

Expresia Tspan1 v adenokarcinóme prostaty

Andrea Janegová^{1,2}, Viktória Bothová², Michal Harmaňoš³, Marián Cvik³, Iveta Kopecká¹

¹Patologicko-anatomické oddelenie, Fakultná nemocnica, Trnava

²Ústav patologickej anatómie, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave

³Urologická klinika, Fakultná nemocnica, Trnava

Prediktívny odhad agresivity adenokarcinómu prostaty je podkladom pre efektívny terapeutický manažment pacientov. Výskum nových, spoľahlivých a presných biomarkerov je preto stále aktuálny. Tetraspanín 1 (Tspan1) bol identifikovaný ako jeden z génov v prostate asociovaných s tumorom. Práca je zameraná na hodnotenie imunohistochemickej expresie Tspan1 v adenokarcinómoch prostaty (CaP) a vo vzorkách benígnej hyperplázie prostaty (BHP). Všetky vyšetrené vzorky boli pozitívne na Tspan1, BHP však vykazovala slabú, fokálnu a lumenálnu expresiu, kým v CaP bola pozitívna cytoplazmová, nízkej až vysokej miery expresie. Nádory s vysokým Gleasonovým skóre (GS) a lokálne pokročilé nádory vykazovali v porovnaní s nádormi s nižším GS a lokalizovanými nádormi častejšie nižšiu mieru expresie. Zistená spojitosť zníženej expresie Tspan1 s vyšším Gleasonovým skóre a pokročilým štádiom choroby by naznačovala negatívny prognostický potenciál Tspan1 v adenokarcinóme prostaty. **Kľúčové slová:** adenokarcinóm prostaty, biomarkery, Tspan1

Tspan1 expression in prostatic adenocarcinoma

Accurate prognostic stratification of patients with prostatic adenocarcinoma is substantial for effective therapeutic management. Therefore identification of reliable biomarkers of prostate cancer aggressiveness is still an actual topic. Tetraspanin 1 (TSPAN1) was found to be a tumour associated gene in prostate cancer. This study focused on evaluating immunohistochemical Tspan1 expression in samples of prostate adenocarcinoma (CaP) and benign prostatic hyperplasia (BPH). All samples were positive for Tspan1; showed, however, different degree of expression, BHP being only weakly, focally positive with mainly luminal expression and CaP showing cytoplasmic positivity of low to a high degree. The lower degree of Tspan 1 expression was found in CaP cases with higher Gleason score and locally advanced disease. In conclusion, the inverse association of Tspan1 expression with a higher Gleason score and more advanced tumour stage suggest a possible negative prognostic role of this marker in prostate cancer.

Keywords: prostate adenocarcinoma, biomarkers, Tspan1

NewsLab, 2021; roč. 12 (1): 8 – 11

Úvod

Adenokarcinóm prostaty patrí medzi časté nádorové ochorenia, vo väčšine prípadov je však málo agresívny a pomaly rastúci. Prostatický karcinóm sa však môže správať aj agresívne. Spoľahlivé prediktívne a prognostické biomarkery sú nevyhnutné na odlíšenie menej a viac agresívnych karcinómov a na selekciu pacientov, ktorí vyžadujú aktívnu liečbu, od tých, u ktorých je v danom čase dostačujúca *active surveillance*. Neadekvátna liečba môže viesť k zhoršeniu kvality života pacientov alebo byť priamo fatálna. V súčasnosti dostupné prognostické biomarkery ako sérová hladina PSA, štádium choroby a Gleasonovo skóre slúžia síce na stratifikáciu pacientov do rizikových skupín, nie sú však dostatočne presné. Hľadanie biomarkerov karcinómu prostaty, ktoré by vedeli spoľahlivo „predpovedať“ agresivitu nádoru, je teda stále aktuálne.

Na identifikáciu potenciálnych biomarkerov v poslednom čase výraznou mierou prispievajú nové metódy molekulovej genetiky. Kristiansen a spol.⁽¹⁾ identifikovali pri porovnaní profilov benígneho tkaniva prostaty s karcinómom odlišných 98 génov, ktoré by mohli zohrávať úlohu v adenokarcinóme prostaty. Gény z tohto zoznamu podnecujú v súčasnosti výskum biomarkerov rakoviny prostaty.

Medzi identifikované gény patrí aj gén pre tetraspanín 1 (Tspan1), člen rodiny tetraspanínov. Superrodinu tetraspanínov tvorí 33 transmembránových glykoproteínov, ktoré sú schopné vytvárať komplexy, membránové mikrodomény obohatené o tetraspaníny (TEMs) s inými tetraspanínmi alebo s inými transmembránovými a cytoplazmovými proteínmi. Táto sieť tetraspanínov môže ovplyvniť prenos signálu do bunky a zohráva úlohu v širokej škále biologických procesov zahŕňujúcich proliferáciu buniek, bunkovú adhéziu, migráciu a motilitu buniek^(2,3).

