

Pécsi Tudományegyetem Egészségtudományi Kar

Egészségtudományi Doktori Iskola

Pécs

Doktori Iskola vezetője: PROF. DR. BÓDIS JÓZSEF egyetemi tanár

A glioblastoma molekuláris osztályozása

PhD értekezés

Nagy Ádám

Témavezető:

PROF. DR. Kálmán Bernadette, MD, PhD, DSc, FAAN

Onkológia–egészségtudomány (PR-6/1 028) doktori program

Programvezető:

PROF. DR. Kiss István, MD, PhD, DSc

Pécs, 2017

Tartalom

1. Rövidítésjegyzék	4
2. Bevezetés, a glioblastoma irodalmának áttekintése	7
2.1. A glioblastoma klinikai jellegzetességei	7
2.2. A glioblastoma szövettani jellemzői.....	10
2.3. A glioblastoma patomechanizmusa	13
2.3.1 Vérellátás, hypoxia	13
2.3.2 Vér-agy gát.....	14
2.3.3. A glioblastoma anyagcsere zavarai.....	15
2.4. A glioblastoma molekuláris genetikai jellegzetességei	18
2.4.1 Az IDH-1 R132H mutáció és szerepe.....	19
2.4.2 Az EGFR mutációi és következményei a jelátvitelben.....	19
2.4.3 Tumor szuppresszor molekulák	21
3. Hipotézisek, célkitűzések	23
3.1. Hipotézisek	23
3.2. Célkitűzések.....	23
4. Anyag és módszer	24
4.1. Beteganyag	24
4.2. Előtanulmányok.....	26
4.2.1. Immunhisztokémiai előtanulmányok.....	26
4.2.2. Piro szekvenálási előtanulmányok	28
4.3. Immunhisztokémiai tesztek	30
4.3.1. Immunhisztokémia értékelése.....	38
4.4. Piro szekvenálás	40
4.5. Piro szekvenálás értékelése	42
4.6. Az adatok rendezése és statisztikai elemzések	43
4.6.1. Klinikai adatgyűjtés és a master file elkészítése.....	43
4.6.2. Statisztikai módszerek	43
5. Eredmények.....	45
5.1. A két vizsgálati kohort.....	45
5.2. Nyers adatokból manuálisan levonható következtetések az 1. kohortban.....	45
5.3. A molekuláris alcsoportok elkülönítése klaszterelemzéssel az 1. kohortban.....	65

5.4. A molekuláris alcsoportok és atúlélési adatok korrelációja az 1. kohortban.....	68
5.5. A molekuláris mintázat hosszmetzeti változása a 2. kohortban.....	71
6. Diskusszió.....	73
6.1. A glioblastoma molekuláris jellegzetességei.....	73
6.2. Következtetések.....	78
7. Az értekezés új eredményei.....	80
8. Összefoglalás.....	81
9. Summary	83
10. Referenciák.....	85
11. Saját publikációk jegyzéke.....	97
11.1. A disszertáció alapjául szolgáló publikációk jegyzéke	97
11.2. A disszertáció alapjául szolgáló konferencia előadás és absztrakt.....	97
12. Köszönetnyilvánítás	99
13. 7. sz. melléklet doktori értekezés benyújtása és nyilatkozat a dolgozat eredetiségéről ...	100

1. Rövidítésjegyzék

Abi3 – Abelson interactor család 3-as tagja

AIP3 – Abi3 interakciós protein 3

AMP/ADP/ATP – Adenozin-mono/di/tri-foszfát

ATRX – X-kromoszómához kapcsolt alfa-talasszémia/mentális retardáció szindróma gén

BCNU – Bisz-kloro-etil-nitrozourea

cAMP – Ciklikus-adenozin-monofoszfát

CD133 – „Cluster of Differentiation 133”, prominin-1

cJUN – JUN génről átíródó protein

CNV – Gén-kópiaszám variáció

CpG sziget – Citozin és guanin gazdag „szigetszerű” régió

DNS/mtMDS – Dezoxi-ribonukleinsav/mitokondriális DNS

EGFR – Epidermális növekedési faktor receptor

EGFRvIII – Epidermális növekedési faktor III-as típusú mutáns receptor

EORTC – „European Organisation for Research and Treatment of Cancer”

ErbB-1 – Epidermális növekedési faktor receptor alternatív elnevezése

FFPE – Formalin fixált, paraffinba ágyazott biológiai anyag

GAP – GTPáz aktiváló protein

GBM – Glioblastoma multiforme (újabb nevén glioblastoma)

G-CIMP – CpG sziget metilátor fenotípus

GFAP – Gliális fibrilláris savas protein

Gy – „Gray” - Ionizáló sugárzás SI mértékegysége

HER-1 – Humán epidermális növekedési faktor receptor 1

HIF-1 – Hypoxia indukáló faktor-1

ICAM-1 – Intercelluláris sejtadhéziós molekula 1

IDH-1/2/3 – Izocitrát dehidrogenáz enzim 1/2/3-as izotípus

IDH-1R132H – R132H pontmutációt szenvedett IDH-1 enzim

IHC – Immunhisztokémia

JNK – c-Jun N terminális kináz enzim

Ki67 – Proliferációs marker index

KIR – Központi idegrendszer

LFA-1 – Limfocita funkció asszociált antigén 1

MAPK – Mitogén aktivált protein kináz

MEOK – Markusovszky Egyetemi Oktatókórház

MRI – Mágneses rezonancia képalkotás

NAD/NADH – Nikotinsavamid-adenin-dinukleotid foszfát/protonnal asszociált NAD

NF-1 – Neurofibromin-1 protein (dőlt betűvel neurofibromin-1 gén)

OMICS – Omikák – pl. proteomika, genomika, metabolika, stb.

OXPHOS – Oxidatív foszforiláció

P53 – Celluláris tumor antigén p53

PCR – Polimeráz láncreakció

PDGFR – Vérlemezke eredetű növekedési faktor receptor

PDK-1 – Piruvát-dehidrogenáz-kináz 1

PEP – Foszfó-enol-piruvát

PIP3 – Foszfatidil-inozitol-3,4,5-trifoszfát

PKA – Protein-Kináz A

PKM – Piruvát kináz enzim mutációk

PNET – Primitív neuroektodermális tumor

PTEN – Foszfát-tenzin homológ tumorszuppresszor

ROI – „Region of Interest” – Megfigyelési terület

S100 – Kis molekulásúlyú kalciumkötő protein

TBS – „Tris-Buffered-Saline” – TRISZ pufferolt sóoldat

TCGA – „The Cancer Genome Atlas” – Rák-genom atlasz

TGFβ – Transzformáló növekedési faktor béta

TMZ – Temozolomid

TNFα – Tumornekrózis-faktor alfa

TREM1 – Mieloid sejteken expresszálandó aktiváló receptor 1

VCAM-1 – Vaszkuláris sejtadhéziós protein 1

VEGF – Vaszkuláris endoteliális növekedési faktor

VLA-4 – Nagyon késői antigén 4

WHO –Egészségügyi világszervezet

ZNF39 – Cink-ujj protein 39

2. Bevezetés, a glioblastoma irodalmának áttekintése

2.1. A glioblastoma klinikai jellegzetességei

A glioblastoma szó először a tudományos irodalomban 1926-ban jelent meg Bailey és Cushing munkájából. A gliomák klasszifikációja szövettani és fejlődési megközelítésből korábban ilyen részletességgel soha sehol nem volt publikált. Ebben a műben feltételezik, hogy az agydaganat típusok különböző, az agyszövetre jellemző sejtes állományból fejlődnek ki úgy, mint például az astrocitoma az astrocita progenitorokból [Bailey és mtsa, 1926]. Ez az elmélet napjainkig sokat változott, de az elnevezések megmaradtak. A glioblastomát eredetileg glioblastoma multiforme névvel illették, ami sugallta a daganat gliális prekursorokból kiinduló eredetét, valamint a tumor erősen heterogén szövettani képét is [Goldmann és mtsai, 2006]. A World Health Organization (WHO) 2007-es agydaganatok osztályozása óta glioblastomaként írjuk le [Louis és mtsai, 2007], melynek rövidítése „GBM”.

A magas grádusú gliomák igen változatos tüneteket mutatnak. Ebben szerepet játszanak a daganat klinikai és biológiai tulajdonságai, valamint a beteg általános állapota is. A végső stádiumban lévő tumorok tünetei és tulajdonságai rendszerint szignifikánsan rosszabbak, mint a korán észlelt daganatok esetében. A glioblastoma, a WHO szerinti negyedik grádusú glioma, szintén számos tünettől járhat együtt, melyek gyakran csak akkor jelentkeznek, amikor a daganat már erősen térfoglaló és számos genetikai defektust halmozott fel. A tünetek egy része a patológiás elváltozás direkt vagy indirekt (pl. erek összenyomásából adódó hypoxia) mechanizmus útján okozta szöveti izgalomból származik, mint például a gyakori epilepsziás rohamok jelentkezése. Azonban a glioblastoma idővel a térfogatának növekedésével vezet agnyomás fokozódáshoz, mely következtében alakul ki a fejfájás, hányinger vagy hányás. Előrehaladott esetben a beékelődés veszélye is fenn áll [Fritz és mtsai, 2016].

Végül a károsított agyterületnek megfelelően neurológiai kiesési tünetek jelentkezhetnek, mint végtagbénulások, beszédzavar, személyiségváltozás és kognitív zavarok. A betegség lefolyását erősen befolyásolja az, hogy mely agyterületek érintettek, milyen életkorú a beteg, és milyen súlyosságú a klinikai érintettség a Karnofsky-skálán [Sizoo és mtsai, 2010].

A glioblastomára jellemző, hogy a központi idegrendszerben gyakorlatilag bárhol kialakulhat. Leggyakoribb előfordulása a hemiszfériumokban van, azon belül is leginkább a frontális lebenyben, valamivel kisebb eséllyel a temporális lebenyben [Simpson és mtsai, 1993], de gerincvelőben is leírták jelentkezését [Mallick és mtsai, 2015]. A kisagy érintettsége szintén viszonylag ritka [Hur és mtsai, 2008]. Egy nemrég készült magyar tanulmány nagyszámú glioblastomás beteg adatait vetette össze. Megállapították, hogy az összes általuk vizsgált beteg 56%-ában jelent meg a glioblastoma a frontális lebenyben, 28%-ában a temporális lebenyben, 12%-ában a parietális lebenyben, a fennmaradó 3%-ában pedig az okcipitális lebenyben. A kisagyban csak a betegek 1%-ában jelent meg a daganat [Murnyák és mtsai, 2013]. Érdeemes ugyanakkor megjegyezni, hogy a gyermekkori glioblastomára éppen az agytörzsi és kisagyi megjelenés (50% és 20%) az inkább jellemző, amelynek okát még vizsgálják [Gusnard, 1990; Milinkovic és mtsai, 2014]. Tanulmányunkba gyermekkori glioblastomát nem vettünk be, mert az eddigi adatok eltérő klinikai és molekuláris jellegzetességekre utalnak, mint a felnőttekre jellemző glioblastomák esetében [Suri és mtsai, 2009; Giunti és mtsai, 2014; Ryzhova és mtsai, 2015]. Az agyterületi lokalizáció és a túlélés közötti kapcsolatot számos tanulmány vizsgálta. Összességében a tumor különböző agyi lebenyekben való lokalizációja önmagában nem gyakorolt kifejezett hatást a túlélésre, primer felnőttkori glioblastoma esetén [Larjavaara és mtsai, 2007; Curran és mtsai, 1992; Jeremic és mtsai, 1994].

