikációs rendszerek által meghatározott közbülső kategóriákat, létrehozva ezzel egy prognosztikailag kedvezőbb alcsoportok a Miller-Payne G2-3-ban, a Sataloff TB-ben, az EWGBSP TR2b-ben illetve a CPS EG 4-ben. Ráadásul a kemoterápia előtt a Cx46 fehérje expresszió volt az egyetlen paraméter, amely korrelált a teljes túléléssel.

Ezen felül normál emlőhámban elsőként mutattuk ki a Cx30, Cx32 és Cx46 fehérjét, illetve primer emlőrákban a Cx30 kifejeződését mi írtuk le elsőként.

8. ÖSSZEFOGLALÁS

A connexinek (Cx) és az általuk alkotott gap junction csatornák deregulációja fontos szerepet játszik az emlő carcinogenesisében. A neoadjuváns terápiára (PST) hatékonyságának megbecsülésére klasszifikációs rendszerek érhetőek el. Nincs azonban olyan biomarker, amely hatékonyan jelezné a terápia hatékonyságát és a betegség kimenetelét. Munkánk során a connexinek kifejeződését vizsgáltuk primer emlőrákokban összehasonlítva klinikopatológiai paraméterekkel és a prognózissal.

A Cx26, 30, 32, 43, 46 kifejeződését vizsgáltuk két, nyilvánosan elérhető adatbázis mRNS adatainak bioinformatikai elemzésével. Ugyanezen connexin fehérjéket és a proliferációt vizsgáltuk adjuvánsan és neoadjuvánsan kezelt emlőrákok szöveti multiblokkjain, többszintű, többcsatornás fluoreszcens digitális mikroszkópia segítségével. Számos, napjainkban használatos klasszifikációs rendszert használtunk a PST-re adott válasz megítélésére.

Normál emlőhámban elsőként írtuk le a Cx30, Cx32 és Cx46, emlőrákban pedig a Cx30 expresszióját. Az mRNS szintekkel megegyezően, az emelkedett Cx43 fehérje szint szignifikánsan jobb túlélést mutatott, ráadásul független és jobb prognosztikus markernek bizonyult, mint az érinvázió vagy a nekrózis adjuvánsan kezelt daganatokban. Ezzel szemben az emelkedett Cx30 fehérje szint szignifikánsan rosszabb túlélést mutatott, ezen kívül független és jobb prognosztikus markernek bizonyult a mitotikus indexnél és a nekrózisnál. A magas és alacsony Cx43 fehérje szint a túlélést tekintve, jó és rossz prognózisú alcsoportra osztotta a grade 2-es daganatokat, míg az emelkedett és csökkent Cx30 szint a grade 3-as daganatokat bontotta rossz és jó prognózisú csoportra. A csökkent Cx26 fehérje szint szignifikánsan jobb túlélést mutatott neoadjuvánsan kezelt daganatokban. Kemoterápia előtt és után az emelkedett Cx46 fehérje expresszió szignifikánsan jobb túlélést mutatott a klasszifikációs rendszerek közbülső alcsoportjaiban.

A Cx43 és Cx30 ellentétes expressziója pozitív illetve negatív prognosztikus markerként szolgálhat adjuvánsan kezelt emlőrákokban, segítve ezzel az emlőrákok további stratifikációját. Ezen kívül neoadjuváns kemoterápia esetén a Cx46 és Cx26 kifejeződése javíthat a patológiás válasz megítélésében és finomíthat a klasszifikációs rendszerek közbülső csoportjain.

9. ABSTRACT

Deregulation of connexins (Cx) and their gap junction channels is linked to breast carcinogenesis. Several classification systems are available to assess the pathological response to neoadjuvant chemotherapy. Reliable biomarkers to predict the efficiency of primary systemic therapy or disease outcome are still missing. In this study we examined the expression of connexin isotypes in primary breast cancers and correlated with clinicopathological parameters and prognosis.

The expression of Cx26, 30, 32, 43, 46 was evaluated in publicy available datasets containing mRNA expression data of breast cancer patients. Expressed connexins were also monitored at the protein level along with a proliferation marker in adjuvant and neoadjuvant treated cancers in tissue microarray using multilayer, multichannel fluorescence digital microscopy. Several classification systems are used to assess pathological response to neoadjuvant chemotherapy.

For the first time, Cx30, Cx32 and Cx46 was revealed in normal mammary gland and Cx30 was observed in breast cancer. In line with the significant correlations found at the mRNA level, elevated Cx43 protein levels were linked with significantly improved breast cancer outcome, offering Cx43 protein detection as an independent prognostic marker stronger than vascular invasion or necrosis. On the contrary, elevated Cx30 protein levels were associated with worse disease outcome, offering Cx30 protein detection as an independent prognostic marker outperforming mitotic index and necrosis. Elevated versus low Cx43 protein levels allowed the stratification of grade 2 tumors into good and poor survival subgroups, respectively. Also, elevated versus low Cx30 levels stratified grade 3 patients into poor and good survival subgroups, respectively. Decreased post-chemotherapy Cx26 expression statistically correlated with better survival. Elevated Cx46 expression pre- and post-chemotherapy correlated with significantly better survival in the intermediate subgroups of classifications.

Differential expression of Cx43 and Cx30 may serve as potential positive and negative prognostic markers, respectively, for a clinically relevant stratification of breast cancer. In neoadjuvant treated breast cancer, Cx46 and Cx26 expression may improve the assessment of pathological response and refine intermediate prognostic subgroups of residual tumor classification.