Zvýšená expresia tetraspanínov bola preukázaná v rôznych malígnych nádoroch zahŕňujúcich karcinómy krčka maternice, endometria, prsníka, pľúc, hrubého čreva, pankreasu a iné⁽³⁻⁸⁾. Úloha tetraspanínov v karcinogenéze sa zdá mnohotvárna. Štúdie preukázali, že v malígnych nádoroch sú tetraspaníny zapojené do procesu proliferácie, migrácie a invázie nádorových buniek a môžu mať pri tom podpornú alebo supresívnu úlohu⁽³⁾.

Štúdie naznačujú aj možnú úlohu tetraspanínov v adenokarcinóme prostaty. Munkley et al.⁽⁹⁾ preukázali, upreguláciu génu Tspan1 v nádorovom tkanive prostaty v porovnaní s nenádorovým a jeho spojitosť s migráciou nádorových buniek, a to pod kontrolou androgénov.

Tabuľka 1. Expresia Tspan1 v adenokarcinómoch prostaty podľa klinickopatologických charakteristík (Gleasonovo skóre, WHO/ISUP Grade Group, pT). n – počet adenokarcinómov prostaty, + – nízka miera expresie, ++ – stredná miera expresie, +++ – vysoká miera expresie

	n	Tspan1		
		+	++	+++
pT				
pT2a	2	0	2	0
pT2c	8	3	3	2
pT3a	3	0	3	0
pT3b	8	4	3	1
WHO/ISUP grade				
1	3	1	2	0
2	9	3	6	0
3	1	0	0	1
4	4	0	2	2
5	4	3	1	0
Gleason score				
6	3	1	2	0
7	10	3	6	1
8	4	0	2	2
9	4	3	1	0

Cieľom tejto práce bolo hodnotenie imunohistochemickej expresie proteínu Tspan1 v bioptických vzorkách adenokarcinómov prostaty, porovnanie s nenádorovým tkanivom prostaty aj porovnanie expresie vzhľadom na prognostické ukazovatele ako Gleasonovo skóre a štádium choroby.

Materiál a metodika

Súbor pacientov

Súbor pacientov tvorilo spolu 21 mužov vo veku od 55 do 74 rokov, u ktorých bola vykonaná radikálna prostatektómia na Urologickej klinike Fakultnej nemocnice Trnava pre biopticky potvrdený adenokarcinóm prostaty. Kontrolnú skupinu tvorilo 5 pacientov po TUR-P s klinickým a bioptickým nálezom benígnej hyperplázie prostaty. Klinickopatologické charakteristiky adenokarcinómov prostaty sú uvedené v tabuľke 1.

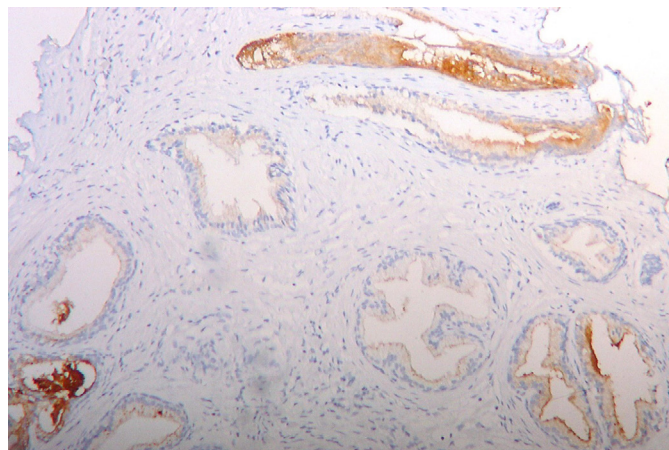
Tkanivové microarray (TMA) bločky

Na imunohistochemické vyšetrenie boli použité tkanivové microarray pripravené z FFPE vzoriek prostat. Od každého pacienta boli analyzované dve vzorky karcinómu z rôznych miest tkaniva prostaty, aby sa podchytila heterogenita nádoru. TMA vzorky s priemerom 3 mm boli odobrané punkčným skalpelom Harris Uni-Core (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany). Na imunohistochemické farbenie sa z microarray bločkov narezali 4-5 µm rezy tkaniva.