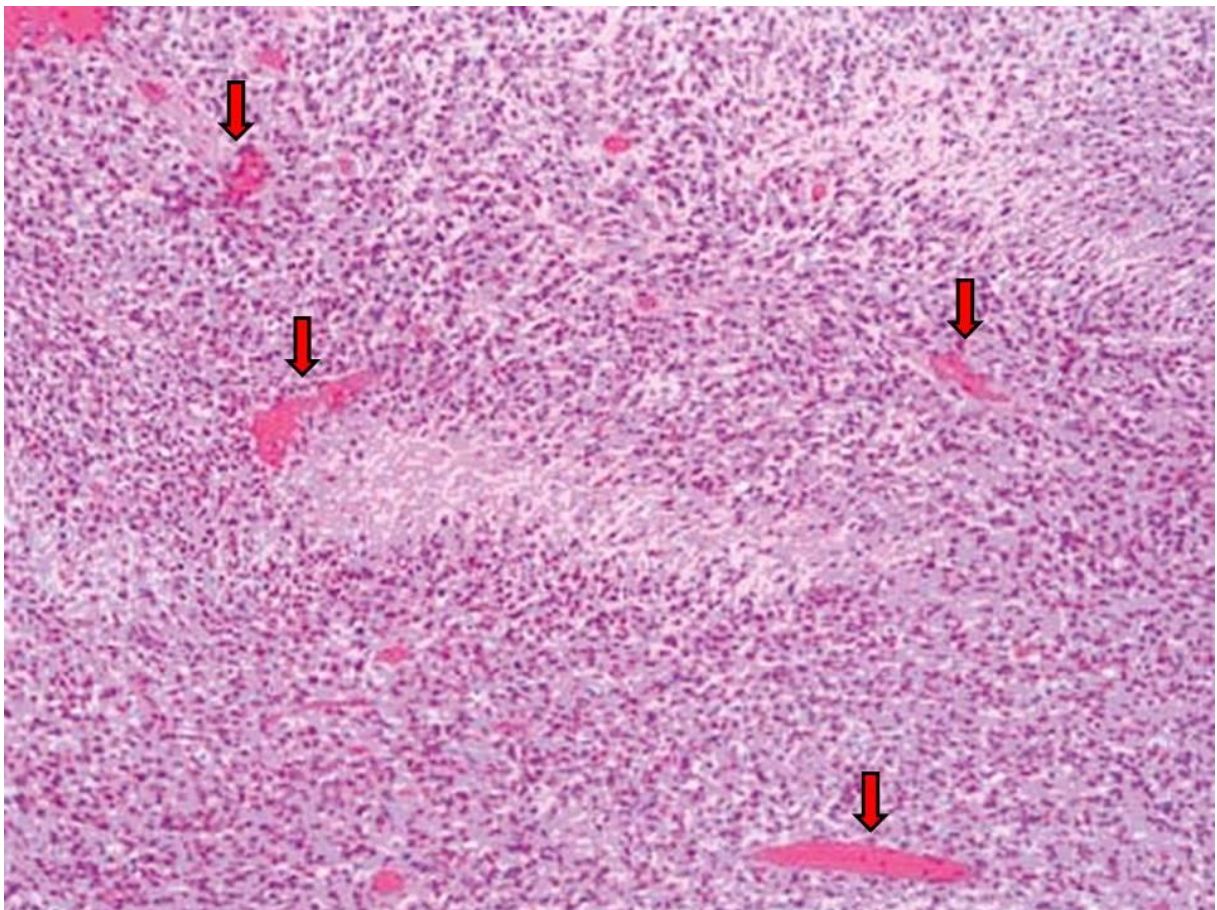
A glioblastoma a leggyakoribb rosszindulatú elsődleges agydaganat felnőttekben. Medián túlélése a műtéti reszekciót és sugárterápiát követően körülbelül egy év, az 5 évnél hosszabb túlélés pedig 5% alatti a gyorsan fejlődő terápiás lehetőségek ellenére is [Walker és mtsai, 1980; Laperriere és mtsai, 2002]. 2005-ben Stupp és munkatársai publikálták a sugárterápiával kombinált temozolomid (TMZ) alapú kemoterápia European Organisation of Research and Treatment of Cancer (EORTC) 26981/22981-NCIC CE3 III-as fázisú prospektív, randomizált, multicentrikus klinikai vizsgálatának eredményeit. Azt találták, hogy az általuk javasolt, ma Stupp-protokollként ismert kezelés hatására a 12,3 hónapos medián túlélés 14,6 hónapra emelkedett, a 2 éves túlélés pedig 12%-ról 26%-ra emelkedett [Stupp és mtsai, 2005]. A Stupp protokoll az alábbiak szerint épül fel. A daganat lehető legteljesebb sebészi eltávolítását követően együttes sugár- és kemoterápia, majd kemo-monoterápia következik. Ez 6 héten keresztül 60 (30 X 2) Gray (Gy) sugárterápia adagolását jelenti, miközben 75mg/m² dózisú TMZ-t is beadnak szájon át a betegeknek. Ezt 4 hetes terápiás szünet követi, majd újabb 6 ciklus TMZ-monoterápia következik. Ennek első

ciklusában a TMZ-t $150\text{mg}/\text{m}^2$ dózisban 5 napon keresztül kapják a betegek, majd a többi 5 ciklusban $200\text{mg}/\text{m}^2$ koncentrációt 28 naponta [Stupp és mtsai, 2005; Stupp és mtsai, 2009]. A kombinált kezelést az onkológia átvette így ma a glioblastoma általánosan bevett terápiája a teljes sebészi eltávolítást, sugárkezelést és kemoterápiát jelenti. A kemoterápiát elsősorban az alkiláló temozolomidra alapozzák. A túlélést befolyásoló számos tényező közé tartozik a beteg kora, neme, a tumor elhelyezkedése és mérete, az eltávolítás lehetséges maximális kiterjedtsége, a tumor molekuláris biológiai, genetikai tulajdonságai, a terápiát adó kórház országa, valamint a glioblastoma őssejtek jelenléte és a tumor mikro környezeti sajátosságai is [Griguer és mtsai, 2011].

Magyarországon a glioblastoma terápiájával kapcsolatos irányadó dokumentum az Egészségügyi Minisztérium szakmai protokollja az idegrendszeri daganatok eltávolításáról [Sugárterápiás és Onkológiai Szakmai Kollégium, 2009]. Eszerint Magyarországon az EORT/NCIC által 2005-ben közreadott, kooperációval létrehozott teszt sorozat eredményein alapuló terápia követendő. Fontos hozzátenni azonban, hogy a protokoll végrehajtásának több előfeltétele is van. Ilyenek például a betegek fizikai állapota, a tumorok biológiai tulajdonságai, a daganatok operabilitása, stb. Mindezt modern képalkotó és sugárterápiás eszközök segítik. Mindez a közeljövőben a 2005-ös ajánlás revízióját teheti szükségessé. Eszerint fokális radioterápia alkalmazásával egyidejűleg 30×2 Gy sugárterápia alkalmazandó. A kemoterápia $75 \text{ mg}/\text{m}^2$ temozolomid/nap szájon át történő adagolásával történik 42 napon keresztül. Ezt az első ciklust követően $1500\text{-}200 \text{ mg}/\text{m}^2$ temozolomid/nap per os $5 \times$, 28 naponként 6 cikluson keresztül ismételve. Amíg a kezeléssorozat tart, a betegeket *Pneumocystis carinii* fertőzésre vizsgálni kell, ennek megelőzése kulcsfontosságú, valamint a páciensek rendszeres vérképelemzésen is átesnek. Azoknál a betegeknél, akik számára a standard kezelés nem adható (rezisztens daganatok, recidívák, rossz Karnofsky-index), alternatív terápiák teszik ki a bevett protokollt. Eszerint temozolomid monoterápia, (bisz-kloroetil-nitrozourea) BCNU monoterápia, vagy akár cispatin és BCNU ko-monoterápia közül lehet választani. A temozolomid monoterápia első körben $150 \text{ mg}/\text{m}^2$ szájon át adagolást jelent 5 napon át, majd 23 napos szünet után további 5 ciklus következik $200 \text{ mg}/\text{m}^2$ 5-5 napig, köztük 23 napos szünetekkel. A BCNU monoterápia az ajánlás szerint $250 \text{ mg}/\text{m}^2$ BCNU intravénás adagolást jelent, majd 41 napos pihenőidő után további 6 ciklusban mindez megismételve [Sugárterápiás és Onkológiai Szakmai Kollégium, 2010].

2.2. A glioblastoma szövettani jellemzői

A WHO 2007 óta szövettani jellegzetességeik szerint négy grádusba osztja a gliomákat (grade I-IV). A glioblastoma a leggyakoribb és legmagasabb grádusú glioma, melyet nagyfokú inter-, valamint intratumor heterogenitás jellemez. Annak ellenére, hogy gyakran körülírtnak tűnik a „magnetic resonance imaging” (MRI) képeken, a daganatsejtek a normális agysejtek közé infiltrálva terjednek és jóval nagyobb anatómiai távolságokba is eljutnak, mint amit a felvételeken láthatunk. Az anaplasztikus tumorsejtek a differenciáltság különböző fokait mutatják és megjelenésük nagyon változatos. A tumor maga erősen inhomogén, helyenként kifejezett nekrozisokkal és aktív érújdonképződés jeleivel.



1. Ábra – A glioblastoma szövettani képe 1:100-as nagyításon - Haematoxylin-Eosin festés
Jól láthatóak a glioblastomára jellemző szövettani elváltozások: a kép közepén egy paliszád nekrozis látszik, de jól látható az erős cellularitás és pleomorfizmus, valamint a glomerulus szerű érbenövés-hálózat (piros nyilak) is.

A gliális elemek időnként neuroektodermális vagy mezenhimális elemekkel is keveredhetnek [Prayson és mtsai, 2009; Kálmán és mtsai, 2013]. A tumorban előforduló glioblastoma összejték a daganat növekedési tulajdonságainak és a gyógyszer/sugár rezisztencia kialakulásának létrejöttében kulcsszerepet játszanak [Dunn és mtsai, 2012]. Az elsődleges glioblastoma a normális gliasejték magas fokú malignus átalakulásával, transzformációjával fejlődik ki. Ezek az esetek a glioblastomák 90-95%-t adják. A másodlagos glioblastoma az alacsonyabb malignitású gliomák fokozatos transzformációja során alakul ki.

A glioblastoma szövettani képében esetenként látni lehet a régen primitív neuroektodermális tumornak (PNET) nevezett, a WHO osztályozás 2016-os revíziója óta a medulloblastomán kívüli embrionális tumorok közé sorolt elváltozásokra jellemző szövettani területeket [Louis és mtsai, 2016]. A két tumor keveredését többen leírták [Forbes és mtsai, 2016; Georgiu és mtsai, 2015]. Az embrionális tumorok maguk is gyakran magas malignitásúak és rossz prognózissal társulnak [Zhang és mtsai, 2016]. Agyi elhelyezkedésük éppen olyan változatos, mint a glioblastomáé, de nem korlátozódik a koponyaűrré [Koestner és mtsai, 2002; Louis és mtsai, 2007].

A glioblastoma szövettani képe nagyfokú heterogenitás, inhomogenitás jellemző. Burger és Green 1987-ben 71 glioblastomás beteg agydaganatának szövettani elemzését és az eredmények összehasonlítását végezték el. Úttörő munkásságuk kiválóan összefoglalja a glioblastomára jellemző leggyakoribb szövettani tulajdonságokat. A tanulmány szerint a glioblastomát az esetenként nagy területekre kiterjedő nekrozisok megjelenése, valamint az erek kifejezett proliferációja, a tumorba való benövésük jellemzi. Bizonyos esetekben kalcifikáció is történik. Mikrociszták jelenhetnek meg, melyek az egész szöveti képet uralhatják. Perivaszkuláris limfociták előfordulnak. A daganatsejték a mitózis különböző fázisában lehetnek. Ennek megfelelően a szövetet nagyfokú cellularitás jellemzi a normális, fiziológiás állapothoz képest. A sejtek formája jelentősen eltérő lehet. Egyes daganatokra a számos apró, kerekded sejt megjelenése jellemző, míg más daganatokra a nagy, több magvú óriássejték. Bizonyos esetekben gemisztocitákat is leírtak. A sejtes állomány tulajdonságai alapján tovább lehet osztani a szövettani képet. A glioblastomák szövettani heterogenitását tükrözi, bár nem széleskörben használt a javasolt 8 altípus elkülönítése [Burger és Green, 1987]:

I. Fibrilláris asztrocitás daganat, melyre kis és közepes méretű sejtek jellemzőek, kevés, vagy közepes mennyiségű eozinofil citoplazmával. Számuk változó, nukleárisan hiperkromatizmus jellemzi őket.

II. Gemisztocitás asztrocitás glioblastoma, melyet sok egyforma sejttel, üveges (hyaloplazma) citoplazma állománnyal és a sejtek szélére szorított sejtmagvakkal jellemeztek. Hiperkromatizmust is leírtak ennél a csoportnál.

