

AZ ARC, APOPTÓZIS REPRESSZOR FEHÉRJE IMMUNHISZTOKÉMIAI VIZSGÁLATA COLORECTALIS CARCINOMA MÁJÁTTÉTEKBE ISMERT PROGNOSZTIKAI ÉS PREDIKTÍV MARKEREK TÜKRÉBEN

Doktori értekezés (Ph.D.) tézisei

Dr. Tóth Csaba

Témavezető: Dr. Sükösd Farkas, Ph.D.



Szegedi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar

Pathologiai Intézet

SZTE Interdiszciplináris Doktori Iskola

Szeged

2018

„Az igazi tudós kész arra, hogy elviselje a megpróbáltatásokat, akár még az éhezést is, csak hogy senki ne szabja meg neki, hogy milyen irányba folytassa a munkáját.“

Szent-Györgyi Albert

BEVEZETÉS

A vastagbélrák (CRC) továbbra is vezető szerepet játszik a rákkal összefüggő halálesetek tekintetében. Világszerte évente több mint egymillió új esetet diagnosztizálnak és a betegség körülbelül 40-50% mortalitási rátával rendelkezik [1]. A vastagbélrák (CRC) a harmadik leggyakoribb ráktípus a fejlett országokban, amelynek kumulatív rákkockázata 9,4%-os. Leggyakoribb Észak-Amerikában, Ausztráliában és Európában, míg a legalacsonyabb előfordulást Afrikában és Ázsiában találjuk [2]. Az UICC I. stádiumú esetekben a túlélési arány 90%, míg az UICC III. stádiumában a túlélés 63%-ra csökken [3]. Németországban a vastagbélrák a leggyakoribb daganat, mindkét nemből körülbelül 5%-os kialakulási valószínűséggel (lifetime risk) az élet során. Az országban mintegy 70 000 új esetet diagnosztizálnak, és az öt éves túlélési arány mindössze kb. 40% [4]. Az intenzív kutatási és terápiás erőfeszítések ellenére a CRC halálozási aránya még mindig körülbelül 40-50% [1]. Emellett az áttétes esetek aránya még mindig gyakori [5]. A kolorektális rák korai felismerése kulcsfontosságú a sikeres terápia szempontjából, de a szűrési programok ellenére a colorectalis daganatos megbetegedések több mint kétharmadát előrehaladott stádiumban (UICC III/IV. stádium) diagnosztizálják. Az incidencia 100.000 lakosra vetítve férfiaknál 19,4, a nőknél pedig a 15,3 [6]. Ezenkívül a colorectális rák előfordulása a korrallal összefüggő exponenciális növekedést mutat [7], amely szintén magyarázza a fejlettebb világban a magasabb incidenciát.

A colorectalis rák korai megjelenése (45 évnél fiatalabb betegeknél) nemcsak a szerzett genetikai változásokat feltételezi, hanem az örökletes tényezőket is (pl. HNPCC-szindrómát)[8]. A környezeti és életstílusbeli tényezők, mint például a hús és az alkoholfogyasztás, a dohányzás, az elhízás, növelhetik a colorectalis rák kockázatát [9]. Másrészt az étkezési rostok, a zöldségek, a nem szteroid gyulladásgátlók (NSAID) és a hormonpótló terápia (például az ösztrogén) szintén befolyásolják a daganatkialakulás kockázatát [10]. Érdekes módon azonban a közelmúltbeli vizsgálatok nem igazolják a magas rosttartalmú étrend és a colorectalis rák ellentétes összefüggését [10, 11].

Egyes megbetegedések, mint a gyulladós bélbetegségek (pl. colitis ulcerosa), növelhetik a colorectalis rák kockázatát (akár a 8,2-szeresére). A fekélyes vastagbélgyulladás bona fide premalignus állapotot jelent, ezért minden ilyen beteget szorosabban kell vastagbélrákra követni és szűrni [12].

A gyógyszerrezisztencia számos rosszindulatú daganatos megbetegedés rossz prognózisáért is felelőssé tehető [13]. Így olyan fehérjék azonosítása, amelyek prediktív értékkel bírnak, igen fontosak lehetnek nemcsak az áttétes vastagbélrákban, hanem más ráktípusban is. Ilyen szempontból fontos a DNS javító rendszerek (pl. mismatch repair, NER) deregulációjának megértése, mivel hozzájárul a ráksejtek hagyományos kemoterápiával szembeni rezisztenciájához.

Az elsődleges CRC-ben szenvedő betegek egynegyede a diagnózis felállításakor szinkron májmetasztázissal rendelkezik, illetve a betegek több mint 50%-ában a betegség lefolyása

során májmetasztázisok alakulnak ki. A primeren megoperált vastagbélrákos betegek majdnem felében végül metachronos májmetasztázis alakul ki. A metasztatikus esetek túlélése ritkán haladja meg a három évet [14].

Érdekes módon, bár a CDX2-t széles körben használják a napi rutin diagnosztikában, az utóbbi hatvan évben kevesebb, mint hatvan publikáció jelent meg, mely a CDX2 fehérjét vizsgálta humán szövetmintákon [15]. Az MGMT expresszió csökkenése gyakoribb a mikroszatellita-instabil (MSI) CRC-ben, ami azt sugallja, hogy a metilezett MGMT kiválasztja az MMR-deficiens státuszú sejtes klónokat [16]. Továbbá, a sérült DNS javítási rendszerek (defected mismatch repair) összefüggésben vannak a CDX2 elvesztésével [17]. Kevés olyan tanulmány jelent meg, amely a CDX2 és a Wnt jelátviteli út közötti kölcsönhatásokkal foglalkozott a vastagbélrákos esetekben. Sikertült azonban kimutatni, hogy a CDX2 nem transzkripció módon gátolhatja a beta-catenin / TCF vonalak transzkripció aktivitását [18].

Az apoptózist, azaz a programozott sejthalált különböző ingerek válthatják ki (pl. DNS-károsodás, kemoterápiás gyógyszerek, oxidatív stressz stb.). Az apoptózis pontos szerepe a CRC metasztázisokban és a kemoterápiás rezisztenciában nem teljesen ismert. Ezen mechanizmusok megismerése különös jelentőséggel bír, mivel a legtöbb kemoterápiás szer azáltal fejt ki a hatását, hogy apoptózist indukál a daganatos sejtekben. Az egyik vonzó potenciális terápiás cél lehet az ARC (apoptózis represszor CARD-doménnel) fehérje. Az ARC fehérje nagyfokú expressziója a rákos sejtekben vagy premalignus elváltozásokban elősegítheti a sejtek túlélését és megvédi a ráksejteket a sejthaláltól, ezáltal elősegítve a túlélésüket és végső soron hozzájárva a gyógyszerrezisztenciához [19]. A citoplazmatikus és nukleáris ARC expresszió szabályozó mechanizmusai még ismeretlenek. A normál szövetekben és ráksejteketben fellépő különböző ARC-expresszióval kapcsolatban az az álláspont terjedt el, hogy a megnövekedett citoplazmatikus ARC-expresszió nemcsak a nukleáris ARC redistribúciójának eredménye, hanem fokozza a sejtekben az ARC termelését is [19].

A DISSZERTÁCIÓ CÉLKITÜZÉSEI

1. Először szeretnénk megvizsgálni az ARC fehérje expresszióját a colorectalis rákok májmetasztázisaiban. Továbbá szeretnénk megvizsgálni az MMR fehérjék és az apoptózis represszor fehérje (ARC) expressziója közötti összefüggéseket. Szeretnénk bizonyítani a p53 fehérje és az ARC közötti ismert kapcsolatot fehérje expressziós szinten.