10. IRODALOMJEGYZÉK

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F.(2015) Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. Int J Cancer,1: 136(5).
2. Umberto Veronesi, Peter Boyle, Aran Goldhirsch, Roberto Orecchia, Giuseppe Viale.(2005) Breast cancer. Lancet,365: 1727-1741.
3. Tabar L, Yen MF, Vitak B, Chen HH, Smith RA, Duffy SW.(2003) Mammography service screening and mortality in breast cancer patients: 20-year-follow-up before and after introdction of screening. Lancet,361: 1405-1410.
4. Forrai G, Szabó É, Ormándi K, Ambrózay É, Péntek Z, Milics M, Rajtár M, Sinkovics I.(2010) A képalkotó vizsgálómódszerek alkalmazása az emlődaganatok korszerű diagnosztikájában és szűrésében. Magyar Onkol,54: 211-216.
5. Tse GM, Tan PH.(2010) Diagnosing breast lesions by fine needle aspiration or core biopsy: which is better? Breast Cancer Res Treat,123: 1-8.
6. (2013)WHO classification of tumours of the breast.
7. Cserni G.(2014) Őrszemnyirokcsomó-státusz és hónalji blokkdissectio az emlőrák sebészi ellátásában. Orv Hetil,155: 203-215.
8. Lázár G, Besznyák I, Boross G, Farsang Z, Gulyás G, Jakab F, Maráz R, Márkus B, Tóth L.(2010) Az emlőrák korszerű sebészi kezelése. Magyar Onkol,54: 227-234.
9. Fisher B, Anderson S, Bryant J, Margolese RG, Deutsch M, Fisher ER, Jeong JH, Wolmark N.(2002) Twenty-year follow-up of randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy, and lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer. N Eng J Med,347: 1233-1241.
10. Formenti SC, Rosenstein B, Skinner KA, Jozsef G.(2002) T1 stage breast cancer: adjuvant hypofractionated conformal radiation therapy to tumor be din selected postmenopausal breast cancer patients-pilot feasibility study. Radiology,222: 171-178.
11. Polgár C, Csejtei A, Gábor G, Landherr L, Mangel L, Mayer Á, Németh G, Fodor J.(2010) Sugárterápiás irányelvek. Magyar Onkol,54: 257-265.

12. Láng I, Kahán Z, Pintér T, Dank M, Boér K, Pajkos G, Faluhegyi Z, Pikó B, Eckhardt S, Horváth Z.(2010) Az emlőrák belgyógyászati onkológiai (gyógyszeres) kezelése. Magyar Onkol,54: 237-254.
13. Burris HA, III.(2004) Dual Kinase Inhibition in the Treatment of Breast Cancer: Initial Experience with the EGFR/ErbB-2 Inhibitor Lapatinib. Oncologist,9: 10-15.
14. Jubb AM, Oates AJ, Holden S, Koeppen H.(2006) Predicting benefit from antiangiogenic agents in malignancy. Nat Rev Cancer,6: 626-635.
15. Bean JR, Hosford SR, Symonds SR LK, Owens P, Dillon LM, Yang W, Shee K, Schwartz GN, Marotti JD, Muller KE, Rosenkranz KM, Barth RJ, Chen VS, Agarwal VR, Miller TW.(2015) The PI+k/mTOR dual inhibitor P7170 demonstrates potent activity against endokrine-sensitive and endokrine-resistant ER+ breast cancer. Breast Cancer Res Treat,149: 69-79.
16. Cserni G, Franz M, Jaray B, Kalman E, Kovacs I, Kulka J, Orosz Z, Udvarhelyi N, Vass L.(2010) Az emlőrák patológiai diagnosztikája feldolgozása és kórszövettani leletezése. Magyar Onkol,54: 217-226.
17. Kurio K, Toi M, Tsuda H, Kurosumi M, Akiyama F.(2006) Issues in the assessment of the pathologic effect of primary systemic therapy for breast cancer. Breast Cancer,13: 38-48.
18. Mittendorf EA, Jeruss JS, Tucker SL, Kolli A, Newman LA, Gonzalez-Angulo AM, Buchholz TA, Sahin AA, Cormier JN, Buzdar AU.(2011) Validation of a novel staging system for disease-specific survival in patients with breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy. J Clin Oncol,29: 1956-1962.
19. Sahoo S, Lester SC.(2009) Pathology of breast carcinomas after neoadjuvant chemotherapy: an overview with recommandations on specimen processing and reporting. Arch Pathol Lab Med,133: 633-642.
20. Shien T, Shimizu C, Seki K, Shibata T, Hojo T, Ando M, Kohno T, Katsumata N, Akashi-Tanaka S, Kinoshita T.(2009) Comparison among different classification systems regarding the pathological response of preoperative chemotherapy in relation to the long-term outcome. Breast Cancer Res Treat, 113: 307-313.