III. A pleomorf asztrocitás glioblastoma esetében sötétebb, nagyobb sejtmagokkal, eozinofil citoplazmával telt sejtek láthatóak. Gemisztociták itt is előfordulnak, de ritkábban, mint az előző csoport esetén.

IV. A nagy fibrilláris sejtes glioblastoma esetében nagy és pleomorf magok látszanak bipolaris és többnyire amorf sejtfarmákkal.

V. A kis fibrilláris sejtes glioblastomára a kis, anaplasztikus sejtek megléte jellemző, gyakran változó sejtsűrűség és területi inhomogenitás jellemzi.

VI. A kis, anaplasztikus glioblastoma tumorokra az apró, kerek formájú sejtmagvak jellemzők, amelyek sötét színűek a haematoxylin-eosin festett lemezeken. A citoplazma sok esetben egyáltalán nem is látható. A sejtek mérete jellemzően egy adott mérettartományon belül marad, nincsenek kiugróan apró, vagy nagy sejtek.

VII. A nagy anaplasztikus sejtes glioblastomákban a kisebb méretű anaplasztikus sejtek mellett nagyobb méretű anaplasztikus óriássejtek is találhatóak. Ezek az óriássejtek erősen festődő kromatinnal és akár több sejtmaggal is rendelkeznek.

VIII. A nagy bizarr sejtes glioblastomákban nagyméretű, több-magvú, szabálytalan alakú sejtek fordulnak elő nagy számban. Jellemző rájuk az erős magfestődés és az erősen eozinofil citoplazma [Burger és Green, 1987].

A glioblastoma diagnosztikai meghatározása immunhisztokémiai módszerekkel a legtöbb kórházban kivitelezhető. Ennek segítségével identifikálni lehet a daganatot és pontos diagnózist lehet felállítani. Mivel nincs egységes ajánlás, az immunhisztokémiai markerek felhasználása gyakorlatilag kórház (és így anyagi forrás) függő, azonban vannak olyan alap megközelítések, amelyekről sehol sem térnek el. Ilyen festések az alap haematoxylin-eosin, a gliális fibrilláris savas protein (GFAP), proliferációs marker index (Ki67), valamint 2016 óta a WHO ajánlása alapján az izocitrát dehidrogenáz 1 IDH-1 státusz ellenőrzés [Louis és mtsai, 2016]. Ezen kívül esetenként alkalmazhatnak retikulin-impregnáció, oil red O, valamint kis molekulású kalciumkötő protein (S100) immunhisztokémiai festést is. Ezen kívül egyre inkább terjed a molekuláris markerek bevonása a klinikai rutin hisztológiai diagnosztikába is,

melyek tovább finomíthatják a diagnózist. Ilyen markerek például a celluláris tumor antigén p53 (p53), X-kromoszómához kapcsolt alfa-talasszémia/mentális retardáció szindróma gén (ATRX), „Cluster of Differentiation 133”, másnéven prominin-1 (CD133), vagy az epidermális növekedési faktor receptor (EGFR) és gyakori mutánsa, az EGFRvIII molekula tesztelése.

2.3. A glioblastoma patomechanizmusa

2.3.1 Vérellátás, hypoxia

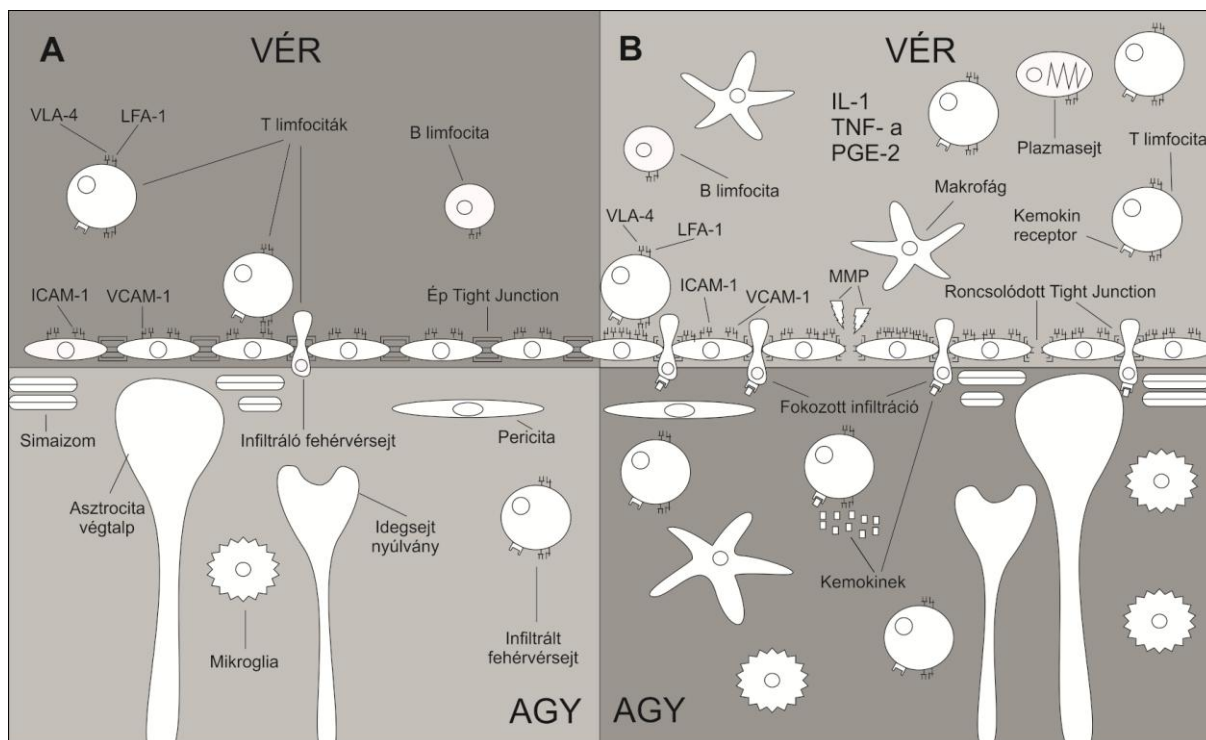
A tumor növekedése elégtelen vérellátáshoz és így hypoxiához vezet a daganat mikrokörnyezetében. A hypoxia hatására a daganat centrális területén – ahol a legrosszabb a vérellátottság – emiatt nekrotikus területek alakulnak ki. Saját vérellátásának fokozására ezért a glioblastoma indukálja mikrokörnyezetében az angiogenezist. A hypoxia szabályozó gének, mint például a hypoxia indukáló faktor 1 (HIF-1), a tumor nekrosis faktor alfa (TNF- α), a cink ujj protein 39 (ZNF39), az Abelson Interactor család 3-as tagja (ABI3), az abi3 kötő interakciós protein 3 (AIP3) és a mieloid sejteken expresszálandó aktiváló receptor 1 („triggering receptor expressed on myeloid cells 1”, TREM1) is aktiválódnak. Ezek a génexpressziós mintázatok nagyban hozzájárulnak a gyulladásos reakciókhoz [Murat és mtsai, 2009]. A tumor környezetében egy gyulladásos mikrokörnyezet alakul ki, számos immunológiai mechanizmust befolyásolva. A hypoxiát szabályozó géneknek ez a megváltozott kifejeződési mintázata is nagymértékben hozzájárul a glioblastomára jellemző oxidatív glikolízishez [ld. 2.2.3 fejezet alább, Nagy és mtsai, 2014]. A szomatikus mutációk okozta neoantigének mellett a hypoxiás és nekrotikus területek is hozzájárulnak gyulladásos folyamatok, és az immun infiltráció kialakulásához. A beszivárgó makrofágok immunológiailag aktívak, TNF- α -t és vaszkuláris endoteliális növekedési faktort (VEGF) termelnek, amely fokozza az érzépeződést a tumor szövetébe, elősegítve a glioblastoma invázióját [Stix, 2007].

Az agyszövetbe infiltráló immunsejtek jelenléte egészen a XX. század végéig nehezen értelmezhető eseménynek számított. A vér-agy gát szerepe az, hogy gyakorlatilag kiemelve az agyat a szervezet többi részétől és immunológiailag egy viszonylagos izolált területet hozzon létre. Ez nem egyedi jelenség, többek között a szemgolyók és a méhlepény is hasonló immunprivilegiummal rendelkeznek. Az utóbbi években végzett vizsgálatok azonban

rámutattak, hogy az immunológiai privilégium részleges, immunsejtek bejuthatnak a központi idegrendszerbe (KIR), és onnan ki és jutnak, mivel az agynak is van nyirok elvezetése a nyaki nyirokcsomók irányába [Goldmann és mtsai, 2006]. A kijutott antigén prezentáló sejtek a perifériás immunszervekben tumor-specifikus adaptív immunválaszt válthatnak ki, amelynek így aktivált T és B sejtjei a központi idegrendszerbe visszaléphetnek. Hogy miért nem hatékony az immunrendszer aktiválása a glioblastoma ellen, és a tumor milyen mechanizmusok útján blokkolja az immunsejtek hatásait, intenzív kutatás tárgya, amelyet két tanulmányban foglaltunk össze [ld. Eder és Kalman, 2015; Nagy és mtsai 2016]. A jelen disszertáció eltérő témája miatt ezen immun-blokkoló glioblastoma mechanizmusok nem kerülnek itt részletes tárgyalásra.

2.3.2 Vér-agy gát

A vér-agy gát a glioblastomára jellemző patológiás elváltozások következtében fokozottan átjárhatóvá válik az immunrendszer sejtjes elemei számára. Maga a vér-agy gát fiziológias körülmények között nem, vagy csak alig átjárható az immunrendszer sejtjei számára. Patológiásan viszont a vérben keringő aktivált immunsejtek, valamint magának az agyszövetnek a patológiás változásai (megnövekedett sejtadhéziós és chemoattraktáns molekula expresszió) révén fokozottan átjárhatóvá válik (2. Ábra). Az immunsejtek felszínén megjelenő VLA-4 és LFA-1 molekulák az endotélsejteken kifejeződő vaszkuláris sejtadhéziós molekula 1 (VCAM-1) és intercelluláris sejtadhéziós molekula 1 (ICAM-1) molekulákhoz kötődnek. A mátrix-metalloproteinázok révén az aktivált immunsejtek átjutnak a vér-agy gáton. Ezek az aktív immunsejtek a helyi immunrendszer elemeket (mikroglia) aktiválják. A glioblastoma aktív érzékelése eleve károsítja a vér-agy gátat, amely így lényegesen könnyebben átjárhatóbb, mint fiziológiasan (Nagy és mtsai, 2016). Ezzel összefüggésben számos tanulmány készült, amely az immun infiltráció és a túlélés közötti korrelációkat vizsgálta [Berghoff és mtsai, 2014; Bottino és mtsai, 2014; Navarro és mtsai, 2014].



2. Ábra –A vér-agy gát felépítése és működése fiziológias A) és patológiás B) állapotban.

A) Az endotélsejtek felszínén alacsony szinten fejeződnek ki az adhéziós molekulák (pl. ICAM-1 és a VCAM-1), a tight-junction kapcsolatok épek, és a keringő immunsejtek nyugalmi állapotban vannak.

B) A vér-agy gát patológiás állapotban. Az aktivált immunsejtek fokozottan expresszálják az adhéziós molekulák ligandjait, valamint a kemokin és citokin receptorokat, és matrix-metalloproteinázt termelnek. A mátrix-metalloproteinázok segítségével az aktivált immunsejtek lebontják a vér-agy gát részét képező szöveti mátrixot és a tigh-junction kapcsolatot átjárhatóvá teszik, így segítve az aktivált immunsejtek endotélsejtek közti penetrációját az agyba. A fokozott infiltrációt kísérő kemokin termeléssel az immunsejtek további immunrendszer elemeket aktiválnak és vonzanak környezetükbe.