2. A vizsgálat második fázisában további DNS javító fehérjék (MGMT, ERCC1, RRM1) expresszióját és lehetséges kölcsönhatásait szeretnénk fehérje expressziós szinten vizsgálni. Ismeretes, hogy az ERCC1, az RRM1 és a TUBB3 (túlzott) expressziója összefüggésben áll a terápiás rezisztenciával, amelyeknek igen nagy jelentősége van az előrehaladott, metasztatizált (IV. stádiumú) kolorektális rákokban [20]. Tehát a második fázisban szeretnénk megvizsgálni az MGMT, ERCC1, RRM1 és TUBB3 fehérjék expresszióját és azok korrelációját az ARC fehérje expressziójával, amelyről tudjuk, hogy a kolorektális rákban gyakran túlzott mértékben expresszálódik, és amely végső soron így terápiás rezisztenciához vezet, gátolva mind az extrinsic, mind az intrinsic apoptotikus jelátviteli utakat.

3. A CDX2 expresszióját a DNS-javító fehérjék és a Wnt jelátviteli útvonal fehérjéivel összefüggésben korábban nem vizsgálták a colorectalis rák májmetasztázisaiban. A harmadik tanulmányban elemeztük a CDX2 expressziós eloszlását DNS javító fehérjék (MMR fehérjék, MGMT és ERCC1), APC és beta-catenin függvényében. Továbbá a CDX2 fehérje expresszióját a klinikai adatokkal korreláltuk.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

1. SZÖVETMINTÁK ÉS A VIZSGÁLT SOKASÁG

A paraffinba ágyazott májmetasztázis-rezekátumokat a Heidelbergi Egyetemi Klinika Patológiai Intézetének archívumából választottuk ki. Százegy beteg (64 férfi, 37 nő, átlagéletkor 62 év) Egyik beteg sem kapott neo-adjuváns kemoterápiát. További adatokat, például: kor, nem, a metastázisok száma és mérete, a szövettani leletekből gyűjtöttük össze. A szövetszövetmintákat a heidelbergi szövetszövetbank (BMBH Heidelberg, NCT Tissue Bank) szabályzatával összhangban és a Heidelbergi Egyetem etikai bizottságának jóváhagyásával dolgoztuk fel.

2. SZÖVETI MULTIBLOKKOK (TISSUE MICROARRAY) ELŐÁLLÍTÁSA

A paraffinba ágyazott humán májmintákból szövetszöveti multiblokkokat (TMA) állítottunk elő szövetszöveti mikroarrayerrel (Beecher Instruments, Sun Prairie, Wisconsin, USA). Minden esetről két, 1,6 mm átmérőjű daganatszövetet tartalmazó hengert ágyaztunk be a multiblokkokba, és a TMA blokkok orientációjához két izomhengert használtunk. Az izomhengerek ARC immunfestésekhez pozitív kontrollként is szolgáltak.

3. IMMUNHISZTOKÉMIAI VIZSGÁLATOK

TMA blokkokból 4 µm vastag metszeteket készítettünk. A metszeteket ezután a rutin labor standard protokollja szerint xilolban és 95-96% és 70% etanolban dehidratáltuk és deparaffinizáltuk. A metszeteket ezután egyidejűleg megfestettük egy számítógépes vezérlésű automatában (Dako TechMate 500 cytomation és Dako EnVision-Sytem (Dako). A metszeteket 3% -os hidrogén-peroxiddal előkezeltük az antitest inkubáció előtt. Az immunreakciók kimutatásához Ultraview Univerzális DAB detekciós kitet (Ventana Medical Systems Inc.) és 3,3'-diaminobenzidint használtunk. A metszeteket végül hematoxilinnel és a kékreagenssel ellenfestettük, és az összes metszetet lefedtük. Az immunfestett szövetszövet mikroarray metszeteket két patológus értékelte ki, majd az eredményeket ezután egyeztetettük. A különböző festési eredmények megtárgyalása után konszenzus alapján döntöttünk a végső festési eredményről.

4. STATISZTIKAI ELEMZÉS

A statisztikai elemzéseket SPSS szoftverrel (SPSS Institute, Cary, NC, USA) végeztük. Spearman-Rho és Pearson korrelációs tesztek használtunk a klinikai adatok, az ARC, az MLH1, az MSH2, az MSH6, a PMS2 és a p53 közötti kapcsolat értékelésére. A klinikai adatok, az ARC, az MMR fehérjék, az MGMT, az ERCC1, a TUBB3 és az RRM1 közötti kapcsolatokat Pearson korrelációs és lineáris regressziós teszttel becsültük meg. A statisztikai szignifikancia $p < 0,05$ és $p < 0,01$ volt.

EREDMÉNYEK

1. MMR fehérjék és a p53 expressziója

Az MSI fehérjék festése az esetek 4,2-26% -ában mutatott expresszióvesztést (MLH1 4,2%, MSH2 26%, MSH6 24% és PMS2 9,5%). A p53 fehérje 102 esetben mutatott valid immunhisztokémiai eredményt, amelyből az esetek 23%-ában (n = 23/102) az eredmény negatív volt (score 0). A pozitív eseteket két csoportra osztottuk: mérsékelt pozitívítás vagy az úgynevezett restriktós túlexpresszió (score 1) (46%, n = 47/102); és erős pozitívítást vagy ún. erős túlexpressziót mutató esetekre (score 2) (31%, n = 32/102). Ha csak az erős túlexpressziót (score 2) tekintettük pozitívnak, a p53-pozitívítás 31% -ában (n = 32/102), míg az esetek 69%-a (n = 70/102) negatív volt. Az összes pozitív esetet tekintve (score 1 és score 2) 77%-os (n = 79/102) nukleáris pozitívítást detektáltunk, és 23% (n = 23/102) volt a negatív esetek aránya.

2. ARC fehérje immunhisztokémiai expressziója

Az ARC citoplazmatikus festődés eredményei az intenzitás szempontjából három csoportra oszthatók: score 0 - negatív festődés vagy gyengébb festődés mint a normális colorectális nyálkahártya, score 1 - a normál nyálkahártyával megegyező festési intenzitás, score 2 - a mérsékelten erősebb festődés mint a normál nyálkahártyában, score 3 - nagyfokú, diffúz citoplazmatikus festődés (1. táblázat). Emellett az ARC sejtmagi festődést egy háromfokozatú skálán értékeltük. Score 0 - nem detektálható magi festődés, a score 1 és a score 2 pedig mérsékelt és erős sejtmagi festődési reakciót jelent (2. táblázat).

Score	Valid esetek (n)	Valid esetek %-os megoszlása
0	14	14
1	25	25
2	21	21
3	40	40
Σ	100	100

1. táblázat Valid citoplazmatikus ARC immunhisztokémiai reakciók megoszlása.

Score	Valid esetek (n)	Valid esetek %-os megoszlása
0	2	2
1	38	38
2	60	60
Σ	100	100

2. táblázat Valid immunhisztokémiai reakciók megoszlása sejtmagi ARC festődés esetében.

2.1. ARC fehérje expressziója a hisztopatológiai paraméterek vonatkozásában

Sem a citoplazmatikus, sem a nukleáris ARC-expresszió nem mutatott statisztikailag szignifikáns összefüggést a klinikai paraméterekkel (kor, betegek neme, a tumor grádusa, a metasztázisok száma és nagysága).

2.2. Az ARC és a p53 fehérje expressziója közötti összefüggés

A citoplazmatikus és sejtmagi ARC expressziós szintek függetlenek a p53 festési státusztól. Továbbá, a p53 expressziós státusz és a nukleáris vagy citoplazmatikus ARC expressziós szintje ($p = 0,465$ és $p = 0,491$) között nem mutatkozott korreláció, még akkor sem, ha csak az erős p53 festődést (score 2) vettük pathológiásnak ($p = 0,256$ a nukleáris és $p = 0,388$ a citoplazmatikus ARC expresszió esetén).