Imunohistochemické farbenie

Po deparafinizácii a revitalizácii s použitím Dako PT Link (Agilent Dako, Santa Clara, CA, USA) s roztokom EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, pH 9 (Agilent Dako, Santa Clara, CA, USA) boli preparáty v imunostaineri (Autostainer Link 48, Agilent Dako, Santa Clara, CA, USA) inkubované s primárnou protilátkou (Tspan1, klon ab254730, Abcam, Cambridge, UK, polyklonálna králičia, riedenie 1 : 500) počas 60

Obrázok 1. Expresia Tspan1 vo vzorke benígnej hyperplázie prostaty. Žliazky vykazujú fokálnu luminálnu expresiu (hnedá farba), DAB, 100x.



minút, následne so sekundárnou protilátkou a nakoniec farbené diaminobenzidínom DAB+ (Agilent Dako, Santa Clara, CA, USA) a dofarbené H & E.

Ako negatívnu kontrolu sme použili rezy inkubované s riediacim roztokom bez primárnej protilátky. Ako pozitívnu kontrolu sme použili vzorky tkaniva obličky a hrubého čreva.

Hodnotenie imunohistochemického farbenia

Ako pozitívnu sme hodnotili cytoplazmovú expresiu Tspan1, pričom sme stanovili histoskóre na základe percenta pozitívnych buniek (0 = 0 % pozitívnych buniek, 1 = < 10 % pozitívnych buniek, 2 = 10 – 50 % pozitívnych buniek, 3 = > 50 % pozitívnych buniek) a intenzity farbenia (0 = negatívne, 1 = slabá pozitivita, 2 = stredne silná pozitivita, 3 = silná pozitivita) podľa Xu et al. (10). Podľa výsledného histoskóre boli vzorky zaradené do kategórie s nízkou (+, histoskóre ≤ 2), so strednou (++, histoskóre 3-5) alebo s vysokou (+++, histoskóre ≥ 6) mierou expresie Tspan1.

Výsledky

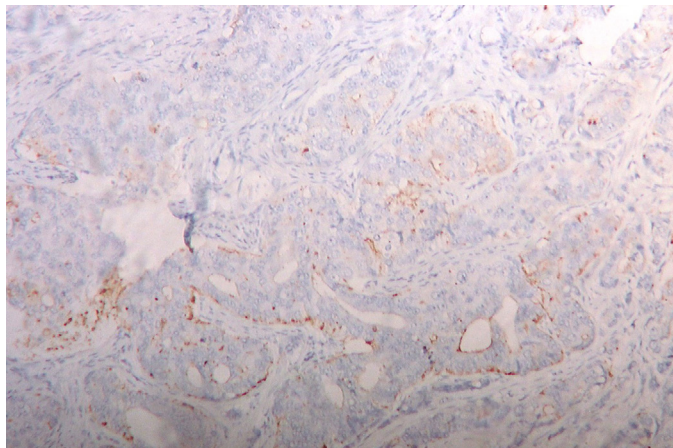
Všetky vyšetrené vzorky boli pozitívne na proteín Tspan1 s rôznou mierou expresie. Prípady benígnej hyperplázie prostaty vykazovali slabú expresiu Tspan1 (obrázok 1), pričom expresia bola prevažne luminálna a len fokálne cytoplazmová.

V adenokarcinómoch prostaty bola pozitivita Tspan1 prevažne cytoplazmová, niekedy s pridruženou luminálnou expresiou a/alebo intraluminálnou pozitivitou sekrétu. Adenokarcinómy prostaty vykazovali rôznu mieru expresie Tspan1, od nízkej (+) v 33,3 % prípadov (obrázok 2) cez strednú (++) v 52,4 % prípadov až po vysokú (+++) v 14,3 % prípadov (obrázok 3).

Vzhľadom na diferencovanosť nádorov vykazovali adenokarcinómy s nižším Gleasonovým skóre (GS 6-7) prevažne strednú mieru expresie (++) , nádory s Gleasonovým skóre 8 strednú až vysokú mieru expresie (+++) a málo diferencované nádory s Gleasonovým skóre 9 prevažne nízku mieru expresie (+) Tspan1. Podobný trend expresie vykazovali adenokarcinómy vzhľadom na WHO/ISUP grade.

Vzhľadom na patologické štádium choroby (pT) vykazovali lokálne pokročilé adenokarcinómy prostaty (pT3b) častejšie

Obrázok 2. Nízka miera expresie Tspan1 (+) vo vzorke adenokarcinómu prostaty (hnedá farba), DAB, 200x.



nízku mieru expresie Tspan1 v porovnaní s nádormi lokalizovanými na tkanivo prostaty (pT2).