2.3.3. A glioblastoma anyagcsere zavarai

A glioblastoma rendkívül komplex anyagcserezavarokkal jellemezhető. Mint valamennyi tumorsejtre, a glioblastomára is jellemző az oxidatív glikolízis, amit Warburg-effektusként ismer a tudomány. Az oxidatív glikolízis energiatermelése drámaian elmarad az oxidatív foszforiláció (OXPHOS) adenzin-trifoszfát (ATP) termelésétől. Előbbi ugyanis mindössze 2db ATP molekula felszabadulásával jár, míg utóbbi esetében 32 ATP keletkezik [Warburg és mtsai, 1926; Hsu és mtsai, 2008; Heiden és mtsai, 2009, Nagy és mtsai, 2015].

A glioblastoma metabolikus zavaraihoz a szomatikus mutációk nagymértékben hozzájárulnak. A tumorsejtek nukleáris és mitokondriális genomjában idővel számos mutáció halmozódik fel, amelyek közül nagyon sok az anyagcsere útvonalakat érinti. Számos mitokondriális DNS (mtDNS) mutáció negatívan befolyásolja az OXPHOS folyamatát és ez által a sejt energia metabolizmusát. Hasonló OXPHOS károsodáshoz vezethetnek a mitokondriális proteinek nukleárisan kódolt génjeiben kialakuló mutációk (Nagy és mtsai, 2015).

A mitokondriális proteinek érintő mutációk közül kiemelt érdemel a citokróm-C oxidáz enzim génjét érintő mutációk, melyek az enzim aktivitásának megnövekedését okozzák a glioblastomában. A citokróm-C oxidáz enzimfelelős az anyagcsere-kapcsolásért az OXPHOS és a glikolízis között. Megfigyelték, hogy azok a betegek, akiknél a glioblastoma fokozott citokróm-C oxidáz enzim aktivitást mutatott, rosszabb prognózisnak néztek elébe, mint azok, akiknél ez az enzim a normál aktivitási mintázatba illeszkedett [Griguer és mtsai, 2013].

Emellett a nukleáris gén mutációk gyakran olyan enzimeket érintenek, amelyek direkt módon változtatják meg a sejt anyagcsere folyamatait [Nagy és mtsai, 2015]. Az egyik ilyen fontos mutáció az IDH-1 enzimet érinti. Az IDH-1 izocitromsavból szén-dioxid és alfa-ketoglutarát képződését katalizálja. A folyamat révén egy nikotinsavamid-adenin-dinukleotid (NAD^+) molekula pedig NADH-vá alakul át. Fontos megjegyezni, hogy a reakció visszafordíthatatlan. Glioblastoma esetén az *IDH-1* génben leggyakrabban az R132H pozícióban alakul ki mutáció, melynek következményeként az átíródó fehérjében egy arginin-hisztidin csere történik. A fiziológiás R132H kodon szekvencia a „CGT”, ehelyett azonban leggyakrabban „CAT” jelenik meg, mely aminosavcserehez vezet. Röviden, az R132H mutáció esetében az IDH-1 enzim nem képes ellátni a feladatát, hanem felhalmozódik egy, az alfa-ketoglutaráttól eltérő termék, a 2-D-hidroxi-glutarát, míg az alfa-ketoglutarát koncentrációja lecsökken. Az ilyen IDH-1 mutációt hordozó tumorsejtek nagyon érzékenyek az oxidatív stresszre, hajlamosak fokozott angiogenezisre, és komplex epigenetikai mechanizmusok révén jellegzetes gén expressziós mintázatokat mutatnak [Yan és mtsai, 2009]. A 2-D-hidroxi-glutarát egy onkometabolit, amely számos abnormalitás kiváltásában játszik szerepet. Ilyen például a glioma CpG sziget metilátor fenotípus (G-CIMP) kialakulása. Ennek oka az, hogy a 2-D-hidroxi-glutarát az α -ketoglutarát függő enzimek kompetitív inhibitora, hiszen strukturálisan ahhoz egészen hasonló, de annak funkcióját betölteni képtelen. Ráadásul az α -ketoglutarát függő enzimek családja kiterjedt és számos biológiai funkcióban vesznek részt. Ilyen

folyamatok például a karnitin szintézis, a hypoxia érzékelési kaszkád tagjainak expressziója, a kollagének oxidációja, az inzulátor régiók kialakítása, valamint a hiszton és DNS metilációs mintázat kialakítása. Ezek a folyamatok mind sérülnek az α -ketoglutarát koncentráció szintjének csökkenése és a 2-D-hidroxi-glutarát megnövekedése révén. Összességében kijelenthető tehát, hogy a 2-D-hidroxi-glutarát epigenetikailag, fehérje expressziós szinten, valamint metabolikusan is befolyásolja a tumor biológiai viselkedését [Venneti és mtsai, 2013; Flavahan és mtsai, 2016, Fathi és mtsai, 2016, Nagy és mtsai, 2015].

Az IDH mutációk ezen kívül hozzájárulnak további aberrációkhoz is, mint például a hematopoetikus progenitorok számának megnövekedéséhez a tumor környezetében. Ezzel együtt a periférián, a csontvelőállományban fokozott hematopoiezis indul meg. Ennek ellenére, a betegben anaemiás állapot állhat be. A glioblastoma által kiváltott hematopoiezis és anémia kapcsolatában részt vevő folyamatok biológiai hátterének megértésére napjainkban is több tanulmány folyik [Sasaki és mtsai, 2012].

Az IDH-2 (izocitrát-dehidrogenáz-2) enzim mutációi szintén kórosan befolyásolják a tumor sejtek anyagcsere folyamatait. Az IDH-2 enzimre szintén pontmutációk jellemzőek. Ezeket a leggyakoribb mutációkat az R172G, R172K és R172M pozíciókban találjuk (Yan és mtsai, 2009). Az IDH-2 abnormális működése jelentősen hozzájárul a 2-D-hidroxiglutarát felhalmozódásához. Az IDH-1 és IDH-2 mutációk glioblastomában rendszerint együtt fordulnak elő, gyakran IDH-3 mutációk kíséretében [Krell és mtsai, 2011].

További tumorokra jellemző anyagcsere zavarokat okoznak a piruvát kináz enzim M izoformáját (PKM) érintő mutációk. Az enzim szerepe a foszfo-enol-piruvát (PEP) konvertálása piruváttá [Mazurek és mtsai, 2001; Mazurek és mtsai, 1997; Parkésmtsai, 2014]. A mutáns PKM enzim működése révén a cukorlebontás folyamata, a glikolízis jelentősen lelassul, számos intermedier termék pedig felhalmozódik, amelyek elősegítik a tumor sejtek proliferációját, és nukleotid valamint aminosav szintézist generálnak [Wolf és mtsai, 2010]. A jövőben egy fontos terápiás célpont lehet, az onkológia mostanság kezdi felismerni a PKM-en alapuló terápiában rejlő lehetőségeket [Sutendra és mtsai, 2013, Nagy és mtsai, 2015].

Szintén súlyos anyagcserezavarokat okozhat a piruvát-dehidrogenáz-kináz-1 (PDK-1) enzim gén mutációi és működési zavarai. Mint korábban ismertettük, a glioblastoma patológiájához hozzátartozik a hypoxiás állapot beállta. Ez fokozza a HIF-1 α , PDK-1 és EGFR expresszióját.

Ezek a faktorok ráadásul egymást is szabályozzák. Az anyagcsere folyamatokat mindez az oxidatív glikolízis irányába tolja el [Velpula és mtsai, 2013, Nagy és mtsai, 2015].

2.4. A glioblastoma molekuláris genetikai jellegzetességei

A glioblastoma molekuláris genetikai jellemzése jelentős előrelépést jelentett a daganat biológiai megértésében. A TCGA teljes genom, transzkriptom és epigenom szintű analízisei, továbbá ezeknek összehangolt értékelései feltárták a glioblastoma molekuláris diverzitását, és jól elkülöníthető molekuláris alcsoportok létezésére mutattak rá [The Cancer Genome Atlas Network, 2008; Verhaak és mtsai, 2010]. Ezek alapján a glioblastomákat négy, egymástól élesen teljes mértékben el nem választható molekuláris alcsoportra, klaszterre bontották, amelyek a neurális, proneurális, klasszikus és mezenhimális neveket kapták. Maguk az alcsoportok összefüggést mutattak a daganatok biológiai és klinikai viselkedésével. Hogy az OMICS eredmények hogyan ültethetőek át a klinikai gyakorlatba és melyik molekuláris markerek lehetnek diagnosztikus szempontból is fontosak, ma még vizsgálatok tárgyát képezik. Colman és munkatársai 2010-ben microarray elemzéseket végeztek, eredményeik alapján pedig egy 38 markeres panelt ajánlottak, amely a mindennapi gyakorlatban tovább szűkíthető lenne egy 9 markert tartalmazó tesztpanelre [Colman és mtsai, 2010]. Le Mercier és munkatársai [Le Mercier és mtsai, 2012] csupán három molekuláris marker, az EGFR, a p53 proteinek, valamint a vérlemezke növekedési faktor receptor (PDGFR) mennyiségi immunhisztokémiai (IHC) tesztelésével elkülönítették a glioblastoma molekuláris alcsoportjait. Vizsgálataikat a patológiában is rutinszerűen használt formalin fixált, paraffinba ágyazott (FFPE) tumor metszeteken végezték. A közelmúltban nemzetközi szakértők egy csoportja az International Neuropathology Society védnöksége alatt kidolgozott egy „consensus guideline”-t a gliomák molekuláris és klinikai-szövettani adatainak összekapcsolására, amely a korábbi szövettani módszereken alapuló WHO osztályozás revíziójához vezetett molekuláris markerek beépítésével [Louis és mtsai, 2016)].

A glioblastomában felhalmozódó szomatikus mutációk első átfogó, genom szintű vizsgálatát és katalogizálását a TCGA végezte el. A TCGA és Verhaak és munkatársai munkái alapján a glioblastoma molekuláris osztályozása széleskörű elfogadást nyert, a klinikai gyakorlatban azonban még nem talált alkalmazásra [The Cancer Genome Atlas Network, 2008; Verhaak és mtsai, 2010]. Az 1. táblázatban kiemeltük azokat a markereket, melyek a TCGA által javasolt

alcsoportok meghatározásában kulcs-fontosságúnak bizonyultak, és rutin patológiai laborokban is tesztelhetőeknek látszanak.

Markerek	Klasszikus	Mezenhimális	Proneurális	Neurális
EGFR exp↑	>90%	>90%	50%	>90%
EGFR exp↑↑↑	95%	50%	17%	50%
EGFRvIII	Gyakori	Ritka	Ritka	Nem jellemző
TP53 mutáció	Nem jellemző	Nem jellemző	Gyakori	Nem jellemző
NF1 mut	Ritka	Gyakori	Ritka	Ritka
17q del -	Ritka	38%	Ritka	Ritka
NF1 exp↓↓↓				
PTEN exp↓↓↓	100%	100%	Nem jellemző	100%
PDGFR exp↑↑↑	Ritka	Ritka	35%	Ritka
IDH-1 mutáció	Nem jellemző	Nem jellemző	Gyakori	Nem jellemző
RB1 exp↓↓↓	Ritka	50%	50%	50%

1. Táblázat – A GBM alcsoportok néhány jellegzetes genetikai markere

A táblázat összefoglalja a TCGA által leírt négy gbm molekuláris alcsoport legjellemzőbb molekuláris genetikai abnormalitását. A molekuláris mintázatok hierarchikus klaszter elemzéssel történő vizsgálata igazolta az alcsoportok elkülönülését, de részleges átfedésekkel. A nyilak az adott marker expressziós szintjének változásait, valamint a változás mértékét jelölik. (A táblázatot Verhaak és munkatársai 2010-es munkája nyomán készítettük.)

Ezen markerek közül, munkánk során különös jelentőséget nyert az EGFR / EGFRvIII mutáns, az IDH-1 R132H mutáns és a neurofibromin molekula.

2.4.1 Az IDH-1 R132H mutáció és szerepe

Az IDH-1 R132H mutáció szerepét a 2.3.3 fejezetben részleteztük.