21. Cormier JN, Buzdar AU, Hortobagyi GN, Hunt KK (2008). Combined use of clinical and pathologic staging variables to define outcomes for breast cancer patients treated with neoadjuvant therapy. J Clin Oncol,26: 246-252.
22. Jeruss JS, Mittendorf EA, Tuckler SL, Gonzales-Angulo AM, Buchholz TA, Sahin AA, Cormier JN, Buzdar AU, Hortobagyi GN, Hunt KK.(2008) Staging of breast cancer in the neoadjuvant setting. Cancer Res,68: 6477-6481.
23. Székely B, Madaras L, Szentmártoni G, Szász AM, Baranyák Z, Szittya L, Torgyík L, Zergényi É, Borbényi E, Kenessey I, Korompay A, Langmár Z, Bánhidy F, Kulka J, Dank M.(2010) A fiatal- és időskori emlőrák összehasonlítása klinikopatológiai jellemzők alapján. Magy Onkol,54 19-26.
24. Wo JY, Chen K, Neville BA, Lin NU, Punglia RS.(2011) Effect of Very Small Tumor Size on Cancer-Specific mortality in Node-Positive Brast Cancer. J Clin Oncol,29: 2619-2627.
25. Packard RA, Prosnitz LR, Bobrow SN.(1977) Selection of Breast Cancer Patients for Adjuvant Chemotherapy. JAMA,238: 1034-1036.
26. Galea MH, Blamey RW, Elston CE, Ellios IO.(1992) The Nottingham Prognostic Index in primary breast cancer. Breast Cancer Res Treat,22: 207-219.
27. Welch DR, McClure SA, Aeed Pa, Bachner MJ, Adams LD.(1990) Tumor progression- and metastasis associated proteins identified using modell of locally recurrent rat mammary adenocarcinomas. Clin Exp Metast,8: 533-551.
28. Mayer EL.(2015) Targeting Breast Cancer with CDK Inhibitors. Curr Oncol Rep,17: 433.
29. Tőkés AM, Szász AM, Geszti F, Lukács LV, Kenessey I, Turányi E, Meggyesházi N, Molnár IA, Fillinger J, Soltész I, Bálint K, Hanzély Z, Arató G, Szendrői M, Kulka J.(2015) Expression of proliferation markers Ki67, cyclin A, geminin and aurora-kinase A in primary breast carcinomas and corresponding distant metastases. J Clin Pathol,68: 274-282.
30. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lonning PE, Borresen-Dale AL, Browb PO, Botstein D.(2000) Molecular portraits of human breast tumours. Nature,406: 747-752.

31. Herschkowitz JI, Simin K, Wigman VJ, Mikaelian I, Usary J, Hu Z, Rasmussen KE, Jones LP, Assefnia S, Chandrasekharan S, Bacjlud MG, Yin Y, Khramtsov AI, Bastein R, Quackenbush J, Glazer RI, Brown PH, Green JE, Kopelovich L, Furth PA, Palazzo JP, Olopade OI, Bernard PS, Churchill GA, Van Dyke T, Peou CM.(2007) Identification of conserved gene expression feautures between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. Genome Biol,8 R76.
32. van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, Dai H, Hart AA, Vodkuil DW, Schreiber GJ, Peterse JL, Roberts C, Marton MJ, Parrish M, Atsma D, Witteveen A, Glas A, Dalahaye L, van der Velde T, Bertelink H, Rodenhuis S, Rutgers ET, Fried SH, Bernards R.(2002) A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. N Eng J Med,347: 1999-2009.
33. Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, Baehner FL, Walker MG, Watson D, Park T, Hiller W, Fisher ER, Wickerham DL, Bryant J, Wolmark N.(2004) A multigene assay the predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. N Eng J Med,351: 2817-2826.
34. Sotiriou C, Wirapati P, Loi S, Harris H, Fox S, Smeds J, Nordgren h, Farmer P, Praz V, Haibe-Kains B, Desmedt C, Larsimont D, Cardoso F, Peterse H, Nuyten D, Buyse M, van de Vijver MJ, Bergh J, Piccart M, Delorenzi M.(2006) Gene expression profiling in breast cancer: understanding the molecular basic of histology grade to improve prognosis. J Natl Caner Inst,98: 262-272.
35. Nielsen MS, Axelsen LN, Sorgen PL, Verma V, Delmar M, Holstein-Rathlou NH.(2012) Gap junctions. Compr Physiol,2: 1981-2035.
36. Mese G, Richard G, White TW.(2007) Gap junctions: basic structure and function. J Invest Dermatol,127: 2516-2524.
37. White TW, Paul DL.(1999) Genetic diseases and gene knockouts reveal diverse connexin functions. Annu Rev Physiol,61: 283-310.
38. Goodenough DA, Paul DL.(2009) Gap junctions. Cold Spring Harb Perspect Biol,1: a002576.
39. Söhl G, Willecke K.(2004) Gap junctions and the connexin protein family. Cardiovasc Res,62: 228-232.