2.3. ARC protein expresszió és MMR fehérjék expressziója közötti összefüggések

Meglepő módon a citoplazmatikus ARC expresszió erős pozitív korrelációt mutatott az MSH2 fehérje expressziós mintázatával ($p=0,003$), az ARC-expresszió és az MSH6 fehérje közötti erős pozitív korreláció mellett ($p=0,006$). Emellett az MSH2 expressziós státusz statisztikailag szignifikáns pozitív összefüggést mutatott a nukleáris ARC expresszióval ($p=0,063$). Az MLH1 és PMS2 fehérjék esetében nem volt szignifikáns korreláció ARC expresszióval.

3. Az ERCC1, RRM1 ÉS A TUBB3 expressziós mintázata a vizsgált a kollektívában

Az ERCC1 fehérje esetében az esetek 29,8%-át találtuk negatívnak (score 0). Pozitív ERCC1 festés a vizsgált esetek 70,2%-ában (30,8% -os score 1 és 39,4% -os score 2) volt megfigyelhető. Az RRM1 esetében a festődési arány különbözött: 95 érvényes eset közül 11 esetet (11,6%) találtunk negatívnak (score 0). 84 eset (88,4%) mutatott pozitív RRM1 festődést, amelyből 51 esetben a festődés mértékét nagy intenzitásúnak találtuk (score 2 - 53,7%). A TUBB3 immunhisztokémiai festés érdekes eloszlást mutatott: a legtöbb esetben az inváziós szélén (52%) volt kifejezett a pozitivitás. 35 esetben (35%) negatív volt a festési eredmény, és csak 13%-ban volt diffúz pozitív festési reakció megfigyelhető.

4. CDX2 expressziója és összefüggése a klinikai adatokkal

CDX2 esetében 83 esetben volt az immunhisztokémiai festés kiértékelhető. 32 esetben (38,55%) nem találtunk sejtmagi festődést (3. táblázat). A pozitív sejtmagi festődést mutató esetek (61,45%, $n=51/83$) két csoportra oszthatók: mérsékelt nukleáris expressziót mutató (score 1; 16,87% $n = 14$); és az erős sejtmagi pozitivitással rendelkező esetekre (score 2; 44,58%, $n=37$). A klinikai paraméterekkel kapcsolatban, mint pl. a kor, a betegek neme, a tumor grádusa és a metasztázisok száma, nem volt szignifikáns korreláció a CDX2 expresszióval. A metasztázis méretét illetően azonban erős negatív korreláció volt megfigyelhető ($p=0,038$) (4. táblázat). A CDX2 mellett az ERCC1 expresszió is erősen korrelált a metasztázisok méretével ($p=0,027$), azaz minél nagyobb volt a májjátték átmérője, annál gyakrabban volt megfigyelhető a CDX2 és ERCC1 gyengébb vagy negatív festődése.

	Score 0	Score 1	Score 2	Nr. of valid cases
CDX2	32 (38,55%)	14 (16,87%)	37 (44,58%)	83 (100%)
sejtmagi APC	62 (61,38%)	39 (38,62%)	----	101 (100%)
citoplazmatikus APC	13 (12,87%)	75 (74,26%)	13 (12,87%)	101 (100%)
citoplazmatikus β-catenin	37 (38,14%)	60 (61,86%)	----	97 (100%)
sejtmagi β-catenin	60 (61,86%)	21 (21,65%)	16 (16,49%)	97 (100%)

3. táblázat A CDX2, az APC és a béta-catenin immunfestések eredményeinek eloszlása.

5. A DNS repair proteinek és a Wnt jelátviteli út vizsgált fehérjeinek immunhisztokémiai vizsgálata

Az MGMT immunhisztokémia esetében 97 érvényes esetet kaptunk. Az MGMT expresszió elvesztése 24 esetben (24,75%) volt megfigyelhető. MGMT sejtmagi festődés 73 esetben (75,25%) volt megtartott. A 94 valid ERCC1 eset közül az esetek 29,8%-ában volt expresszióvesztés megfigyelhető (score 0). Pozitív ERCC1 festést a vizsgált esetek 70,2% -ában találtunk (30,8% score 1 és 39,4% score 2). Mind az MGMT, mind az ERCC1 expresszióvesztés statisztikailag szignifikáns összefüggést mutatott a női nemmel ($p=0,011$ és $p=0,047$). Az MMR fehérjék esetében a következő eloszlás volt figyelhető meg: az expresszióvesztés az esetek 4,2-26% -ában volt detektálható (MLH1 4,2%, MSH2 26%, MSH6 24%, PMS2 9,5%) [21]. A PMS2 expresszióvesztése statisztikailag szignifikáns összefüggést mutatott az MGMT fehérje expresszióvesztésével ($p = 0,014$). Ezen felül az MLH1 és az MSH2 expresszióvesztése szintén összefüggést mutatott az ERCC1 fehérje expresszióvesztésével (mindkét esetben $p < 0,01$). A béta-catenin és APC fehérjék expressziós eloszlását a 3. táblázatban mutatjuk be.

6. Statisztikai összefüggések a CDX2 és a DNS repair proteinek között

Statisztikailag erős pozitív korrelációt találtunk a CDX2 és a vizsgált DNS-javító fehérjék között. Ezek eredményeit a 4. táblázat mutatja be. Összefoglalva elmondható tehát, hogy a CDX2 expresszió elvesztése erősen asszociált a DNS-javító fehérjék expressziójának elvesztésével (MMR fehérjék, MGMT és ERCC1).

		májáttét átmérője (mm)	DNS repair fehérjék					
			MLH1	MSH2	MSH6	PMS2	MGMT	ERCC1
CDX2	korrelációs együttható	-0.247*	0.388**	0.334**	0.317**	0.228*	0.236*	0.574**
	szignifikancia	0.038	<0.001	0.002	0.004	0.040	0.039	<0.001
	érvényes esetek száma	71	77	82	82	82	77	74

** A korreláció $p=0,01$ szinten szignifikáns.

* A korreláció $p=0,05$ szinten szignifikáns.

4. táblázat A CDX2, a tumorméret és a DNS-javító fehérjék közötti statisztikai analízis eredményei.

7. Statisztikai összefüggések a CDX2, APC és a béta-catenin között

Elemeztük a lehetséges statisztikai összefüggéseket a CDX2, a béta-catenin, valamint az APC fehérje között. Ezen elemzés eredményeit az 5. táblázat mutatja be. A citoplazmatikus, de nem a sejtmagi, béta-catenin expresszió statisztikailag szignifikáns összefüggést mutatott a megtartott nukleáris CDX2 expresszióval ($p=0,042$). Ezenkívül a CDX2 fehérje festődési intenzitása pozitív korrelációt mutatott az APC fehérje nukleáris expressziójával ($p<0,01$). Továbbá a citoplazmatikus és a nukleáris béta-catenin expresszió is pozitív kapcsolatban állt egymással ($p<0,01$).

		sejtmembránhoz kötött /citoplazmatikus β -catenin	sejtmagi β - catenin	citoplazmatikus APC	sejtmagi APC
CDX2	korrelációs együttható	0.231*	0.152	0.065	0.415**
	szignifikancia	0.042	0.183	0.567	<0.001
	érvényes esetek száma	78	78	79	79

** A korreláció $p=0,01$ szinten szignifikáns.

* A korreláció $p=0,05$ szinten szignifikáns.

5. táblázat A CDX2, az APC és a b-catenin közötti statisztikai elemzés eredményei.