2.4.2 Az EGFR mutációi és következményei a jelátvitelben

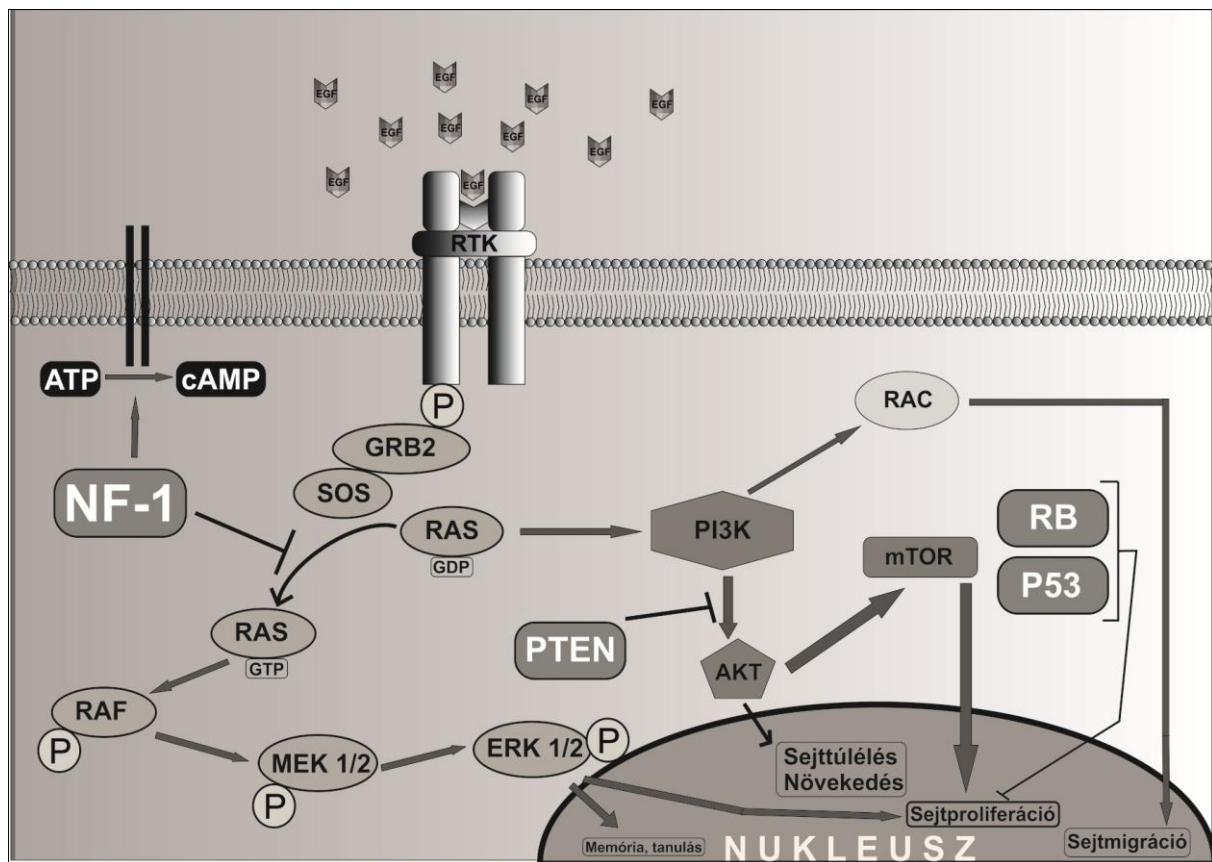
Az EGFR egy transzmembrán receptor, amely három fő domainből áll: egy cisztein-gazdag extracelluláris, egy transzmembrán, valamint egy fő intracelluláris domainből (ennek részei a kináz domain, az internalizációs domain, valamint a citoplazmatikus domain) [Herbst, 2004].

Egyéb elnevezései is használatosak: ErbB-1, HER-1, melyek az EGFR receptor család első tagját reprezentálják. 1986-ban Stanley Cohen Nobel-díjat kapott a felfedezéséért. A receptor több ligandum kapcsolásával is aktiválódhat, ami így számos jelátviteli kaszkád aktivációjához vezet. Ligandumai többek között az epidermal growth factor (EGF) növekedési faktor és a transzformáló növekedési faktor-alfa ($TGF\alpha$). A receptor-ligand kapcsolat létrejöttkor a receptor konformációs átalakuláson megy keresztül. Az eredetileg monomer alegységek homodimerekké alakulnak, így veszik fel a konformációsán aktív állapotot. A receptor-ligand kötést követően a monomerek az ErbB receptor család bármely másik tagjával is létesíthetnek úgynevezett heterodimereket. A dimerizáció elindítja az intracelluláris protein-kináz aktivitást, amely az EGFR C-terminális domainjén lévő tirozin molekulákat autofoszforilálja. Ez a folyamat további downstream kaszkádokat aktivál. A legfontosabb jelátviteli útvonalak a mitogén aktivált protein kináz (MAP-kináz) útvonal (RAS-RAF-MEK-ERK), az Akt útvonal, valamint a JNK útvonal. Ezek aktiválása DNS szintézishez és sejt proliferációhoz vezetnek. Az EGFR közvetett módon hozzájárul a sejtek migrációjához, adhéziójához is [Zhang és mtsai, 2007; Yarden és mtsai, 1987; Downward és mtsai, 1984, Oda és mtsai, 2005].

A glioblastoma molekuláris abnormalitásai közül említendők az EGFR génexpressziós és mutációs variánsai, amelyeket biológiai és terápiás jelentőségük miatt egy összefoglaló publikációban korábban bemutattunk [Kálmán és mtsai, 2013]. Olyan különböző EGFR mutációs variánsok jelenhetnek meg a glioblastomában, mint génamplifikációk és deléciók (copy number variations – CNV), és inszerciók vagy missense mutációk. A glioblastomák körülbelül egyharmadában megjelenő EGFRvIII mutáns az azt kódoló gén 2-7 exonjának deléciójával jön létre, mely a receptor extracelluláris domainjét érinti. Az EGFRvIII egy konstitucionálisan aktív receptor, amely ligandum hozzákötődése nélkül is képes jelátvitelt közvetíteni, ami által fokozza a sejt proliferációt, egyes géncsoportok átírását és jelentősen csökkenti az apoptotikus folyamatok hatékonyságát. A mutációt hordozó sejteket jellemzi a fokozott vándorlás és a metasztatikus képesség. Ezek révén az EGFRvIII egy kiemelkedő terápiás célpontnak látszik [Kálmán és mtsai, 2013; Hegi és mtsai, 2012].

2.4.3 Tumor szuppresszor molekulák

Az EGFR jelátviteli útvonal egyik legfontosabb negatív regulátora a neurofibromin. A neurofibromin gátolja a RAS GDP-GTP foszforilációs transzformációjának interakcióját a RAF molekulával, míg a másik útvonalon a foszfát-tenzin homológ (PTEN) a foszfatidil inozitol 3 foszfát (PIP3) molekula foszforilációs továbblépését akadályozza. Ezek közül bármelyik tumorszuppresszor sérülése az EGFR útvonal pro-mitotikus egyensúly eltolódásához vezet [Nagy és mtsai, 2017; Lindberg és mtsai, 2016; Gupta és mtsai, 2010; Zadeh és mtsai, 2013].



3. Ábra – Az EGFR jelátviteli útvonal és az általunk vizsgált NF-1 tumorszuppresszor kapcsolata.

A neurofibromin fehérje gátolja a Ras-GDP/Ras-GTP átalakulást. Ezen keresztül negatívan szabályozza a sejtproliferációt, valamint a sejtülélést és a memória folyamatokat. Az NF-1 gén mutációi és deléciói a neurofibromin expresszió elvesztéséhez vezethet, ami a sejtbiológiát a pro-mitotikus irányba tolhatja el. A fehérje egy másik funkciója az ATP-cAMP átalakulás katalizálása.

A *neurofibromin-1* gén (*NF-1*) a 17q11.2-es kromoszóma régióon kódolódik. Ennek a régióonak a deléciója/mikrodeléciói 5-20%-ban jelennek meg [Kehrer-Sawatzki és mtsai, 2003]. Ezen kívül a glioblastomák körülbelül 6%-ában az *NF-1* gén mutációi meghatározóak. Ezen belül a mutációk megoszlása az alábbiak szerint alakul: 42,74% nonszensz mutáció, 24,19% misszensz mutáció, 20,16% frameshift deléció. A fennmaradó 12,9%-ban frameshift inszerciók és inframe deléciók jelennek meg. (Sanger adatbázis, 2017, Elérés dátuma: 2017.06.11.)

A neurofibromin fehérje legfontosabb funkciója a Ras/MAPK jelátviteli kaszkád negatív regulációja. A neurofibromin rendelkezik egy Ras-specifikus GTP-áz aktiváló protein (GAP) domainnel. Ezzel a domainnel képes kapcsolatba lépni a Ras fehérjével. A kapcsolat létrejöttének hatására a neurofibromin konformációja megváltozik, így fel tudja erősíteni a sejten belüli Ras protein GTP-áz aktivitását. Ez felgyorsítja az aktív GTP kötő Ras forma inaktív GDP kötő Ras formába való átalakulását. Ez a Rastól „downstream” negatív módon regulálja a jelátvitelt, így a teljes mitogén aktivitás nettó csökkenése következik be a sejtben. Mivel a Ras/MAPK útvonal kritikus fontosságú a sejtes növekedés és differenciálódás szabályozásában, a funkcionális neurofibromin hiánya ennek a központi jelátviteli útvonalnak a konstitutív aktivációját és ezáltal az érintett sejt fokozott növekedését okozza [Gutmann és mtsai, 2000].

A neurofibromin a szinapszisokkal az Adenozin-trifoszfát - Proteinkináz-A - ciklikus-Adenozin-monofoszfát (ATP-PKA-cAMP) útvonalon az adenil-cikláz modulálásán keresztül is kapcsolatban áll. Így mind közvetetten, mind közvetlenül a neurofibromin érintett a sejt növekedési válasz faktorok aktivitási mintázatának kialakításában [Trovó-Marqui és mtsai, 2006].

3. Hipotézisek, célkitűzések

A TCGA átfogó kutatási eredményeinek eddig korlátozott klinikai alkalmazása és az új típusú, molekuláris terápiás megközelítések felgyorsult fejlesztése készítetett az alábbi hipotézisek és célkitűzések felállítására. Azt reméljük, hogy munkánk a glioblastomás betegek jövőbeli kezelését szolgálhatja.

3.1. Hipotézisek

-A TCGA által fagyasztott glioblastoma minták OMICS vizsgálatainak elemzése nyomán felismert molekuláris alcsoportok a megfelelő markerek kiválasztásával reprodukálhatóak a klinikai formalin-fixált, parafinba ágyazott (FFPE) glioblastoma mintáink rutin molekuláris patológiai módszerekkel történő elemzésével.

-A molekuláris marker mintázatok alapján elkülönülő glioblastoma alcsoportok tükrözik a tumorok biológiai heterogenitását és korrelációt mutatnak a klinikai kimenetellel.

-A glioblastoma tumorok időbeli evolúciójuk során nagy vonalakban megőrzik molekuláris alcsoport besorolásukat, míg egyidejűleg azonban további klonális evolúciót is mutathatnak.

3.2. Célkitűzések

A fenti feltételezések bizonyítása érdekében célul tűztük ki, hogy:

-A Markusovszky Lajos Egyetemi Oktatókórház (MEOK) Patológia Osztályán 2000 és 2016 között összegyűlt FFPE glioblastoma mintákban megvizsgáljuk immunhisztokémiai (IHC) és piroszekvenálási módszerekkel a TCGA legfontosabb alcsoport-meghatározó markereit és a marker mintázatok alapján teszteljük a tumorok statisztikai elkülönülését.

-Az így nyert molekuláris alcsoportokkal korreláljuk a betegek klinikai adatait (kor, nem, teljes túlélés).

-Az időben többszörös mintavételű betegek alcsoportjában elemezzük a tumorok molekuláris profiljának változásait.

4. Anyag és módszer

Etikai nyilatkozat

Jelen értekezés az 1964-es Helsinkai Nyilatkozat 2008-as szövi revíziója alapján, és Magyarország 2014-es törvénykezése szerint, az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottságának és a MEOK helyi Etikai Bizottságának valamint Főigazgatójának jóváhagyása mellett készült el a MEOK Molekuláris Patológia rendelkezésére bocsátott és újonnan kialakított laborokban (Szombathely, Magyarország). Etikai döntések dokumentációja: az 56/2012 számú nyilatkozat, valamint az erre épülő 21/2014 és 28/2014 számú nyilatkozatok, továbbá a 025782-003/2014/OTIG ügyirat számú dokumentum. A vizsgálatok mintái a betegeken elvégzett műtét(ek) során szerzett, rutin patológiai vizsgálatokól visszamaradt művi terméknek minősülnek, melyeken további klinikai vizsgálatok és tesztek várhatóan nem történnek. A tanulmány része Prof. Dr. Kálmán Bernadette, MD, PhD, DSc, FAAN nagyobb glioblastoma irányultságú kutatóprogramjának.