Sumár imunohistochemickej expresie Tspan1 v adenokarcinómoch prostaty je uvedený **v tabuľke 1**.

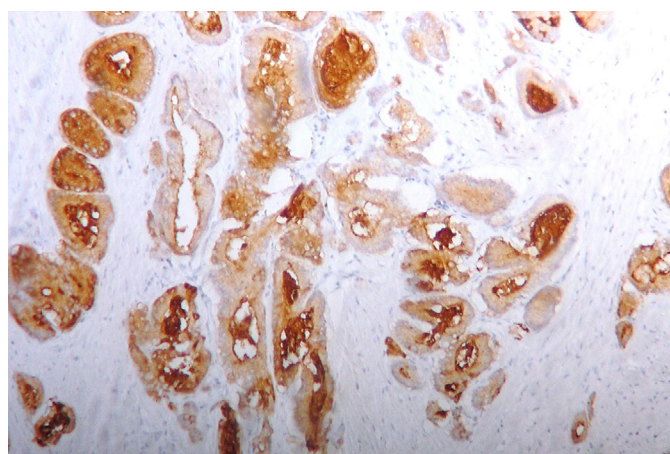
Diskusia

Adenokarcinóm prostaty je časté nádorové ochorenie. Väčšina prípadov je málo agresívnych, pomaly rastúcich. V časti prípadov sa však adenokarcinóm prostaty správa agresívne. V súčasnosti dostupné biomarkery nie sú dostatočne presné na selekciu pacientov, čo môže viesť k podliečeniu agresívnych karcinómov alebo nadliečeniu neagresívnych nádorov, a tak má nemalý vplyv na kvalitu života pacienta. Snaha nájsť čo najpresnejšie a najspoľahlivejšie prediktívne a prognostické biomarkery adenokarcinómu prostaty stále podnecuje nový výskum. Metódy molekulovej genetiky umožňujú identifikovať gény asociované s tumorom. V adenokarcinóme prostaty medzi tieto gény patrí aj Tspan1, kódujúci transmembránový proteín Tspan1, člen rodiny tetraspanínov.

Tetraspaníny zohrávajú úlohu v širokej škále biologických procesov zahrňujúcich predovšetkým proces migrácie a motility, a to v bunkách normálnych, ale aj malígne transformovaných. Migrácia buniek je základným procesom invázie a metastatickej progresie rakoviny. Zmeny expresie tetraspanínov boli opísané v rôznych karcinómoch vrátane adenokarcinómu prostaty^(3,9).

Imunohistochemickú expresiu Tspan1 sme hodnotili v bioptických vzorkách acinárnych adenokarcinómov a benígnej hyperplázie prostaty. Všetky vyšetrené vzorky boli pozitívne na proteín Tspan1, vykazovali však rôznu mieru expresie. Tspan1 exprimujú aj benígne tkanivá, ale zdanlivo v menšej miere, respektíve v nižšej intenzite^(8,10), čo preukazujú aj naše výsledky. Prípady benígnej hyperplázie prostaty vykazovali slabú (+) expresiu Tspan1, ktorá bola fokálna a prevažne luminálna, kým v karcinómoch bola expresia prevažne cytoplazmová s pridruženou luminálnou expresiou a/alebo intraluminálnou pozitivitou sekrétu. Podobnú kompartmentáciu Tspan1 pozitivitu opisuje vo svojej štúdii Stinnesbeck et al.⁽¹¹⁾.

Obrázok 3. Vysoká miera expresie Tspan1 (+++) vo vzorke adenokarcinómu prostaty (hnedá farba), DAB, 100x.



Adenokarcinómy prostaty vykazovali rôznu mieru expresie Tspan1, od nízkej (+) až po vysokú (+++), pričom vo vyše polovici prípadov (52,4 %) sme zaznamenali expresiu strednej miery (++). Overexpresiu génu Tspan1 (na úrovni mRNA) v nádorovom tkanive v porovnaní s benígnym tkanivom prostaty potvrdil Stinnesbeck et al.⁽¹¹⁾. Pri imunohistochemickej analýze na úrovni proteínovej expresie však zistili, že časť adenokarcinómov (35 %) vykazuje porovnateľne nízku expresiu ako benígne tkanivo prostaty. V našom súbore sme nízku mieru expresie Tspan1 zaznamenali v 33,3 % prípadov (n = 7) adenokarcinómov. Táto nízka miera expresie Tspan1 v časti adenokarcinómov teda limituje jeho využitie ako diagnostického markera, i keď sme pozorovali odlišnú lokalizáciu positivity v benígnom tkanive (prevažne luminálna) v porovnaní s malígnym (prevažne cytoplazmová).