MEGBESZÉLÉS

Az apoptotikus jelátviteli útban bekövetkező zavarok a terápiás rezisztencia kialakulásának legfontosabb okai közé tartoznak. A már ismert szabályozó fehérjék mellett az utóbbi években sok más olyan fehérjét is azonosítottak, amelyek befolyásolhatják az apoptotikus folyamatot, és némelyikük a kemoterápia hatásait fokozhatja vagy gátolhatja. Az apoptotikus jelátvitelben bekövetkező szabályozási zavar gyakori esemény a colorectalis rákokban és azok májmetasztázisaiban. Mindezekből következően az apoptózisban szerepet játszó fehérjék fontos terápiás célpontok (pl. Bcl-2-inhibitorok)[22]. Az ismert klasszikus apoptotikus szabályozó fehérjék mellett sok olyan is létezik, amely befolyásolja az apoptózis hatékonyságát. Ide tartoznak például a mismatch repair (MMR) fehérjék és a p53 is. Az MMR fehérjék expresszió- és funkcióvesztése a sérült apoptotikus jelátvitellel és terápiás rezisztenciával is kapcsolatban áll [23]. Ismeretes, hogy a rákos sejtek gátolni tudják az apoptotikus kaszkád aktiválódását, csökkentve a pro-apoptotikus fehérjék, és növelve az apoptózis-inhibitorok szintjét. Számos kaszpáz fehérje szintje csökkent a tüdő-, emlő- vagy vastagbélrákban, míg például a survivin vagy a Bcl-2 és a Bcl-XL fehérjék szintje vastagbélrákban emelkedett – mindezek rosszabb prognózissal állnak kapcsolatban [24, 25].

1. ARC, p53 és MMR fehérjék expressziója vastagbélrák májajátékban

Az apoptózis szerepe a CRC májmetasztázisokban és a gyógyszerrezisztenciában még mindig nem teljesen tisztázott. Az egyik potenciális terápiás cél lehet az ARC, apoptózis represszor fehérje. Az ARC fehérje az ún. stabil szövetekben, azaz neuronokban, vázizomban és szívmizomrostokban expresszálódik fiziológiás körülmények között [26], valamint különböző eredetű karcinómákban, például petefészekrákban, vastagbélrákban vagy méhnyakrákban [27]. Ismert, hogy az ARC-t a Ras-protein indukálja és a p53 fehérje csökkenti a szintjét [28]. Az ARC fehérje részt vesz az extrinsic és intrinsic apoptotikus utak inaktiválásában, és pro-apoptotikus fehérjékkel, például p53, Bcl2, Bax, Bad, Puma, MSH2, MSH6 stb. áll kölcsönhatásban [29]. Emlőrák sejtvonalakban magas citoplazmatikus ARC-szinteket mutattak ki, melyek összefüggésbe hozhatóak a terápiás rezisztenciával (doxorubicin és gamma-sugárzás által indukált sejthalál) [19]. Az ARC fehérje nagyfokú expressziója tehát a rákos sejtekben elősegítheti a sejtek túlélését azáltal, hogy védi a rákos sejteket az apoptózistól, és ilyen módon fontos szerepet játszhat a terápiás rezisztencia kialakulásában [19].

Az első vizsgálatban az ARC expressziós szintje a vastagbélrák májmetasztázisaiban a klinikai adatoktól (életkor, nem, tumorméret, tumorszám vagy mucin termelés) független volt, de erősen korrelált az MSH2 és az MSH6 fehérje expressziójával, ami további bizonyítékot jelent az MSH2 és az MSH6 szabályozó apoptotikus kaszkádokban betöltött szerepére[21].

Vizsgálatunkban leírtuk az ARC expressziós mintázatát colorectalis rák májmetasztázisaiban, és annak korrelációját az apoptotikus jelátviteli folyamat más ismert tagjaival. Ez volt az első olyan vizsgálat, amely elemezte az ARC fehérje szubcelluláris lokalizációját a colorectalis rákok májmetasztázisaiban. Emellett volt szignifikáns

összefüggést tudunk kimutatni az ARC és az apoptotikus szignálutak közvetett szabályozói között (pl. MSH2, MSH6).

Az ARC fehérje egyes nukleáris funkcióit már fleírták, de a nukleáris ARC fehérje pontos szerepe a vastagbélrákban és sok más ráktípusban még mindig nem tisztázott [30]. Mi a vizsgálatainkban azt találtuk, hogy a nukleáris ARC expresszió szignifikánsan kapcsolódik az MSH2 és az MSH6 fehérje expressziójához, míg az MLH1 és PMS2 fehérjékkel nem mutatott összefüggést a sejtmagi ARC pozitivitás. Ennek az lehet az egyik magyarázata, hogy a sérült MSH2 vagy MSH6 fehérje elveszíti pro-apoptotikus képességét, ezért lényegesen alacsonyabb szintű nukleáris ARC szükséges az apoptózis gátlásához. Ez az eredmény azonban nem magyarázza önmagában a ARC fehérje sejtmagi expresszióját. A sejtmagi ARC funkciója immunhisztokémiai módszerekkel nem tárható fel. További funkcionális vizsgálatokra van szükség a MMR rendszer és az ARC szabályozás közötti kapcsolat feltárásához. Ez azért fontos, mert az ARC potenciális terápiás cél lehet, és maga az MMR-rendszer (és más DNS javító rendszerek is) együttesen hozzájárulnak a kemo- és radiorezisztenciához.

2. ERCC1, RRM1 és TUBB3 fehérjék expressziója vastagbélrák májajttétekben

Az ERCC1, az RRM1 és a TUBB3 fehérjék bizonyítottan terápiás prediktív értékkel rendelkeznek a nem kissejtes tüdőrák jelenlegi terápiájában [13, 31, 32]. A munkacsoportunk az ERCC1, RRM1 és TUBB3 fehérjék expressziós szintjét vizsgálta a colorectalis rák májmetasztázisaiban, és az expressziós eredményeket összevetettük a nemmel, korrall, tumor grádussal, mucin termeléssel, tumormérettel és a metasztázisok számával. Vizsgálatunk elsődleges célja az ERCC1, RRM1 és TUBB3 fehérjék expressziós mintázatának elemzése volt. Vizsgáltuk továbbá az MMR fehérjékkel, p53-val és az ARC fehérjével való összefüggésüket. Májajttétes colorectalis rákos betegeknel a citotoxikus kemoterápia többségét prediktív biomarker analízis nélkül folytatják le. A kolorektális rákokban azonban rendkívül nagy molekuláris sokféleséggel bírnak, ezért fontos lenne a molekuláris tumor alcsoportok azonosítása, mely molekuláris csoport, mely specifikus kemoterápiás szerre lehet a legérzékenyebb. Így a kemoterápia hatékonyabb lehetne és a lehető legnagyobb terápiás válasz lenne elérhető.

Az általunk vizsgált májajttétekben a TUBB3 fehérje leggyakoribb festődési mintázata az invázió frontján található expresszió, hasonlóan a primer colorectalis rákhoz [33]. A valid esetek 35%-ában nem volt kimutatható TUBB3 expresszió - ezek az esetek potenciálisan alkalmasak taxán-alapú kemoterápiára (a TUBB3 fehérjét mint, prediktív markert tekintve). Az általunk vizsgált kollektívában statisztikailag szignifikáns összefüggést találtunk az MLH1, az MSH2 és a TUBB3 fehérjék expressziója között ($p = 0,019$ és $p = 0,012$), ami tovább erősíti a feltételezést a mismatch repair proteinek apoptózisban betöltött szerepére vonatkozóan. Megtartott MLH1 és MSH2 expresszió esetén a TUBB3 fehérje expressziója (festődési intenzitása, összeségében tehát a fehérje mennyisége) szignifikánsan nagyobb, ami azt feltételezi hogy nagyobb mennyiségű TUBB3 szükséges az MLH1 és MSH2 pro-apoptotikus aktivitásának visszaszorításáért. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a sérült MMR rendszer TUBB3 expressziót indukál, ami mikrotubulus (MT) átrendeződéshez vezet, ami végső soron befolyásolhatja az apoptózist (pl. pro-apoptotikus jelátvitelt indukáló fehérjék aktiválásával). A mikrotubulusok fontos szerepet

töltenek be az apoptózisban: a tumoros sejtek túlélése a mikrotubulusok polimerizációjának státuszától függ, és a polimerizáció szabályozásán keresztül jön létre egy apoptózis-kontroll. Így a normál MT-funkcióban bekövetkező zavarok vagy változások (akár MT hossznövekedés, akár csökkenés) kiválthatnak apoptózist. A MT rendszer (és így a TUBB3 fehérje is) fontos szerepet játszik a DNS-károsodás által kiváltott apoptózis szabályozásában.