4.1. Beteganyag

Kísérleti anyagunk a MEOK Patológia Osztályán 2000 és 2016 között összegyűjtött 112 betegől műtétek során eltávolított, patológiai feldolgozásból visszamaradt 127 FFPE glioblastoma blokkból került ki. A minták minősége, mennyisége alapján a tanulmányba ebből 104 beteg 114 mintája került be. A glioblastoma diagnózisa minden esetben határozott volt a klinikai és hisztológiai vizsgálatok alapján. A klinikai adatok gyűjtésének menetét a 4.6-os fejezetben részletesen ismertetjük. A retrospektív tanulmány beteganyagához 100%-ban rendelkezésre álltak a műtési életkor és nem adatok, 71%-ban (74fő) pedig a túlélési információk.

A vizsgálatokban részt vevő betegek közül 46 (44,23%) férfi és 58 (55,76%) nő. A betegek életkora 26 és 88 év között mozgott, együttes átlag életkoruk 61,01 év, medián életkoruk 63,5 év volt. A férfiak életkora 26 és 77 év között volt, átlag életkoruk 58,89 év, medián életkoruk 60 év, a nők életkora 32 és 88 év között szóródott, átlag életkoruk 61,69, medián életkoruk 65 év.

	Diagnózis glioblastoma		Nemek		Műtét típusa	
	Elsődleges glioblastoma	Másodlagos glioblastoma	Férfiak	Nők	Reszekció	Biopszia
Összes beteg	101	3	46	58	100	4
Első kohort	94	2	43	53	93	3
Második kohort	7	1	3	5	7	1

2.Táblázat - A betegek klinikai adatai

A tanulmányban részt vevő betegek megoszlása a két kohort szerint, valamint nemek és műtét típusa alapján. Jól látható, hogy a legtöbb gbm minta elsődleges tumorból származott, és csaknem valamennyit műtéti reszekcióval távolították el. A táblázat jól korrelál a nemzetközi adatokkal a primer és szekunder gbm megoszlásával kapcsolatban.

A beteganyagot két kohortra osztottuk (2. Táblázat). Az első kohortba azok a minták kerültek, amelyek azoktól a betegektől származtak, akikről csak egy minta állt rendelkezésre. Ezek a minták a diagnózist követő műtétekből származnak, kemoterápia és sugárkezelés előtt. A második kohortba pedig azok az anyagok kerültek, amelyek azokhoz a betegekhez tartoztak, akikről időben eltérő időpontokból kettő, vagy több anyag is rendelkezésre állt. Ezek közül a minták közül az első mindig az első műtétekből, sugár-, valamint kemoterápia előttről származnak, a többi minta a kezelést követő időszakokból származik. Az első kohortba 96 beteg 96 mintája, a második kohortba 8 beteg 18 mintája került. A multifokális glioblastoma anyagok az első kohortba kerültek. A beteganyag túlnyomó részét elsődleges glioblastoma adta (101 minta), de a vizsgálati anyag összesen 3db másodlagos glioblastomát is magába foglalt. Az első kohortba tartozó anyagok közül két betegnek volt multifokális glioblastomája, egyiküknél 3 góccal, másikuknál 2 góccal. A második kohortba tartozó 18 mintából 8 az első műtétekből nyert anyag, 10 a recidíva. Az első kohortba két másodlagos glioblastoma, a második kohortba egy másodlagos glioblastoma került.

4.2. Előtanulmányok

4.2.1. Immunhisztokémiai előtanulmányok

Az immunhisztokémiai tesztek minden elsődleges antitest esetében előtanulmányban állítottuk be. Ezek eredményei alapján pontosan meg tudtuk határozni az optimális feltárást és meg tudtuk állapítani, hogy az adott antitest specifikusan kötődik-e epitópjához, milyen hígítás mellett ad értékelhető és minél inkább háttérfestődéstől mentes eredményt; továbbá, hogy az általunk használt protokoll kompatibilis-e a gyártó által javasolt, valamint az irodalomban közzétett protokollokkal az érintett antitesteket illetően.

Az előtanulmányok lebonyolításához post-mortem FFPE blokkokat használtunk fel, melyek típusa három csoportba sorolható: Az egyik csoportban patológiás elváltozásoktól mentes, úgynevezett „normál” agyszöveteket festettünk meg. Ezek a minták az értékelési fázisba be nem vont, a glioblastoma által nem érintett agyterületekből (pl. ellenoldali hemiszfériumból) származtak. A második csoportban a tanulmány értékelésébe szintén be nem vont, de glioblastomás daganatként azonosított agyszövetekkel dolgoztunk, míg a harmadik csoportba oligodendrogliomás tumorként azonosított szöveteket használtunk. Etikai engedélyünk mindhárom csoportra kiterjedt (etikai döntési számok: 56/2012, 21/2014, 28/2014). A glioblastoma és oligodendroglioma diagnózist kapott daganatos minták expresszálták azokat a mutáns fehérjéket, amelyekkel a tanulmányunk során dolgoztunk. Az EGFRvIII mutáció gyakorisága az irodalmi adatok alapján körülbelül 30%-nak tűnt [Verhaak és mtsai, 2010], ezért 3 glioblastoma blokkot vontunk be előtanulmányunkba. Várakozásunknak megfelelően a három mintából az egyik immunhisztokémiailag pozitív EGFRvIII festődést mutatott. A neurofibromin IHC tesztelése szintén egy mintánál adott negativitást. Ennek előfordulási aránya is megfelelt az általunk választott mintaszámnak [Verhaak és mtsai, 2010]. Az IDH-1 R132H mutáció teszteléséhez oligodendroglioma agytumort használtunk. Az irodalom szerint ennek mutációs gyakorisága 70% körül mozog, így két oligodendroglioma közül az egyik valóban pozitív eredményt mutatott a mutáns IDH-1 expressziós immunhisztokémiai tesztben. A mutációk (EGFRvIII, IDH-1 R132H) valamennyi normál agyszöveti blokkban negatív eredményt adtak. A későbbiek során ezeket használtuk negatív kontrollként. Az előtanulmányba bevont szöveink összefoglalva az alábbiak szerint oszlottak meg: 3db glioblastoma, 2db oligodendroglioma, valamint 2db nem patológiás elváltozású, normál agyszöveti blokk. Tanulmányunk során nem csak tumorra jellemző antitesteket használtunk

(pl. EGFR^{vIII}, IDH1 R132H), hanem olyanokat is, amelyek bár gyakran eltérő módon, de a normál agyszövetben is expresszálódnak (pl. GFAP, NF1, EGFR, etc...). Így ezeket az antitesteket a normál agyszöveti mintákon állítottuk be. Ennek megfelelően a normál és tumoros agyszövetek IHC festődési mintázatai összevethetőek voltak.

Az előtanulmány anyagából HM400R Ser. Nr. 5028 (MICROM International GmbH, Walldorf, Németország) mikrotommal, Microtome Blade A35 (Feather®, Osaka, Japán) pengékkal 3µm-es metszeteket készítettünk, majd Superfrost Ultra Plus J3800AMNZ (Thermo Scientific®, Waltham, Massachusetts, Egyesült Államok) tárgylemezre vittük fel őket. A metszetkészítés az ajánlott módon történt. Az előtanulmány blokkjaiból az antitestek számának (8 különböző antitest) megfelelő számú mintát készítettünk, illetve további kettőt-kettőt tartalékként. A hígítási sor tesztelésére való figyelemmel összesen 50-50db metszetet készítettünk blokkjainkból.

Az elsődleges antitestek kötődését a Novolink Polymer Detection Systems RE-7140-K (Leica Biosystems, Newcastle, Egyesült Királyság) segítségével detektáltuk. Egér primer antitest esetén a kit másodlagos antitestjét is alkalmaztuk (anti-egér nyúl univerzális antitest), nyúl eredetű primer antitest esetén erre nem volt szükség. Ennek oka az előhívás során használt „Polymer” antitest, amely egy anti-nyúl egér antitest. Ezt diamino-benzidinnel (DAB) kezelve a primer antitest festődések láthatóvá válnak a tormaperoxidáz enzimreakció révén. Az antitestek festődését -, +, ++ és +++ kategóriákba osztottuk a festődés intenzitása szerint. Az antitesteket Tween20-tól mentes TBS pufferrel hígítottuk ki. Az antitesteket 1,5 milliliteres Eppendorf csövekbe mértük ki és hígítottuk az ajánlásoknak megfelelően, és 150µl hígított antitest/tárgylemez térfogattal számolva történtek a hígítások. A tárgylemezre felvitt szöveteket PAP PEN (22005 Biotium Inc. Fremont, Egyesült Államok) segítségével körberajzoltuk, amely eszköz paraffinos gyűrűt alkotott a tesztterület körül, hidrofób tulajdonságai révén a hígított antitestek nem folytak le a szövetek felületéről. A bevezető immunhisztokémiai vizsgálatok eredményeinek értékelését patológus bevonásával közösen végeztük. A tanulmány értékelési fázisába bekerült anyagokon a 3. táblázatban részletezett feltárással és a hígítási értékekkel dolgoztunk.

Antitest	Klonalitás	Gyártó cég	Ajánlott hígítás	Használt hígítás	Antigénfeltárás
GFAP	Monoclonalis (egér)	DAKO	1:50 - 1:100	1:100	5 perc, 96°C 0,01M citrátpuffer
NF-1	Polyclonalis (nyúl)	Abcam	1:300 - 1:500	1:300	5 perc, 96°C 0,01M citrátpuffer
EGFR	Monoclonalis (egér)	DAKO	1:25 - 1:50	1:35	3 perc proteináz-K emésztés
EGFRvIII	Polyclonalis (nyúl)	BIOSS	1:100 - 1:500	1:200	3 perc proteináz-K emésztés
P53	Monoclonalis (egér)	DAKO	1:25 - 1:50	1:40	5 perc, 96°C 0,01M citrátpuffer
ATRX	Polyclonalis (nyúl)	Sigma	1:500 - 1:1000	1:500	10 perc, 98°C 0,01M citrátpuffer
IDH-1	Monoclonalis (egér)	Dianova	1:20	1:40	5 perc, 96°C 0,01M citrátpuffer
CD133	Monoclonalis (egér)	Biorbyt	1:100 – 1:500	1:300	7 perc, 96°C 0,01M citrátpuffer

3. Táblázat -Az IHC előtanulmány eredményei

Balról jobbra haladva oszloponként: használt antitest, a használt antitestünk klonalitása, az antitest előállítója, az ajánlott hígítási mérték, az általunk használt hígítási érték, valamint jobb szélén az alkalmazott antigén feltárási folyamat mibenléte.

4.2.2. Piroszekvenálási előtanulmányok

4.2.2.1. Minták kiválasztása

Az anti-IDH-1R132H antitestünk működését piroszekvenálással erősítettük meg. A piroszekvenáláshoz FFPE blokkokból származó metszeteket használtunk. Ehhez az immunhisztokémiai tesztheink eredményeiből válogattunk biológiai anyagokat. Mintáinkból az immunhisztokémia alapján biztosan negatívnak ítélt anyagok közül kettőt, valamint a biztosan pozitívnak ítélték közül szintén kettőt kontrollként kiválasztottunk. Ezen kívül olyan mintákat vizsgáltunk meg piroszekvenálással, melyek mutáns státuszát immunhisztokémia alapján nem tudtuk egyértelműen meghatározni.

Az EGFRvIII pirosekvenáláshoz szintén vannak elérhető primer termékek, azonban a kísérletünkbe ez már nem tartozott bele. Ennek oka abban keresendő, hogy az EGFR génben az EGFRvIII deléciós töréspontjainak száma nagyon nagy, ezek DNS szintű teszteléséhez pedig szintén nagyon nagyszámú primerre lett volna szükség, amelynek költségei nem fértek bele jelen munka anyagi keretei közé. Az FFPE minták pedig nem voltak alkalmasak RNS / cDNS szintű vizsgálatokra (pl. reverz-transzkripció PCR, sequenálás) Az EGFRvIII antitestünk működése ugyanakkor kellőképpen megbízhatónak minősült.