40. Vinken M, Vanhaecke T, Papeleu P, geerts A, Van Rossen E, Chipman Jk, Meda P, Rogiers V.(2006) Connexins and their channels in cell growth and cell death. Cell Signal,18: 592-600.
41. Saez JC, Berthoud VM, Branes MC, Martinez AD, Beyer EC.(2003) Plasma membrane channels formed by connexins: their cell regulation and function. Physiol Rev,83: 1359-1400.
42. Houghton FD.(2005) Role of gap junctions during early embryo development. Reproduction,129: 129-135.
43. Kryso DV, Leybaert L, Vandenabeele P, D'Herde K.(2005) Gap junctions and the propagation of cell survival and cell death signals. Apoptosis,10: 459-469.
44. Laird DW.(2010) The gap junction proteome and its relationship to disease. Trend Cell Biol,20: 92-101.
45. Zhou JZ, jiang JX.(2014) Gap junction and hemichannel-independent actions of connexins on cell and tissue functions-an update. FEBS Letter,588: 1186-1192.
46. Herve JC, Derangeon M, Sarrouilhe D, Giepmand BN, Bourmeyster N.(2012) Gap junctional channels are parts of multiprotein complexes. Biochim Biophys Acta,1818: 1844-1865.
47. Ruch RJ, Trosko JE.(2001) Gap-junction communication in chemical carcinogenesis. Drug Metab Rev,33: 117-124.
48. Fujimoto E, Sato H, Nagashima Y, Negishi E, Shirai S, Fukumoto K, Hagiwara K, Ueno K, Yano T.(2005) A Src family inhibitor (PP1) potentiates tumor-suppressive effect of connexin 32 gene in renal cancer cells. Life Sci,22: 2711-2720.
49. Huang R, Liu YG, Lin Y, Fan Y, Boynton A, Yang D, Huang RP.(2001) Enhanced apoptosis under low serum conditions in human glioblastoma cells by connexin 43 (Cx43). Mol Carcinog,32: 128-138.
50. Mesnil M, Crespin S, Avanzo JL, Zaidan-dagli ML.(2005) Defective gap junctional intercellular communication in the carcinogenic process. Biochim Biophys Acta,1719: 125-145.
51. Hirshi KK, Xu CE, Tsukamoto T, Sager R.(1996) Gap junction genes Cx26 and Cx43 individually suppress the cancer phenotype of human mammary

carcinoma cells and restore differentiation potential. Cell Growth Differ,7: 861-870.

52. Jamieson S, Going JJ, D'Arcy R, George WD.(1998) Expression of gap junction protein connexin 26 and connexin 43 in normal human breast and in breast tumours. J Pathol,184: 37-43.
53. Leithe E, Sirnes S, Omori Y, Rivedal E.(2006) Downregulation of gap junctions in cancer cells. Crit Rev Oncol,12: 225-256.
54. Czyz J.(2008) The stage-specific function of gap junctions during tumourigenesis. Cell Mol Biol Lett,13: 92-102.
55. Laird DW.(2010) The gap junction proteome and its relationship to disease. Trend Cells Biol,20: 92-101.
56. Oveida-Orta E, Errington RJ, Evans WH.(2002) Gap junction intercellular communication during lymphocyte transendothelial migration. Cell Biol Int,26: 253-263.
57. Cronier L, Crespin S, Strale PO, Defamie N, Mesnil M.(2009) Gap junctions and cancer: new functions for an old story. Antioxid Redox Signal,11: 323-338.
58. Simon AM, Goodenough DA, li E, Paul DL.(1997) Female infertility in mice lacking connexin 37. Nature,385: 525-529.
59. Bergoffen J, Schrer SS, Wang S, Scott MO, Bone LJ, Paul DL, Chen K, Lensch MW, Chance PF, Fischbeck KH.(1993) Connexin mutation in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. Science,262: 2039-2042.
60. Gong X, Li E, Klier G, Huang Q, Wu Y, Lei H, Kumar NM, Horwitz J, Gilula NB.(1997) Disruption of alpha3 connexin gene leads to proteolysis and cataractogenesis in mice. Cell,91: 833-843.
61. Zoidl G, Dermietzel R.(2010) Gap junctions in inherited human disease. Pflugers Arch,460: 451-466.
62. Reaume AG, de Sousa PA, Kulkarni S, Langille BL, Zhu D, Davies TC, Juneja SC, Kidder GM, Rossant J.(1995) Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin43. Science,267: 1831-1834.
63. Paznekas WA, Karczeski B, Vermeer S, Lowry RB, Delatycki M, Laurence F, Koivisto PA, Van Maldergem L, Boyadjiev SA, Bodurtha JN, Jabs EW.(2009)

GJA1 mutations, variants, and connexin 43 dysfunction as it release to the oculodentodigital dysplasia phenotype. Hum Mutat,30: 724-733.

64. Tomasetto C, Neveu MJ, Daley J, Horan PK, Sager R.(1993) Specificity of gap junction communication among human mammary cells and connexin transfectants in culture. J Cell Biol,122: 157-167.
65. Monaghan P, Clarke C, Perusinghe NP, Moss DW, Chen XY.(1996) Gap junction distribution and connexin expression in human breast. Exp Cell Res,223: 29-38.
66. Locke D.(1998) Gap junctions in normal and neoplastic mammary gland. J Pathol,186: 343-349.
67. Plante I, Stewart Mk, Barr K, Allan AL, Laird DW.(2011) Cx43 suppresses mammary tumor metasztázis to the lung in a Cx43 mutant mouse modell of human disease. Oncogene,30: 1681-1692.
68. Talhouk RS, Elble RC, Bassam R, Daher M, Sfeir A.(2005) Developmental expression patterns and regulation of connexins int he mouse mammary galnd: expression of connexin30 in lactogenesis. Cwll Tissue Res,319: 49-59.
69. Wilgenbus KK, Kirkpatrik CJ, Knuechel R, Willecke K, Traub O.(1992) Expression of Cx26, Cx32 and Cx43 gap junction protein sin normal and neoplastic human tissues. Int J Cancer,51: 522-529.
70. Lambe T, Finlay D, Murphy M, Martin F.(2006) Differential expression of connexin 43 in mouse mammary cells. Cell Biol Int,30: 472-479.
71. Laird DW, Fistouris P, Batist G, ALpert L, Huynh HT.(1999) Deficiency of connexin43 gap junctions is an independent marker for breast tumours. Cancer Res,59: 4104-4110.
72. McLachlan E, Shao Q, Laird DW.(2007) Connexins and gap junctions in mammary gland development and breast cancer progression. J Membr Biol,218: 107-121.
73. Kanzuga-Koda L, Sulkowska M, Koda M, Rutkowski R, Sulkowski S.(2007) Increased expression of gap junction protein-connexin 32 in lymph node metastases of human ductal breast cancer. Folia Histochem Cytobiol,45 Suppl 1: S175-180.