Az ERCC1 és a TUBB3 immunhisztokémiai vizsgálata fontos szerepet játszhat a személyre szabott kemoterápia megtervezésében és biztosabb prediktív információt szolgáltat a kvantitatív real-time PCR-hez képest [32, 34]. A TUBB3 és az ERCC1 együttesen befolyásolja a taxánra és a paclitaxel kombinációra adott terápiás választ, azonban ezen mechanizmus molekuláris háttere még nem teljesen ismert [35].

3. A CDX2 és a MMR fehérjék expressziójának összefüggése a Wnt jelátviteli út fehérjéivel

A CDX2 expresszió bizonyos fokú elvesztése a humán CRC körülbelül 30%-ánál jelentkezik, és általában magasabb tumorgrádussal társul [36]. CDX2 A mi általunk vizsgált kollektívában az esetek 38,55%-ában találtunk CDX2 expresszióvesztést. A expresszió elvesztése negatívan korrelált a tumormérettel, de nem volt korreláció az életkorral, a betegek nemével, a tumor grádusával és a metasztázisok számával. Érdekes módon azonban az ERCC1 fehérje expressziója összefüggésben volt a tumormérettel. Ezenkívül a CDX2 expresszióvesztése erősen korrelál az ERCC1 fehérje expresszióvesztésével. Így azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a CDX2 vagy ERCC1 expresszió elvesztése erősen összefügg a nagyobb metasztatikus daganatmérettel. Hasonló eredményeket figyeltek az ERCC1 fehérje esetében a közelmúltban emlőrákos esetekben [37], de a pontos mechanizmusok még mindig nem tisztázottak.

Statisztikailag szignifikáns korrelációt figyeltünk meg a CDX2 és a DNS-javító fehérjék között is: a CDX2-expresszió elvesztése a mismatch repair proteinek, az MGMT és az ERCC1 elvesztésével jár együtt. Ezek az eredmények egybeesnek az elsődleges vastagbélrákból származó irodalmi adatokkal: a sérült MMR-el rendelkező vastagbélrákok vagy az MSI-H colorectalis rákok jelentős CDX2 expresszióvesztést mutatnak. Ezenkívül a CDX2 expresszióvesztése asszociációt mutat a CIMP-high rákokkal, agresszívebb hisztomorfológiai faktorokkal és kedvezőtlen túléléssel [38]. Egy, a primer colorectalis rákról és annak nyirokcsomó-metasztázisáról szóló tanulmányban a CDX2 csökkent expressziója a colorectalis rák MMR-sérülésére (MSI) utal. Ráadásul a CDX2 elvesztése rossz prognosztikai tényező, még az intakt MMR rendszerrel rendelkező (MSS) rákos betegek körében is [39].

Kevés ismeretes a CDX2 és a Wnt jelátviteli útvonal közötti kapcsolatról. Egy Caco-2 sejteken végzett vizsgálatban az alacsonyabb CDX2 expresszió az APC fehérjeexpresszió endogén lefelé történő regulációjával társult, de nem befolyásolta a GSK3 β 2 expresszióját [18]. A mi vizsgálatunk a colorectális rákok májáttétjein hasonló eredményekhez vezetett: a CDX2 csökkent expressziója vagy elvesztése csökkent nukleáris APC expresszióhoz társult és az a kapcsolat statisztikailag szignifikáns volt ($p < 0,01$). Vizsgálatunkban a citoplazmatikus APC expressziója azonban nem társult a CDX2 expressziójával. Feltételezzük, hogy bár a CDX2 indukálja az APC expresszióját, ami már bizonyított [18],

a trunkált APC fehérje nem transzportálódik citoplazmába, de trunkált APC fehérje kimutatható a sejtmagban az általunk használt ellenanyaggal.

A trunkált APC tehát kimutatható immunhisztokémiai reakcióval, és természetesen nem veszítette el teljes funkcióját, és még mindig részt vehet a β -catenin szabályozásban. Így a trunkált APC még képes bizonyos funkciók ellátására (attól függően, hogy a fehérje mely részei és milyen mértékben sérültek)[40]. Továbbá statisztikailag szignifikáns összefüggést találtunk a CDX2 és a citoplazmatikus béta-catenin között. Úgy véljük, hogy ez a korreláció a Mucdhl fehérjén keresztül valósul meg, amely a β -catenin és a CDX2 közös interakciós partnere. Kimutatták, hogy a béta-catenin kölcsönhatásba lép egy proto-cadherin Mucdhl-vel, amelyet egérben CDX2 szabályoz. A membránhoz kötött beta-catenin expressziója a membránon expresszált Mucdhl-al kapcsolatos kölcsönhatás következménye. Így a Mucdhl képes gátolni a beta-catenin transzlokációt a sejtmagba [18].

Következtetések

Összefoglalva kimutatható, hogy a colorectalis rákos májmetasztázisaiban az ARC fehérje expressziós szintje független a klinikai adatoktól (úgy mint életkor, nem, a daganat mérete, a tumorszám vagy a mucintermelés), de erősen asszociált az MSH2 és MSH6 expressziójával. Ez tovább támogathatja az MSH2 és az MSH6 fehérjék feltételezett szabályozó szerepét az apoptózisban: megtartott MSH2 és MSH6 expresszió esetén szignifikáns magasabb ARC szint szükséges az apoptózis elnyomására (ami szignifikánsabb nagyobb mértékű fehérjeexpresszióval igazolható). Bár az ARC és a p53 közötti szabályozó mechanizmus ismeretes, nem találtunk összefüggést a p53 expressziós szintek és az ARC szintek között, ami azt jelentheti, hogy a p53 immunhisztokémia nem alkalmas a p53 fehérje pro-apoptotikus aktivitásának vizsgálatára.

További tanulmányokra van szükség ahhoz, hogy kimutassuk az ARC fehérje pontos szerepét az apoptotikus jelátvitelben, és így annak szerepét a kemoterápiás rezisztenciában és a tumorsejtek túlélésében. Az MMR fehérjék, az ERCC1, az RRM1 és a TUBB3 között statisztikailag szignifikáns korrelációt állapítottunk meg. Továbbá statisztikailag szignifikáns korrelációt találtunk az ARC fehérje, az RRM1 és a TUBB3 között. Ezen fehérjék együttesen a colorectalis rákok metasztázisaiban nagy terápiás rezisztenciapotenciállal rendelkeznek. Ezért azt javasoljuk, hogy teszteljük ezen prediktív fehérjéket mielőtt bármilyen terápiás opciót felkínálunk. További funkcionális vizsgálatoknak meg kell adniuk a pontos szabályozási mechanizmust az RRM1, a TUBB3 és az ARC között, mivel ezeknek a fehérjéknek a pontos kapcsolatát nem lehet csak immunhisztokémiai módszerekkel analizálni. A fent említett markerek értékelése hasznos eszköz lehet a kolorektális rákok kemoterápiás protokolljainak meghatározásához és azoknak a betegeknek a kiválasztásához, akik nagyobb valószínűséggel fognak pozitív terápiás választ adni és jobb túléléssel számolhatnak. A jövőbeli kemoterápiás protokollok kiválasztásakor, a döntési folyamat része kell, hogy legyen az olyan markerek meghatározása mint ERCC1, RRM1 vagy TUBB3. További vizsgálatok kellenek annak eldöntésére, hogy az ARC fehérje alkalmas-e a terápiás válasz előrejelzésére és/vagy az ARC expresszió milyen prognózist vagy terápiás választ képes előrejelezni.