4.2.2.2. DNS tisztítási és PCR előtanulmányok (DNS koncentráció tesztelése FFPE blokkokból)

A FFPE blokkokból a QiaGen® Deparaffinization Solution for FFPE samples kit (Qiagen®, Hilden, Németország) segítségével a mintákat kioldottuk. Ezután a QiaGen® QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50) (Qiagen®, Hilden, Németország) segítségével DNS-t tisztítottunk a megadott protokoll szerint.

A blokkokból kinyert DNS koncentrációját megmértük Thermo Scientific® (Thermo Scientific®, Waltham, Massachusetts, Egyesült Államok) NanoDrop 2000 készülékkel és a hozzá tartozó NanoDrop2000/2000c szoftvercsomaggal. A detektációs minimum limit ennél a készüléknél 2ng/μl, a maximum pedig 15000ng/μl. A készülékhez kapcsolt szoftver a mérési adatokat táblázatkezelő programok számára (pl. Microsoft Office EXCEL) kezelhető formátumban képes tárolni és menteni.

-20°C-os tárolás után a DNS anyagokat PCR eljárással amplifikáltuk egy BOECO Thermal Cycler SQ BOE8085240 (Boeco GmbH, Hamburg, Németország) készüléken. Az IDH-1 PCR és szekvenáló primereket egy korábbi publikáció alapján szintetizáltattuk a BioScience Kft közvetítésével. A reverse PCR primer biotin konjugált volt (Setty és mtsai, 2010).

A PCR primerek végkoncentrációját 25pmol/μl-re állítottuk be szekvenáló tisztaságú desztillált vízzel (Invitrogen® Paisley, Egyesült Királyság). A PCR primerek szekvenciája:

IDH-1 forward primer: 5'-CACCATACGAAATATTCTGG-3'

IDH-1 reverse primer: 5'-BIOTIN-CAACATGACTTACTTGATCC-3'

Agaróz gél elektroforezis tesztelés alapján, a PCR termék megfelelő mennyiségű és minőségű volt a további lépésekhez.

4.2.2.3 Piroszekvenálási előtanulmányok

Az IDH-1 PCR termékeket egy avidin-biotin immobilizációs eljárással tisztítottuk.

A sztreptavidinnel bevont sepharose gyöngyöket egy immobilizációs master-mixbe mértük össze. Ez tartalmazta a PyroMark binding puffert, magát a sztreptavidint tartalmazó „Streptavidin Sepha” oldatot, valamint szekvenáló tisztaságú vizet. A minták előkészítése után a PyroMark Q24 készülékhez tartozó vákuum állomás segítségével a szekvenálandó DNS szegmentumokat az annealing pufferbe mostuk. Ez a puffer tartalmazta a szekvenáló primert, a minta DNS-t, valamint magát az annealing gyári puffert is. Szintén publikált szekvenáló primert használtunk [Setty és mtsai, 2010].

A szekvenáló primer szekvenciája: 5'-GTGAGTGGATGGATGGGTAAAACC-3'

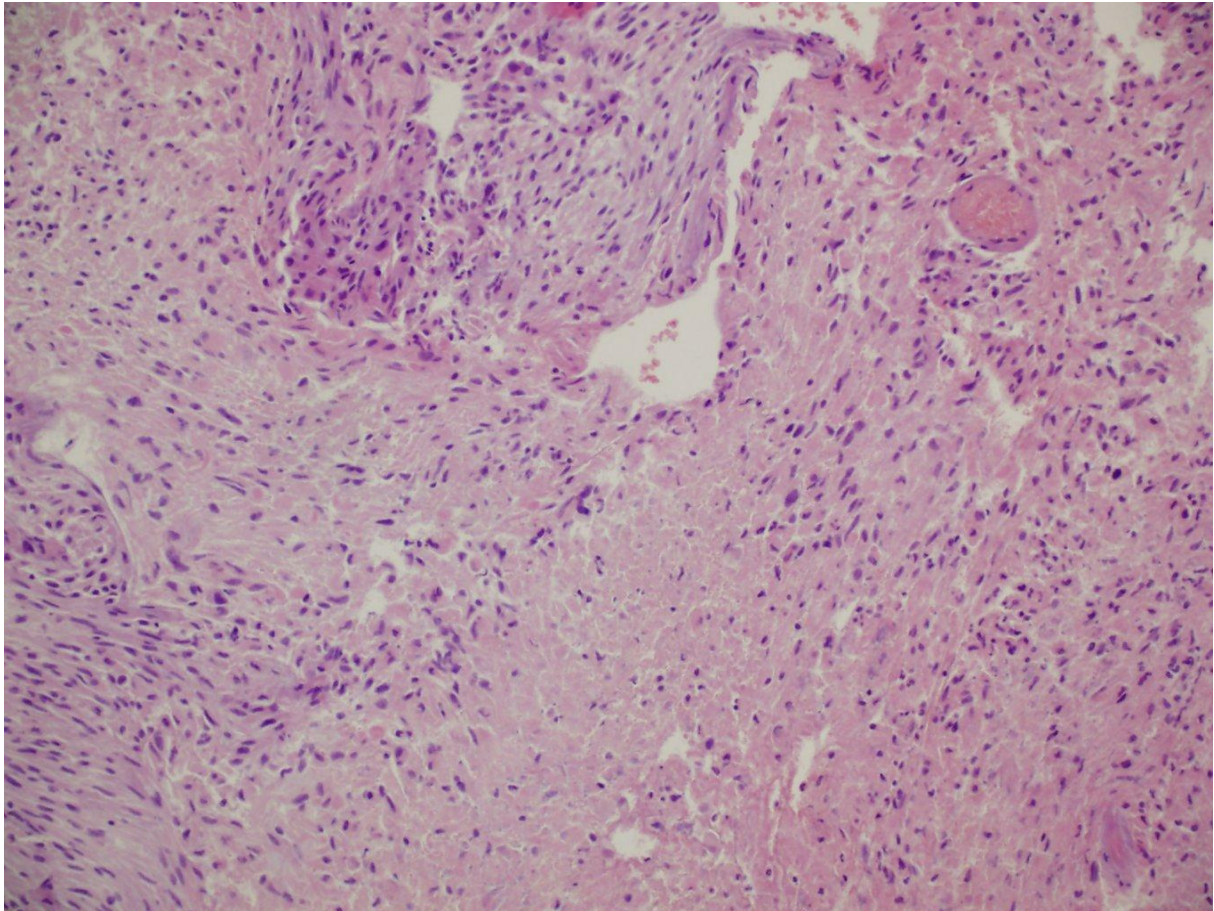
A piroszekvenáláshoz PyroMark Q24 (Qiagen®, Hilden, Németország) készüléket használtunk, amely képes szoftveresen többféle illesztést is ellenőrizni a talált szekvenciákra.

4.3. Immunhisztokémiai tesztek

Az immunhisztokémiai tesztek az előtanulmány során beállított antitest hígításokkal és feltárási protokollokkal történt (3. táblázat). A primer antitesteket Tween-20 mentes TBS pufferben hígítottuk, a feltárást 0,01M citrátpufferben, vagy proteináz K kezeléssel végeztük. Az immunhisztokémiai tesztek előhívása során a Novolink Polymer Detection Systems RE-7140-K (Leica Biosystems, Newcastle, Egyesült Királyság) protokoll ajánlását követtük. A mosási lépéseket Tween-20 detergenst tartalmazó TRISZ pufferolt sóoldattal (TBS pufferrel) végeztük. Ezek összetételét a 7-es fejezetben foglaltuk össze.

A mintáinkból készített lemezeken első lépésként értékelési területeket (region of interest v. ROI) kellett kijelölnünk, hogy a továbbiakban konzisztens és összevethető felületeket vizsgálhassunk meg. Ehhez haematoxylin-eosin festést és GFAP immunfestést használtunk. Szempontjaink az alábbiak voltak: az értékelési-technikai területnek malignusnak kellett

lennie emelkedett sejt sűrűséggel, pleomorf és mitózisban levő sejtekkel, melyek GFAP pozitívítást mutattak. A nekrotikus területek arányát az értékelési területeken belül 20%-ban maximalizáltuk, az erek benövéseinek mértékét pedig 25%-ban állapítottuk meg. Az ROI kiválasztását 1:20 és 1:200 nagyítások között végeztük el, és a kiválasztott területeket markerrel körülírtuk valamennyi tárgylemezen. Így 1-1 blokkból a 8 elsődleges antitesttel készült IHC elemzés 8 egymást szekvenciálisan követő metszeten történt, melyek mindegyike ugyanazon ROI-t tartalmazta (a 8x3µm-en belül a ROI megerősíthető volt).

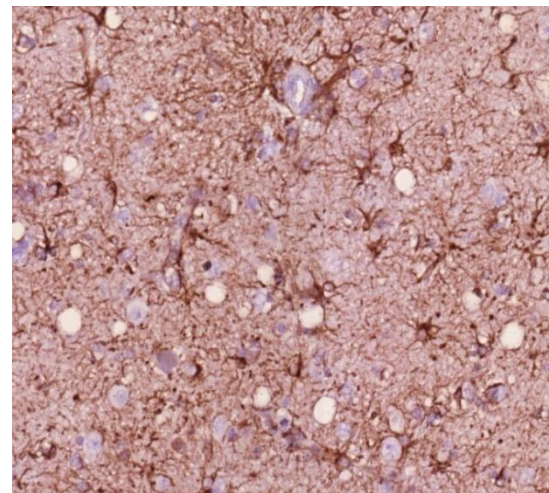
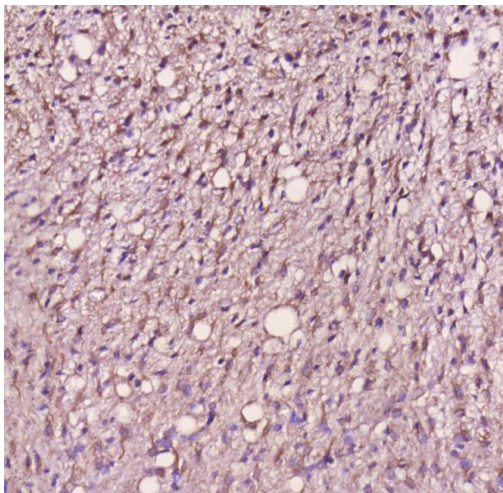


4. Ábra – Egy, az értékelési terület kiválasztásához használt haematoxylin-eosin festés (4053/05)

A 4. Ábra szemlélteti az immunhisztokémiai festések értékelését megelőző haematoxylin-eosin festés értékelését. A megfelelő nagyítás kiválasztása után az ereket, nekrozisokat és szövettani artefactumokat ki kellett szűrni. A legtöbb anyag tumoron belüli heterogenitása további kihívást jelentett.

Tanulmányunk során elsőként valamennyi blokkból GFAP immunfestést végeztünk (M 0761anti-GFAP, DAKO-Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornia, Egyesült Államok)

(3.Táblázat). Ezt a tesztet technikai pozitív kontrollként használtuk, hiszen a glioblastoma tipikusan GFAP pozitív (bár néha előrehaladott stádiumban elveszítheti a GFAP festődést a tumor). Erre az antitestre az astroglia sejtek citoplazmatikus festődése jellemző. A tárgylemezek lefedéséhez Pertex® (Pertex®, Mounting medium 11, Mitsui&Co. Ltd. Osaka, Japán) lefedő anyagot használtunk. Az értékelést 1:20 és 1:40-es nagyításokon végeztük. A GFAP és az összes többi immunfestés illusztrációi két blokkból, az előtanulmány post-mortem és a fő tanulmány műtéti anyagából kerülnek alább bemutatásra.