74. Kanzuga-Koda L, Sulkowski S, Lenczewski A, Koda M, Wincewicz A.(2006) Increased expression of connexin 26 and 43 in lymph node metastases of breast cancer. J Clin Pathol,59: 429-433.
75. Conklin C, Huntsman D, Yorida E, Makretsov N, Turbin D.(2007) Tissue microarray analysis of connexin expression and its prognostic significance in human breast cancer. Cancer Lett,255: 284-294.
76. Naoi Y, Miyoshi Naoi Y, Taquchi T, Kim SJ, Arai T, Tamaki Y, Noguchi S.(2007) Connexin26 expression is associated with lymphatic vessel invasion and poor prognosis in human breast cancer. Breast Cancer Res Treat,106: 11-7.
77. Banerjee D, Gakhar G, Madgwick D, Hurt A, Takemoto D.(2010) A novel role of gap junction connexin46 protein to protect breast tumors from hypoxia. Int J Cancer,127: 839-848.
78. Kapoor P, Saunders MM, Li Z, Zhou Z, Sheaffer N.(2004) Breast cancer metastatic potential: correlation with increased heterotypic gap junction intercellular communication between breast cancer cells and osteoblastic cells. Int J Cancer,111: 693-697.
79. Pollmann MA, Shao Q, Laird DW, Sanding M.(2005) Connexin 43 mediated gap junctional communication enhanced breast tumor cell diapedesis in culture. Breast Cancer Res,7: R522-534.
80. Seraj MG, Samants RS, Verderame MF, Welch DR.(2000) Functional evidence for a noval human breast carcinoma metasztázis supressor, BRMS1, encoded at chromosome 11q13. Cancer Res,60: 2764-2769.
81. Saunders MM, Seraj MJ, Li Z, Zhou Z, Winter CR.(2001) Breast cancer metaststic potential correlates with a breakdown in homospecific and heterospecific gap junctional intercellular communication. Cancer Res,61: 1765-1767.
82. Stoletov K, Strnadel J, Zardouzian E, Momiyama M, Park FD, Kelber JA, Pizzo DP, Hoffman R, VanderBerg SR, Klemke RL.(2013) Role of connexin in metastatic breast cancer and melanoma brain colonization. J Cell Sci,126: 904-913.
83. Fattaneh A, Tavasolli PD.(2003) WHO Series, -tumours of the Breast and Female Gentital Organs,18-19.

84. Sahoo S, Lester SC.(2009) Pathology of breast carcinomas after neoadjuvant chemotherapy: an overview with recommandations on specimen processing and reporting. Arch Pathol Lab Med,133: 633-642.
85. Gyorffy B, Lanczky A, Eklund AC, Denkert C, Budczies J.(2009) An online survival analysis tool to rapidly assess of effect 22277 genes on breast cancer prognosis using microarray data of 1809 patients. Breast Cancer Res Treat,123: 725-731.
86. Curtis C, Shah SP, Chin SF, Turashvili G, Rueda OM.(2012) The genomic and transcriptomic architecture of 2000 breast tumours reveals novel subgroups. Nature,486: 346-352.
87. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, Dowsett M, Fitzgibbons PL, Hanna WM, Langer A.(2007) American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline recommandations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. J Clin Oncol,25: 118-145.
88. Sohl G, Willecke K.(2004) Gap junctions and the connexin protein family. Cardiovasc Res,62: 228-232.
89. Gyorffy B, Lanczky A, Szallasi Z.(2012) Implementing an online tool for genome-wide validation of survival associated biomarkers in ovarian-cancer using microarray data from 1287 patients. Endocr Relat Cancer,19: 197-208.
90. Groenendijk FH, Bernards R.(2014) Drug resistance to targeted therapies: Deja vu all over again. Mol Oncol,8: 1067-1083.
91. Ng CK, Pemberton HN, Reis-Filho JS.(2012) Breast cancer intratumor genetic heterogeneity: causes and implications. Expert Rev Anticancer Ther,12: 1021-1302.
92. Rackauskas M, Neverauskas V, Skeberdis VA.(2010) Diversity and properties of connexin gap juncion channels. Medicina (Kaunas),46: 1-12.
93. Kamei J, Toyofuku T, Hori M.(2003) Negative regulation of p21 by beta-catenin/TCF signaling: a novel mechanism by which cell adhesion molecules regulate cell proliferation. Biochem Biophis Res Commun,312: 380-387.