Elsőként írtuk le vastagbélrák májjáttétekben, hogy a CDX2 gén expressziója erősen kötődik a DNS-javító fehérjék expressziójához és a hogy a CDX2 expresszió mértéke statisztikailag szignifikáns mértékű kapcsolatban van Wnt jelátviteli út kulcsfontosságú tagjaival. Eredményeink tovább erősítik a CDX2 szerepét a DNS-javító mechanizmusokban, valamint az APC és a béta-catenin expresszió szabályozásában. Tény, hogy elemzésünk csak metasztázisokra korlátozódik, de eredményeink utalnak a vizsgált fehérjék közötti potenciális (funkcionális) kölcsönhatásokra. Tudomásunk szerint ez az első olyan vizsgálat, amely a CDX2-t ebben a kontextusban vizsgálja a humán colorectalis rák májmetasztázisaiban.

ÖSSZEFOGLALÁS

A májmetasztázis a colorectalis rákban még mindig gyakori, és az elsődleges kezelés a kemoterápia. Eddig a klinikai gyakorlatban nem létezik rutinszerűen alkalmazott teszt a hagyományos kemoterápia hatékonyságának előrejelzésére. Ezért a prediktív értékű biomarkerek bevezetése a hagyományos kemoterápia tervezésénél is jelentős előrelépést jelentene az olyan betegek beazonosításában, akik nagyobb valószínűséggel mutatnának pozitív terápiás választ.

Az apoptotikus jelátvitel a kemoterápiás hatékonyság mérésének egyik kulcsfontosságú tényezője. Apoptotikus jelátviteli rendszerben különböző útvonalak és fehérjék vannak jelen (pl. DNS-javító fehérjék, p53 stb.). Az egyik szabályozó fehérje az ARC, amely gátolhatja nemcsak az extrinsic, hanem az intrinsic apoptotikus jelátvitelt is. Ebben a vizsgálatban az ARC expressziós szintjét elemztük vastagbélrák májmetasztázisaiban, és az ARC expressziós mintázatot összehasonlítottuk DNS-javító proteinekkel és a p53 expressziójával. Ezenkívül megvizsgáltuk az ARC expressziós szintjét a nem, életkor, tumorgrádus, mucintermelés, tumorméret és a májmetasztázisok számától függően. Az ARC expressziós szintje a colorectalis rák májmetasztázisaiban független volt a klinikai adatoktól, de erősen korrelált az MSH2 és az MSH6 expressziójával, ami további támogatást nyújtott az MSH2 és MSH6 apoptózisban betöltött szerepére vonatkozóan: azaz megtartott MSH2 és MSH6 expresszió esetén az apoptózis elnyomására szignifikánsan magasabb ARC szint szükséges. Az ARC és a p53 közötti szabályozási kölcsönhatás ismert, de mi nem találtunk összefüggést a p53 expressziós szintek és az ARC fehérje expressziója között.

A második fázisban három fehérjét (ERCC1, RRM1 és TUBB3) vizsgáltunk kolorektális rák májmetasztázisaiban. Erre szöveti microarray metszeteket használtunk. Statisztikai analízisben összehasonlítottuk az ERCC1, RRM1 és TUBB3 expresszióját a mismatch repair proteinek (MLH1, MSH2, MSH6 és PMS2), a p53 és az apoptózis represszor fehérje (ARC) expressziójával.

Az ERCC1, TUBB3 és MLH1, MSH2 és RRM1 és MSH2, MSH6 között statisztikailag szignifikáns korrelációt találtunk. Érdeemes megemlíteni, hogy analízisünk szignifikáns összefüggést mutat a citoplazmatikus ARC expresszió és az RRM1, a TUBB3 között, ami a TUBB3 és az RRM1 szerepét nemcsak a terápiás rezisztenciában, hanem az apoptotikus jelátviteli utakban is feltételezi. Adataink megerősítik az ERCC1, a TUBB3 és az RRM1 fontosságát a kemoterápia hatékonyságának előrejelzésében, és új, még ismeretlen

funkcionális kapcsolatokra utalhatnak a DNS-javító mechanizmusokban, mikrotubulus rendszer szabályozásában és apoptotikus jelátvitelben.

A CDX2 a colorectalis rák diagnosztikai markerjeként jól ismert, de kevésbé ismert a CDX2 expresszió szabályozása és (funkcionális) kapcsolata a DNS-javító fehérjékkel, valamint a Wnt szignálút fehérjével (pl. APC és a b-catenin). Vizsgálataink harmadik fázisában elemeztük a CDX2 protein expresszióját a DNS-javító fehérjék expressziójától (mismatch repair proteins, MGMT és ERCC1) és a Wnt jelátviteli út meghatározó fehérjék expressziója függvényében. A CDX2 expresszióvesztés a vastagbélrákos májmetasztázisos esetek 38,5%-ánál volt kimutatható. Statisztikailag szignifikáns összefüggést találtunk a CDX2 és a vizsgált mismatch-javító fehérjék között: MLH1, MSH2, MSH6 és PMS2. Ezenkívül az MGMT és az ERCC1 elvesztése is társult a CDX2 fehérje elvesztésével. Ezenkívül a CDX2 és az ERCC1 ellentétes kapcsolatot mutatott a metasztázisos tumor mérettel. A megtartott CDX2 expresszió a citoplazmatikus / membránhoz kötött béta-catenin nagyobb mértékű expressziójával és nukleáris APC-expresszióval társult. A CDX2 expresszióvesztés tehát nem ritka a colorectalis rákok májmetasztázisaiban, és eredményeink arra engednek következtetni, hogy a CDX2 részt vesz olyan mechanizmusokban, amelyek a DNS-javító fehérjék expresszióvesztését eredményezik (pl. metiláció), és akár része is lehet ezeknek a mechanizmusoknak; azonban a CDX2 pontos funkcióját ebben a kontextusban még tovább kell vizsgálni.

Vizsgálatunkban rámutattunk a prediktív biomarkerek fontosságára és szükségére a metasztázisos vastagbélrákokban, és felhívtuk a figyelmet nemcsak az egyes prediktív markerek relevanciájára, hanem a különböző jelátviteli utak közötti más ismert és újonnan feltárandó kapcsolatokra is.

Következtetésként kijelenthetjük, hogy további vizsgálatokra van szükség ahhoz, hogy meghatározzuk az ARC pontos szerepét az apoptotikus jelátvitelben, és ezáltal meghatározzuk a fehérje szerepét a kemoterápiás rezisztenciában és a tumorsejtek túlélésében. Ebben a tanulmányban leírtuk az ARC fehérje expressziós profilját, és képesek voltunk kimutatni egy fontos kapcsolatot az ARC fehérje és az MMR fehérjék, az ERCC1, a TUBB3 és az RRM1 expressziója között vastagbélrákok májmetasztázisaiban.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Először és mindenekelőtt szeretném kifejezni őszinte hálámat Dr. Tizlavicz László professzor úrnak és Dr. Sükösd Farkasnak, hogy lehetővé tették az együttműködést és lehetőséget teremtettek a dolgozat elkészítéséhez. Ezenkívül hálás vagyok kritikai észrevételeikért, bátorításukért és számos tanácsaikért, melyet Ph.D. munka folyamán nyújtottak.

Külön köszönet dr. Valicsek Erzsébetnek, keresztanyámnak, a bátorító támogatásért és a klinikai észrevételeikért, amik a vizsgálatokat igyekeztek közelebb hozni a mindennapi klinikai gyakorlat kihívásaihoz.

Köszönetemet fejezem ki minden társszerzőmnek és a szegedi és heidelbergi egyetemi klinika Patológiai Intézetének munkatársainak az együttműködésükért és segítségükért ebben a munkában. Remélem a jövőben is fennmarad ez a gyümölcsöző kapcsolat és további érdekes tudományos kérdések megválaszolásán dolgozhatunk együtt.

Nagyon hálás vagyok a családomnak a folyamatos támogatásért és bátorításért, amelyet ezekben az években kaptam.

A dolgozat elkészítéséhez GINOP 2.3.2-15-2016-00020 projekt nyújtott támogatást.