Na posúdenie prognostického potenciálu Tspan1 sme korelovali mieru expresie tohto proteínu so známymi prognostickými ukazovateľmi, predovšetkým s Gleasonovým skóre a so štádiom choroby (pT). Kým adenokarcinómy s nižším Gleasonovým skóre (GS 6-7) vykazovali prevažne strednú mieru (++) expresie Tspan1, nádory s Gleasonovým skóre 8 častejšie vysokú mieru (+++) expresie a málo diferencované nádory s Gleasonovým skóre 9 prevažne nízku mieru (+) expresie Tspan1. Signifikantnú inverznú koreláciu medzi nádorovým grade a imunohistochemickou expresiou Tspan1 zaznamenal aj Stinnesbeck et al.⁽¹¹⁾.

Vzhľadom na patologické štádium choroby (pT) vykazovali lokálne pokročilé adenokarcinómy prostaty (pT3b) častejšie nízku mieru expresie Tspan1 v porovnaní s nádormi lokalizovanými na tkanivo prostaty (pT2). Zníženie expresie Tspan1 v pokročilých nádoroch zaznamenal aj Xu et al.⁽¹⁰⁾ spolu so signifikantnou koreláciou tejto zníženej expresie so včasnou biochemickou recidívou choroby. Spojitosť zníženej géovej expresie Tspan1 s pokročilým štádiom choroby preukázali aj Munkley et al.⁽⁹⁾, ktorí pri porovnávaní expresie Tspan1 v primárnom adenokarcinóme prostaty s metastázou pozorovali výrazný pokles expresie v nádorových bunkách metastázy.

Zistená spojitosť zníženej expresie Tspan1 s vyšším Gleasonovým skóre a lokálne pokročilou chorobou by naznačo-

vala negatívny prognostický potenciál Tspan1 v adenokarcinóme prostaty, prispieva tak k poznatkom o biomarkeroch karcinómu prostaty a predstavuje podnet na nadväzujúce výskumy.

PodĎakovanie

Článok vznikol s podporou projektu VEGA 1/0684/21 „Prognostický význam zmien inervácie pri hyperplázii a neoplázii prostaty“.

LITERATÚRA

- Kristiansen G, Pilarsky C, Wissmann C, et al. Expression profiling of microdissected matched prostate cancer samples reveals CD166/MEMD and CD24 as new prognostic markers for patient survival. *J Pathol.* 2005; 205: 359–76.
- Jiang X, Zhang J, Huang Y. Tetraspanins in cell migration. *Cell adhesion & migration.* 2015; 9: 406–415.
- Hölters S, Anacker J, Jansen L, et al. Tetraspanin 1 promotes invasiveness of cervical cancer cells. *Int J Oncol* 2013; 43: 503-512.
- Tokuhara T, Hasegawa H, Hattori N, et al: Clinical significance of CD151 gene expression in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2001; 7: 4109–4114.
- Voss MA, Gordon N, Maloney S, et al: Tetraspanin CD151 is a novel prognostic marker in poor outcome endometrial cancer. *Br J Cancer.* 2011; 104: 1611–1618.
- Miyake M, Nakano K, Itoi S, et al. Motility-related protein-1 (MRP-1/CD9) reduction as a factor of poor prognosis in breast cancer. *Cancer Res.* 1996; 56: 1244–1249.
- Chen L, Zhu Y, Zhang X, et al. TSPAN1 protein expression: a significant prognostic indicator for patients with colorectal adenocarcinoma. *World J Gastroenterol.* 2009; 15: 2270–2276.
- Hou, FQ, et al. Tetraspanin 1 is involved in survival, proliferation and carcinogenesis of pancreatic cancer. *Oncology reports.* 2015; 34: 3068-3076.
- Munkley J, McClurg UL, Livermore KE, et al. The cancer-associated cell migration protein TSPAN1 is under control of androgens and its up-regulation increases prostate cancer cell migration. *Sci Rep* 2017; 7: 5249.
- Xu F, Gao Y, Wang Y, et al. Decreased TSPAN1 promotes prostate cancer progression and is a marker for early biochemical recurrence after radical prostatectomy. *Oncotarget.* 2016; 7(39): 63294-63305.
- Stinnesbeck M, Kristiansen A, Ellinger J, et al. Prognostic role of TSPAN1, KIAA1324 and ESRP1 in prostate cancer. *APMIS.* 2021; 129(4): 204-212.



MUDr. Andrea Janegová, PhD.

Ústav patologickej anatómie
Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave
Sasinkova 4, 81108, Bratislava
e-mail: andi.janegova@gmail.com