94. Lee SW, Tomasetto C, Paul D, Keyomarsi K, Sager R.(1992) Transcriptional downregulation of gap-junction proteins blocks junctional communication in human mammary tumour cell lines. J Cell Biol,118: 1213-1221.
95. Naus CC, Laird DW.(2010) Implications and challenges of connexin connections to cancer. Nat Rev Cancer,10: 435-441.
96. Plante I, Wallis A, Shao Q, Laird DW.(2010) Milk secretion and ejection are impaired in the mammary gland of mice harboring a Cx43 mutant while expression and localization of tight and adherens junction proteins remain unchanged. Biol Reprod,82: 837-847.
97. Oyamada M, Oyamada Y, Takamatsu T.(2005) Regulation of connexin expression. Biochim Biophys Acta,1719: 6-23.
98. Shao Q, Wang H, McLachlan E, Veitch GI, Laird DW.(2005) Down-regulation of Cx43 by retroviral delivery of small interfering RNA promotes an aggressive breast cancer phenotype. Cancer Res,65: 2705-2711.
99. Helguero LA, Faulds MH, Gustafsson JA, Haldosen LA.(2005) Estrogen receptors alpha (ERalpha) and beta (ERbeta) differentially regulate proliferation and apoptosis of the normal murine mammary epithelial cell line HC11. Oncogene,24: 6605-6616.
100. Andersen J.(2000) Comparing regulation of the connexin43 gene by estrogen in uterine leiomyoma and pregnancy myometrium. Environ Health Perspect,108: 811-815.
101. Mesnil M.(2002) Connexins and cancer. Biol Cell,94: 493-500.
102. Carey LA, Perou CM, Livasy CA, Dressler LG, Cowan D.(2006) Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. Jama,295: 2492-2502:
103. Renoir JM, Marsaud V, Lazennec G.(2013) Estrogen receptor signaling as a target for novel breast cancer therapeutics. Biochem Pharmacol,85: 449-465.
104. Kalra J, Shao Q, Qin H, Thomas T, Alaoui-Jamali MA.(2006) Cx26 inhibits breast MDA-MB-435 cell tumorigenic properties by a gap junctional intercellular communication-independent mechanism. Carcinogenesis,27: 2528-2537.

105. Banerjee D, Das S, Molina SA, Madgwick D, Katz MR.(2011) Investigation of the reciprocal relationship between the expression of two gap junction connexin proteins, connexin46 and connexin43. J Biol Chem,286: 24519-24533.
106. Boswell BA, Le AC, Musil LS.(2009) Upregulation eóand maintenance of gap junctional communication in lens cell. Exp Eye Res,88: 919-927.
107. Lin VC, Eng AS, Hen NE, Ng EH, Chowdhury SH.(2001) effect of progesterone on the invasive properties and tumor growth of progesterone receptor-transfected breast cancer cells MDA-MB-231. Clin Cancer Res,7: 28802-2886.
108. Lesniewitz T, Kanzuga-Koda L, Baltaziak M, Jarzabek K, Rutkowski R.(2009) Comparative evaluation of estrogen and progesterone receptor expression with connexin 26 and 43 in endometrial cancer. Int J Gynecol Cancer,19: 1253-1257.
109. Saito T, Tanaka R, Wataba K, Kudo R, Yamasaki H.(2004) Overexpression of estrogen receptor-alpha gene suppress gap junctional intercellular communication in endometrial carcinoma cells. Oncogene,23: 1109-1116.
110. Kyo N, Yamamoto H, Takeda Y, Ezumi K, Ngan CY, Terayama M, Miyake M, Takermasa I, Ikeda M, Doki Y.(2008) Overexpression of connexin 26 in carcinoma of the pancreas. Oncol Rep,19: 617-631.
111. Tate AW, Lung T, Radhakrishnan A, Lim SD, Lin X, Edlund M.(2006) Changes in gap junctional connexin isoforms during prostate cancer progression. Prostate,66: 19-31.
112. Liu X, furuya T, Li D, Xu J, Cao X, Li Q, Xu Z, Sasaki K.(2010) Connexin 26 expression correlates with less agressive phenotype of intestinal type-gastric carcinomas. Int J Mol Med,25: 709-716.
113. Nomura S, Maeda K, Noda E, Inoue T, Fukunaga S, Nagahara H, Hirakawa K. Clinical significance of the expression of connexin 26 in colorectal cancer. J Exp Clin Cancer Res,29: 79.
114. Vinken M, De Rop E, Decrock E, de Vuyst E, Leybaert L.(2009) Epigenetic regulation of gap junctinal intercellular communication: more than a way to keep cells quiet? Biochim Biophis Acta,1759: 53-61.
115. Rash JE, Davidson KG, Kamasawa N, Yasumura T, Kamasawa M.(2005) Ultrastructural localization of connexins (Cx36, Cx43, Cx45), glutamate

receptors and aquaporin-4 in rodent olfactory mucosa, olfactory nerve and olfactory bulb. J Neurocytol,34: 307-341.

116. Falk MM, Kells RM, Berthoud VM.(2014) Degradation of connexins and gap junctions. FEBS Lett,588: 1221-1229.
117. Chen VC, Kristensen AR, Foster LJ, Naus CC.(2012) Association of connexin43 with E3 ubiquitin ligase TRIM21 reveals a mechanism for gap junction phosphodegron control. J Proteome Res,11: 6134-6146.
118. Su V, Lau AF.(2014) Connexins: mechanisms regulating protein levels and intercellular communication. FEBS Lett,588: 1212-1220.
119. Axelsen LN, Calloe K, Holstein-Rathlou NH, Nielsen MS.(2013) Managing the complexity of communication: regulation of gap junctions by post-translational modification. Front Pharmacol,4: 130.
120. Miglietta L, Vanella P, Canobbio L, Naso C, Cerisola N, Meszeros P, Parodi MA, Morabito F.(2010) Prognostic value of estrogen receptor and Ki-67 index after neoadjuvant chemotherapy in locally advanced breast cancer expressing high levels of proliferation at diagnosis. Oncology,79: 225-261.
121. Bier A, Oviedo-Landaverde I, Zhao J, Mamane Y, Kandouz M, Batist G.(2009) Connexin43 pseudogene in breast cancer cells offers a novel therapeutic target. Mol Cancer Ther,8: 786-793.
122. Giuliano AE, Hunt KK, Ballman KV, Beitsch PD, Whitworth PW, Blumencranz PW, Leitch AM, Saha C, McCall LM, Morrow M.(2011) Axillary dissection vs no axillary dissection in women with invasive breast cancer and sentinel node metasztázis: a randomized clinical trial. JAMA,305: 569-575.
123. Kulka J, Tokes AM, Toth Al, Szasz AM, Farkas A, Borka K, Jaray B, Szekely E, Istok R, Lotz G.(2009) Immunohistochemical phenotype of breast carcinomas predicts the effectiveness of primary systemic therapy. Magyar Onkol,53: 335-343.
124. Neubauer H, Gall C, Vogel U, Hornung R, Wallwiener D, Solomayer E, Fehm T.(2008) Changes in tumour biological markers during primary systemic chemotherapy. Anticancer Res,28: 1797-1804.