Szeged, 2018. március 15.



Dr. Csaba Tóth

IRODALOMJEGYZÉK

1. Siegel, R., C. Desantis, and A. Jemal, *Colorectal cancer statistics, 2014*. CA Cancer J Clin, 2014. **64**(2): p. 104-17.
2. Parkin, D.M., P. Pisani, and J. Ferlay, *Global cancer statistics*. CA Cancer J Clin, 1999. **49**(1): p. 33-64, 1.
3. O'Connell, J.B., M.A. Maggard, and C.Y. Ko, *Colon cancer survival rates with the new American Joint Committee on Cancer sixth edition staging*. J Natl Cancer Inst, 2004. **96**(19): p. 1420-5.
4. Brenner, H., et al., *Reduction of clinically manifest colorectal cancer by endoscopic screening: empirical evaluation and comparison of screening at various ages*. Eur J Cancer Prev, 2005. **14**(3): p. 231-7.
5. Binefa, G., et al., *Colorectal cancer: from prevention to personalized medicine*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(22): p. 6786-808.
6. Parkin, D.M., *Global cancer statistics in the year 2000*. Lancet Oncol, 2001. **2**(9): p. 533-43.
7. DePinho, R.A., *The age of cancer*. Nature, 2000. **408**(6809): p. 248-54.
8. Turkiewicz, D., et al., *Young patients with colorectal cancer: how do they fare?* ANZ J Surg, 2001. **71**(12): p. 707-10.
9. Boyle, P. and J.S. Langman, *ABC of colorectal cancer: Epidemiology*. BMJ, 2000. **321**(7264): p. 805-8.
10. Potter, J.D., *Colorectal cancer: molecules and populations*. J Natl Cancer Inst, 1999. **91**(11): p. 916-32.
11. Willett, W.C., et al., *Relation of meat, fat, and fiber intake to the risk of colon cancer in a prospective study among women*. N Engl J Med, 1990. **323**(24): p. 1664-72.
12. Daperno, M., et al., *The role of endoscopy in inflammatory bowel disease*. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2004. **8**(5): p. 209-14.
13. Li, Z., et al., *Predictive value of APE1, BRCA1, ERCC1 and TUBB3 expression in patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) receiving first-line platinum-paclitaxel chemotherapy*. Cancer Chemother Pharmacol, 2014. **74**(4): p. 777-86.
14. Misiakos, E.P., N.P. Karidis, and G. Kouraklis, *Current treatment for colorectal liver metastases*. World J Gastroenterol, 2011. **17**(36): p. 4067-75.
15. Olsen, J., et al., *The clinical perspectives of CDX2 expression in colorectal cancer: a qualitative systematic review*. Surg Oncol, 2014. **23**(3): p. 167-76.
16. Inno, A., et al., *Role of MGMT as biomarker in colorectal cancer*. World J Clin Cases, 2014. **2**(12): p. 835-9.
17. Sayar, I., et al., *Relationship among mismatch repair deficiency, CDX2 loss, p53 and E-cadherin in colon carcinoma and suitability of using a double panel of mismatch repair proteins by immunohistochemistry*. Pol J Pathol, 2015. **66**(3): p. 246-53.
18. Olsen, A.K., et al., *Regulation of APC and AXIN2 expression by intestinal tumor suppressor CDX2 in colon cancer cells*. Carcinogenesis, 2013. **34**(6): p. 1361-9.
19. Mercier, I., et al., *ARC, an apoptosis suppressor limited to terminally differentiated cells, is induced in human breast cancer and confers chemo- and radiation-resistance*. Cell Death Differ, 2005. **12**(6): p. 682-6.
20. Colucci, G., et al., *Phase III randomized trial of FOLFIRI versus FOLFOX4 in the treatment of advanced colorectal cancer: a multicenter study of the Gruppo Oncologico Dell'Italia Meridionale*. J Clin Oncol, 2005. **23**(22): p. 4866-75.
21. Toth, C., et al., *Expression of the apoptosis repressor with caspase recruitment domain (ARC) in liver metastasis of colorectal cancer and its correlation with DNA mismatch repair proteins and p53*. J Cancer Res Clin Oncol, 2015.
22. Koehler, B.C., et al., *Pan-Bcl-2 inhibitor obatoclax delays cell cycle progression and blocks migration of colorectal cancer cells*. PLoS One, 2014. **9**(9): p. e106571.
23. Hassen, S., N. Ali, and P. Chowdhury, *Molecular signaling mechanisms of apoptosis in hereditary non-polyposis colorectal cancer*. World J Gastrointest Pathophysiol, 2012. **3**(3): p. 71-9.
24. Mercier, I., et al., *ARC (apoptosis repressor with caspase recruitment domain) is a novel marker of human colon cancer*. Cell Cycle, 2008. **7**(11): p. 1640-7.
25. Sarela, A.I., et al., *Expression of the antiapoptosis gene, survivin, predicts death from recurrent colorectal carcinoma*. Gut, 2000. **46**(5): p. 645-50.
26. Koseki, T., et al., *ARC, an inhibitor of apoptosis expressed in skeletal muscle and heart that interacts selectively with caspases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(9): p. 5156-60.
27. Wu, L., et al., *Induction of the apoptosis inhibitor ARC by Ras in human cancers*. J Biol Chem, 2010. **285**(25): p. 19235-45.

28. Li, Y.Z., et al., *p53 initiates apoptosis by transcriptionally targeting the antiapoptotic protein ARC*. Mol Cell Biol, 2008. **28**(2): p. 564-74.
29. Ludwig-Galezowska, A.H., L. Flanagan, and M. Rehm, *Apoptosis repressor with caspase recruitment domain, a multifunctional modulator of cell death*. J Cell Mol Med, 2011. **15**(5): p. 1044-53.
30. Foo, R.S., et al., *Regulation of p53 tetramerization and nuclear export by ARC*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(52): p. 20826-31.
31. Shirota, Y., et al., *ERCC1 and thymidylate synthase mRNA levels predict survival for colorectal cancer patients receiving combination oxaliplatin and fluorouracil chemotherapy*. J Clin Oncol, 2001. **19**(23): p. 4298-304.
32. Azuma, K., et al., *Expression of ERCC1 and class III beta-tubulin in non-small cell lung cancer patients treated with carboplatin and paclitaxel*. Lung Cancer, 2009. **64**(3): p. 326-33.
33. Portyanko, A., et al., *beta(III)-tubulin at the invasive margin of colorectal cancer: possible link to invasion*. Virchows Arch, 2009. **454**(5): p. 541-8.
34. Vilmar, A., et al., *RT-PCR versus immunohistochemistry for correlation and quantification of ERCC1, BRCA1, TUBB3 and RRMI in NSCLC*. Lung Cancer, 2012. **75**(3): p. 306-12.
35. Parker, A.L., M. Kavallaris, and J.A. McCarroll, *Microtubules and their role in cellular stress in cancer*. Front Oncol, 2014. **4**: p. 153.
36. Hryniuk, A., et al., *Cdx1 and Cdx2 function as tumor suppressors*. J Biol Chem, 2014. **289**(48): p. 33343-54.
37. Gerhard, R., et al., *Clinicopathological significance of ERCC1 expression in breast cancer*. Pathol Res Pract, 2013. **209**(6): p. 331-6.
38. Dawson, H., et al., *Possible role of Cdx2 in the serrated pathway of colorectal cancer characterized by BRAF mutation, high-level CpG Island methylator phenotype and mismatch repair-deficiency*. Int J Cancer, 2014. **134**(10): p. 2342-51.
39. Dawson, H., et al., *Loss of Cdx2 Expression in Primary Tumors and Lymph Node Metastases is Specific for Mismatch Repair-Deficiency in Colorectal Cancer*. Front Oncol, 2013. **3**: p. 265.
40. Wang, L., et al., *Regulation of the phosphorylation and nuclear import and export of beta-catenin by APC and its cancer-related truncated form*. J Cell Sci, 2014. **127**(Pt 8): p. 1647-59.