125. van de Ven S, Smit VT, Dekker TJ, Nortier JW, Kroep JR.(2011) Discordances in ER, PR and HER2 receptors after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. Cancer Treat Rev,37: 422-430.
126. Varga Z, Caduff R, Pestalozzi B.(2005) Stability of HER2 gene after primary chemotherapy in advanced breast cancer. Virchows Arch,446: 136-141.
127. Darb-Esfahani S, Loibl S, Muller BM, Roller M, Denkert C, Komor M, Schluns K, Blochmer JU, Budczies J, Gerber B.(2009) Identification of biology-based breast cancer types with distinct predictive and prognostic features: role of steroid hormon and HER2 receptor expression in patients treated with neoadjuvant anthracycline/taxane-based chemotherapy. Breast Res,11: R69.
128. Denkert C, Sinn BV, Issa Y, Maria Muller B, Maisch A, Untch M, von Minckwitz G, Loibl S.(2011) Prediction of Response to Neoadjuvant Chemotherapy: New Biomarkers Approaches and Concepts. Breast Care (Basel),6: 265-272.
129. Guiu S, Gauthier M, Coudert B, Bonnetain F, Favier L, Ladoire S, Tixier H, Guiu B, Penault-Llorca F, Ettore F.(2010) Pathological complete response and survival according to the level of HEr-2 amplification after trastuzumab-based neoadjuvant therapy for breast cancer. Br J Cancer,103: 1335-1342.
130. Precht LM, Lowe KA, Atwood M, Beatty JD.(2010) Neoadjuvant chemotherapy of breast cancer: tumour markers as predictors of pathologist response, recurrence, and survival. Breast J,16: 362-368.
131. Untch M, Fasching PA, Konecny GE, Hasmuller S, Lebeau A, Kreienberg R, Camara O, Muller V, du Bois A, Kuhn T.(2011) Pathologic complete response after neoadjuvant chemotherapy plus trastuzumab predicts favorable survival in human epidermal growth factor receptor 2-overexpressing breast cancer: results from the TECHNO trial of the AGO and GBG study groups. J Clin Oncol,29: 3351-3357.
132. von Minckwitz G, Sinn HP, Raab G, Loibl S, Blohmer JU, Eidtmann H, Hilfrich J, Merkle E, Jackisch C, Costa SD.(2008) Clinical response after two cycles compared to HER2, Ki-67, p53, and bcl-2 in independently predicting a pathological complets response after preoperative chemotherapy in patients with operable carcinoma of the breast. Breast Cancer Res,10: R30.

133. Osaka T, Horii R, Matsuura M, Ogija A, Domoto K, Miyagi Y, Takahashi S, Ito Y, Iwase T, Akiyama F.(2010) Common and discriminative clinicopathological features between breast cancers with pathological complete response or progressive disease in response to neoadjuvant chemotherapy. J Cancer Res Clin Oncol,136: 233-241.
134. Koval M, Molina SA, Burt JM.(2014) Mix and match: investigating heteromeric and heterotypic gap junction channels in model systems and native tissues. FEBS Lett,588: 1193-1204.
135. Locke D, Perusinghe N, Newman T, Jayatilake H, Evans Hm.(2000) Developmental expression and assembly of connexins into homomeric and heteromeric gap junction hemichannels in the mouse mammary gland. J Cell Physiol,183: 228-237.
136. Yum SW, Zhang J, Valiunas V, Kanaporis G, Brink PR.(2007) Human connexin26 and connexin30 from functional heteromeric and heterotypic channels. Am J Physiol Cell Physiol,293: C1032-1048.
137. Orthmann-Murphy JL, Freiden M, Fischer E, Scherer SS, Abrams CK (2007) Two distinct heterotypic channels mediate gap junction coupling between astrocyte and oligodendrocyte connexins. J Neurosci,27: 13949-13957.

11. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

11.1. Az értekezés témájában megjelent közlemények

1) Krenacs T, Zsakovics I, Diczhazi Cs, Ficsor L, Varga V S, Molnar B: The Potential of Digital Microscopy in Breast Pathology. Pathol Oncol Res 2009;15:55-58. IF= 1,152

2) Teleki I, Krenacs T, Szasz MA, Kulka J, Wichmann B, Leo C, Papassotiropoulos B, Riemenschnitter C, Moch H, Varga Z: The potencial prognostic value of connexin 26 and 46 expression in neoadjuvant-treated breast cancer. BMC Cancer 2013;13:50. IF=3,319

3) Teleki I, Szasz AM, Maros ME, Gyorffy B, Kulka J, Meggyeshazi N, Kiszner G, Balla P, Samu A, Krenacs T: Correlation of differentially expressed gap junction Cx26, Cx30, Cx32, Cx43, Cx46 with breast cancer progression and prognosis. PLos One 2014;9(11) IF=3,234

11.2. Egyéb témában megjelent közlemények

1) Tamás L, Szentkúti G, Eros M, Dános K, Brauswetter D, Szende B, Zsákovics I, Krenács T. Differential biomarker expression in head and neck cancer correlates with anatomical localization. Pathol Oncol Res 2011;17(3):721-7 IF=1,366

2) Rácz G, Csenki Z, Kovács R, Hegyi A, Baska F, Sujbert L, Zsákovics I, Kis R, Gustafson R, Urbányi B, Szende B. Subacute toxicity assessment of water disinfection byproducts on zebrafish. Pathol Oncol Res 2012;18(3):579-84 IF=1,555

3) Krenacs T, Kiszner G, Stelkovics E, Balla P, Teleki I, Nemeth I, Varga E, Korom I, Barbai T, Plotar V, Timar J, Raso E: Collagen XVII is expressed in malignant but not in benign melanocytic tumors and it can mediate antibody induced melanoma apoptosis. Histochem Cell Biol 2012;138(4):653-67 IF=2,613

4) Riemenschnitter C, Teleki I, Tischler V, Guo W, Varga Z: Stability and prognostic value of Slug, Sox9 and Sox10 expression in breast cancers treated with neoadjuvant chemotherapy. Springerplus 2013;2:695 IF=2,851

5) Meggyeshazi N, Andocs G, Balogh L, Balla P, Kiszner G, Teleki I, Jeney A, Krenacs T. DNA fragmentation and caspase-independen programmed cell death by modulated electrohyperthermia. Strahlenter Onkol 2014;190(9):815-22 IF=2,733

6) Kiszner G, Wichmann B, Nemeth IB, Varga E, Meggyeshazi N, Teleki I, Balla P, Maros ME, Penksza K, Krenacs T. Cell cycle analysis can differentiate thin melanomas from dysplastic nevi and reveals accelerated replication in thick melanomas. Virchows Arch 2014;465(5):603-12 IF=2,560

7) Andocs G, Meggyeshazi N, Balogh L, Spisak S, Maros ME, Balla P, Kiszner G, Teleki I, Kovago C, Krenacs T. Upregulation of heat shock proteins and the promotion of damage-associated molecular pattern signals in a colorectal cancer model by modulated electrohyperthermia. Cell Stress Chaperones 2015;20(1):37-46 IF=2,537

8) Rajnai H, Teleki I, Kiszner G, Meggyeshazi N, Balla P, Vancsik T, Muzes Gy, Csomor J, Matolcsy A, Krenacs T. Connexin 43 communication channels in follicular dentritic cell development and in follicular lymphomas. J Immunol Res. 2015 IF=2,934

9) Bánfi G, Teleki I, Nyírádi P, Keszthelyi A, Romics I, Fintha A, Krenács T, Szenda B. Changes of protein expression in prostate cancer having lost its androgen sensitivity. Int Urol Nephrol 2015 May 8. (Epub ahead of print) IF=1,293

12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom mindenekelőtt témavezetőmnek, Dr Krenács Tibornak, aki bevezett a molekuláris onkológia világába. Mindvégig végtelen türelemmel, időt és energiát nem kímélve támogatott munkám során.

Köszönöm Professzor Matolcsy Andrásnak, hogy lehetővé tette számomra, hogy az intézetben végezhessem kutatómunkámat, köszönöm továbbá Professzor Kopper Lászlónak és Professzor Kovalszky Ilonának, hogy lehetővé tették, hogy a doktori iskolában tanulhassak.

Parsch Edit emlékének, aki megismertette velem az immunhisztokémia rejtelmeit, hálás köszönetem érte. Köszömöm munkatársaimnak, Dr. Meggyesházi Nórának, Balla Péternek, Dr. Maros Máté Elődnek Dr. Kiszner Gergőnek, Dr. Rajnai Hajnalkának és Samu Alíznak a kísérletekben való segítséget és a sok vidám laborban eltöltött perceket. Köszönöm Dr. Hajdu Melindának dolgozatom házi bírálatát, a dolgozatommal kapcsolatos észrevételeit, építő jellegű kritikáját. Köszönöm Kis Renátának, aki megismertette és megtanította használni a metszet szkennert. Köszönettel tartozom Szász Marcellnek, aki számos segítséget nyújtott a menet közben felmerülő problémákra, valamint megismeretette velem az SPSS rejtelmeit. Köszönöm Professzor Kulka Janinának szakmai segítségét és észrevételeit.

Hálás köszönetem Dr. Varga Zsuzsannának és Professzor Holger Moch-nak, akik a Svájcban végzett kutatómunkámat lehetővé tették.

Köszönettel tartozom Wichmann Barnának és Győrffy Balázsnak a statisztikai számításokban végzett hasznos segítségükért. Köszönöm Laczik Cecíliának a technikai segítséget.

Köszönöm barátnőimnek, Dr. Németh Nórának és Dr. Mihalicza Ingridnek, akik mellettem álltak és bíztattak a mindennapokban.

Köszönettel tartozom szüleimnek, akik lehetővé tették tanulmányaimat, valamint testvéremnek, férjemnek és kisfiamnak, akik végig mellettem álltak, nélkülük ez a dolgozat nem készülhetett volna el.