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT KÉPEZŐ KÖZLEMÉNYEK

- I. **Tóth C, Meinrath J, Herpel E, Derix J, Fries J, Buettner R, Schirmacher P, Heikaus S: Expression of the apoptosis repressor with caspase recruitment domain (ARC) in liver metastasis of colorectal cancer and its correlation with DNA mismatch repair proteins and p53.** J Cancer Res Clin Oncol. 2016 May;142(5):927-35. doi: 10.1007/s00432-015-2102-3. [IF: 3.1]
- II. **Tóth C, Sukosd, F, Valicsek, E, Herpel, E, Schirmacher, P, Renner, M, Mader, C, Tizslavicz, L and Kriegsmann, J: Expression of ERCC1, RRM1, TUBB3 in correlation with apoptosis repressor ARC, DNA mismatch repair proteins and p53 in liver metastasis of colorectal cancer.** Int J Mol Med, 2017. 40(5): p. 1457-1465. [IF: 2.3]
- III. **Tóth, C., Sükösd, F., Valicsek, E., Herpel, E., Schirmacher, P., Tizslavicz, L.: Loss of CDX2 gene expression is associated with DNA repair proteins and is a crucial member of the Wnt signaling pathway in liver metastasis of colorectal cancer.** Oncology Letters 15, no. 3 (2018): 3586-3593. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.7756>. [IF: 1.3]

A tézis alapjául szolgáló közlemények összesített impakt faktora: 6,7 IF

NEM KÖZVETLENÜL AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ TOVÁBBI KÖZLEMÉNYEK

- IV. **Toth C, Funke S, Nitsche V, Liverts A, Zlachevska V, Gasis M, Wiek C, Hanenberg H, Mahotka C, Schirmacher P, Heikaus S: The role of apoptosis repressor with a CARD domain (ARC) in the therapeutic resistance of renal cell carcinoma (RCC): the crucial role of ARC in the inhibition of extrinsic and intrinsic apoptotic signalling.** Cell Commun Signal, 2017. 15(1): p. 16. [IF: 3.6]
- V. **Amer, W., Toth, C., Vassella, E., Meinrath, J., Koitzsch, U., Arens, A., Huang, J., Eischeid, H., Adam, A., Buettner, R., et al. (2017). Evolution analysis of heterogeneous non-small cell lung carcinoma by ultra-deep sequencing of the mitochondrial genome.** Nature Scientific reports 7, 11069. [IF: 4.2]
- VI. **Sproll C, Freund AK, Hassel A, Hölbling M, Aust V, Storb SH, Handschel J, Teichmann C, Depprich R, Behrens B, Neves RP, Kübler NR, Kaiser P, Baldus SE, Tóth C, Kaisers W, Stoecklein NH: Immunohistochemical detection of lymph node-DTCs in patients with node-negative HNSCC.** Int J Cancer, 2017. 140(9): p. 2112-2124. [IF: 5.5]

- VII. **Tóth, C.: Clinical pathology of granulomatous inflammation.** Der Radiologe, 2016. 56(10): p. 856-865. [IF: 0.4]
- VIII. Michael Hoffmeister, Lina Jansen, Anja Rudolph, **Csaba Toth**, Matthias Kloor, Wilfried Roth, Hendrik Bläker, Jenny Chang-Claude, Hermann Brenner: **Statin Use and Survival After Colorectal Cancer: The Importance of Comprehensive Confounder Adjustment.** JNCI: Journal of the National Cancer Institute, Volume 107, Issue 6, 1 June 2015, djv045, <https://doi.org/10.1093/jnci/djv045> [IF: 11.3]
- IX. **Toth, C.,** Lee, H-S., Sebastian Heikaus, S. (2014). **Rapidly growing mass in the pancreas: intraductal Candida infection in a chronic recurrent pancreatitis.** Case Reports in Clinical Pathology, 2014, Vol. 1, No. 2 DOI: 10.5430/crcp.v1n2p146 [IF: 0.0]
- X. Prigge, E.S., **Toth, C.,** Dyckhoff, G., Wagner, S., Muller, F., Wittekindt, C., Freier, K., Plinkert, P., Hoffmann, J., Vinokurova, S., et al. (2014). **p16 /Ki-67 co-expression specifically identifies transformed cells in the head and neck region.** Int J Cancer. [IF: 5.0]
- XI. Bickeboller, M., Tagscherer, K.E., Kloor, M., Jansen, L., Chang-Claude, J., Brenner, H., Hoffmeister, M., **Toth, C.,** Schirmacher, P., Roth, W., et al. (2014). **Functional characterization of the tumor-suppressor MARCKS in colorectal cancer and its association with survival.** Oncogene 0. [IF: 8.4]
- XII. Weis, B., Schmidt, J., Maamar, H., Raj, A., Lin, H., **Toth, C.,** Riedmann, K., Raddatz, G., Seitz, H.K., Ho, A.D., et al. (2014). **Inhibition of intestinal tumor formation by deletion of the DNA methyltransferase 3a.** Oncogene 0. [IF: 8.4]
- XIII. Hoffmeister, M., Blaker, H., Kloor, M., Roth, W., **Toth, C.,** Herpel, E., Frank, B., Schirmacher, P., Chang-Claude, J., and Brenner, H. (2013). **Body mass index and microsatellite instability in colorectal cancer: a population-based study.** Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. [IF: 4.1]
- XIV. Reuschenbach, M., Kansy, K., Garbe, K., Vinokurova, S., Flechtenmacher, C., **Toth, C.,** Prigge, E. S., Thiele, O. C., Reinert, S., Hoffmann, J., von Knebel Doeberitz, M., Freier, K.: **Lack of evidence of human papillomavirus-induced squamous cell carcinomas of the oral cavity in southern Germany.** Oral Oncol. 2013 Apr pii: S1368-8375(13)00535-6. [IF: 3.0]

- XV. Rudolph, A., **Toth, C.**, Hoffmeister, M., Roth, W., Herpel, E., Schirmacher, P., Brenner, H., Chang-Claude, J.: **Colorectal cancer risk associated with hormone use varies by expression of estrogen receptor beta.** *Cancer Res* 73, 3306-3315. [IF: 9.2]
- XVI. Rudolph, A., **Toth, C.**, Hoffmeister, M., Roth, W., Herpel, E., Jansen, L., Marx, A., Brenner, H., Chang-Claude, J.: **Expression of oestrogen receptor beta and prognosis of colorectal cancer.** *Br J Cancer*. 2012 107(5):831-9. [IF: 5.0]
- XVII. **Toth, C.:** **Tracheopathia osteoplastica – Ein 100-jähriges Mysterium** [Tracheopathia osteoplastica. A 100-year-old mystery]. *Pathologe*. 2012 Mar; 33(2):129-34. [Article in German] [IF: 0.6]
- XVIII. **Tóth, C.:** **Role of R classification in the interdisciplinary oncology** [Az R-klasszifikáció az interdiszciplináris onkológiában] *Orv Hetil.* (Hungarian Medical Journal) 2011 Dec 25; 152(52):2086-90. [Article in Hungarian] [IF: 0.0]
- XIX. **Toth, C.:** **Obduktionen 2010. Quid(ne) mortui vivos docent?** [*Autopsies 2010. Is death still teaching the living?*]. *Pathologe*, 2010. **31**(4): p. 297-302. [IF: 0.5]
- XX. **Toth, C.:** **A boncolások szerepe a XXI. század medicinájában** (The role of autopsies in the 21st century medicine) *Orvosi Hetilap* (Hungarian Medical Journal) DOI10.1556/OH.2010.28837 [IF: 0.0]

Tudományos közlemények összesített impakt faktora: 75.9

MTMT azonosító: 10057843

Szeged, 2018. március 15.



Dr. Tóth Csaba