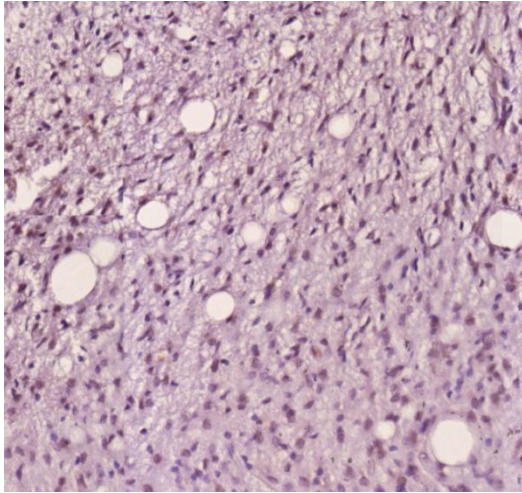
5a. Ábra - GFAP⁺műtéti minta - 18371/13

5b. Ábra - GFAP⁺post mortem - 11424/05

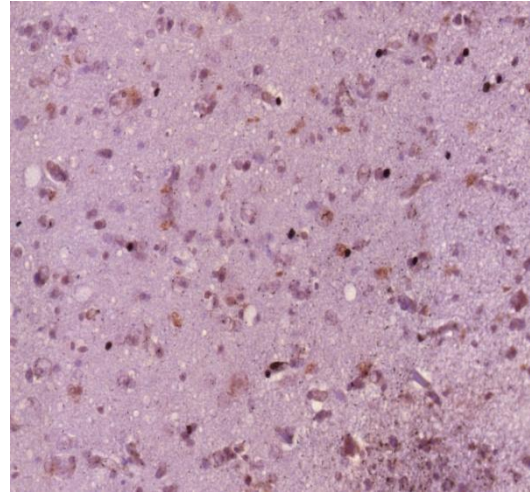
A két egymással kontrasztba állított ábra két glioblastomával diagnosztizált tumorból származó minta GFAP festése. Az 5a ábra egy műtéti reszekcióból származó minta, pozitív GFAP teszttel, inkább fibrilláris festődéssel. Az 5b ábra egy post mortem mintából származó szövetrészlet GFAP IHC festése, szintén pozitív eredménnyel, jobbára celluláris festődési mintázatban. Előtesztjeinkben ezt a két mintát vetettük össze, az alábbi ábrapárok szintén ugyanennek a két mintának az összehasonlításai.

A második antitestünk az anti-neurofibromin-1 (ab30325 Abcam®, Cambridge, Egyesült Királyság) volt (ld. 3. Táblázat). Antitestünk festődése citoplazmatikus és nukleáris régiókra is kiterjedt. Összesen négy féle festődési mintázatot tapasztaltunk. Az első csoportban citoplazmatikus festődést találtunk, ez felel meg az antitest működésének normális, fiziológiás körülmények között. A második csoportba olyan lemezek kerültek, ahol nem csak citoplazmatikus, de sejtmagi festődés is történt. A harmadik csoportban kizárólag a sejtmagok festődtek, a citoplazma nem adott pozitívítást. A negyedik, egyben utolsó csoport festődése a teljesen negatív volt, mind a sejtmagok, mind a citoplazma negatív jelet adott.

A lemezek a lefedésüket követő 12 óra után szintén készen álltak az értékelésre. A pozitív festődés határának az erősebb, mint egy kereszt (+) festődési intenzitást tekintettük. A neurofibromin nukleáris és citoplazmatikus festődését a 6a és 6b ábrákban mutatjuk be.



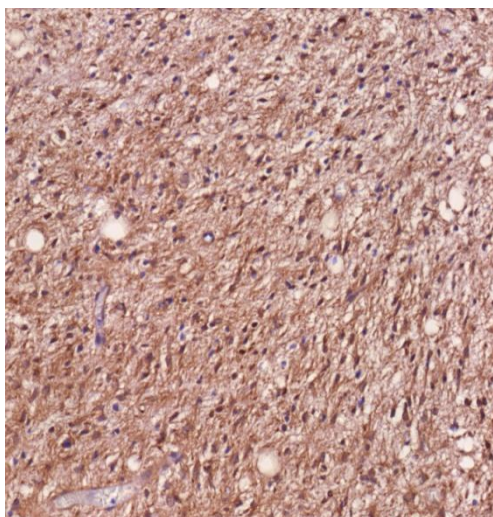
6a. Ábra - NF-1 nukleáris festődés 18371/13



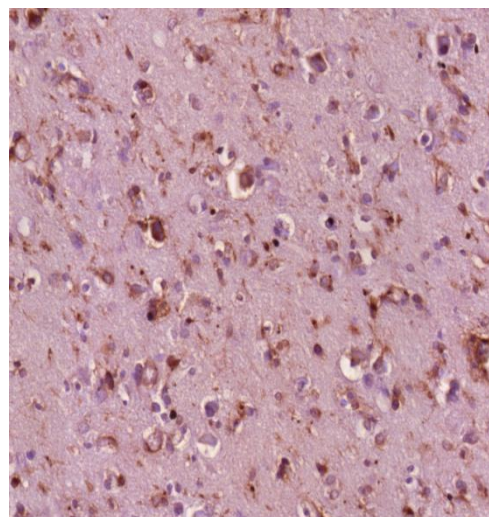
6b. Ábra - NF-1 nukleáris és citoplazmás festődés 11424/05

A műtéti minta 6a és a post mortem minta 6b összevetése során látható anti-neurofibromin IHC mindkét esetben pozitív jelet adott.

Az anti-EGFR antitest (M7239, DAKO-Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornia, Egyesült Államok) (3. Táblázat) a membránon expresszált EGFR molekulákat, valamint az EGFRvIII deléciós mutánst is felismeri és köti. A festődési mintázat fiziológiásan a citoplazma membránnal asszociált, de citoplazmatikusan is előfordul az éppen kifejeződés alatt álló EGFR molekulák festődése miatt. Az EGFRvIII csak a tumorok kb. 30%-ában fejeződik ki. Lefedést követően 12 óra elteltével a lemezek értékelhetőek voltak (7a és b ábra).



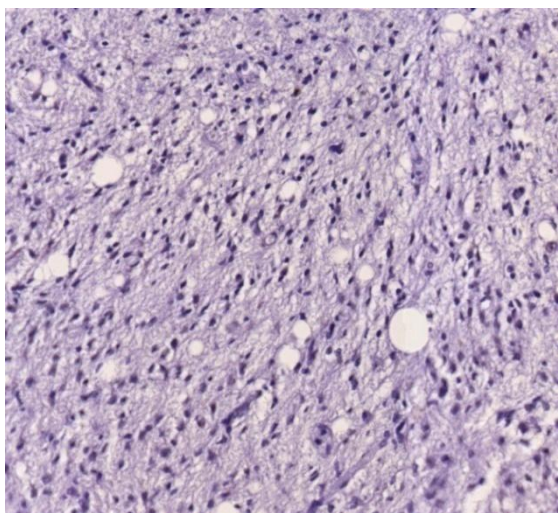
7a. Ábra– EGFR⁺ membrán festődés
18371/13



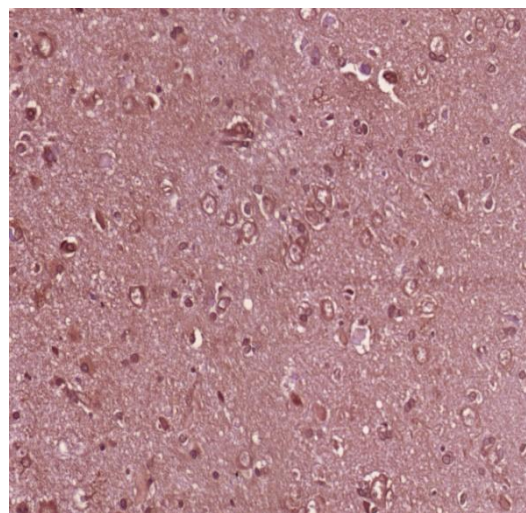
7b. Ábra – EGFR⁺ membrán és
citoplazmás festődés 11424/05

A műtéti (7a) és a post mortem (7b) minta összehasonlítása EGFR IHC-val. Látható, hogy a műtéti anyagban jóval erőteljesebb az EGFR molekulák expressziója, ezért a festődés intenzitása és a festődött sejtek százalékos megoszlása is sokkal magasabb, mint a post mortem anyagból származó IHC képen, ami valószínűleg inkább a két tumor biológiai természetével, mint a minták különböző eredetével áll összefüggésben.

Az anti-EGFRvIII antitest (bs-2558R Bioss™, Woburn, Massachusetts, Egyesült Államok) (ld. 3. Táblázat) csak az EGFRvIII-as variánst ismeri fel, normál EGFR molekulákhoz nem kötődik, így detektálni lehet vele a mutáció jelenlétét. Az antitest festődése sejtmembrán asszociált, de az EGFRvIII-ra is igaz, hogy citoplazmatikus vagy perinukleáris festődést is adhat az expresszió alatt álló EGFRvIII struktúrák festődése miatt. Csak a ++ és +++ festődési intenzitású lemezeket tekintettük pozitívnak, amit egy digitalizált értékelés is megerősített. Ehhez a 3D HisTech „Pannoramic Scan”, Mirax Scan készülékét és a 3D HisTech Pannoramic Viewer 1.15-ös szoftvert QuantCenter (3D HisTech Kft. Budapest, Magyarország) használtuk (8a és b ábrák).



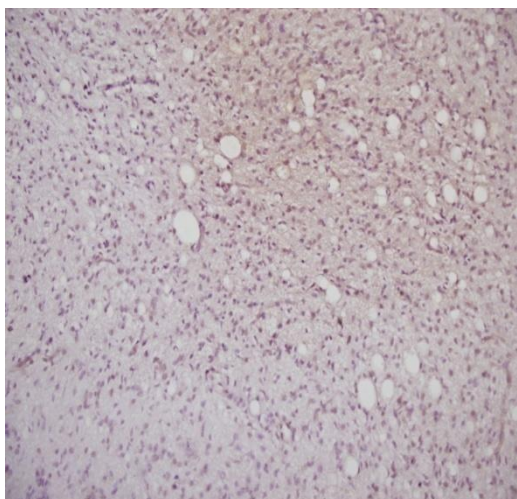
8a. Ábra– EGFRvIII festődés 18371/13



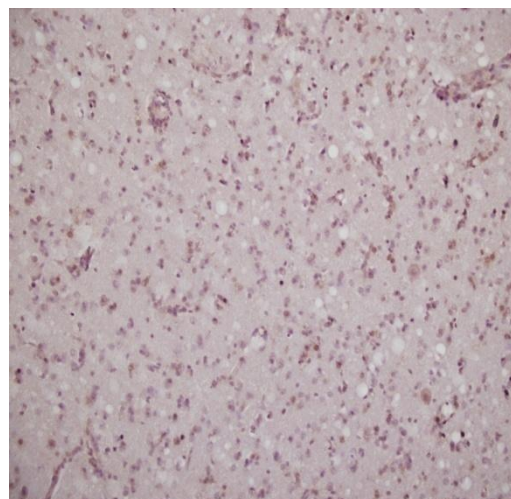
1b. Ábra - anti-EGFRvIII⁺ pozitív festődés 11424/05

A műtéti forrásból származó mintában (8a) negatív eredményt találtunk, szemben a post mortem anyaggal (8b), amelyben EGFRvIII pozitivitás mutatható ki.

Az anti-P53 (DAKO M 7001) (3. Táblázat) antitest a sejtmagban mutat festődést, ezért elsősorban nukleáris festődést vártunk (9a és b ábrák).



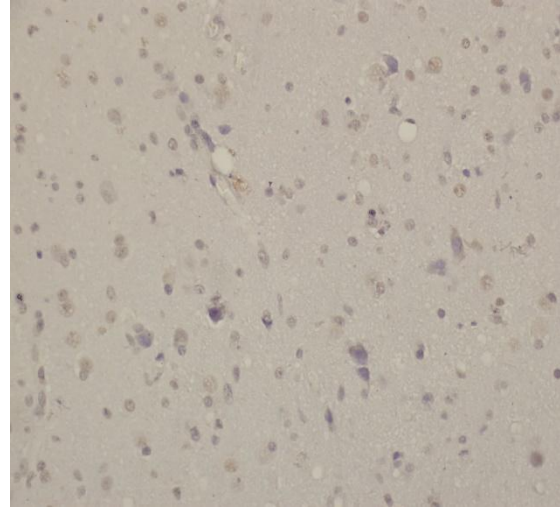
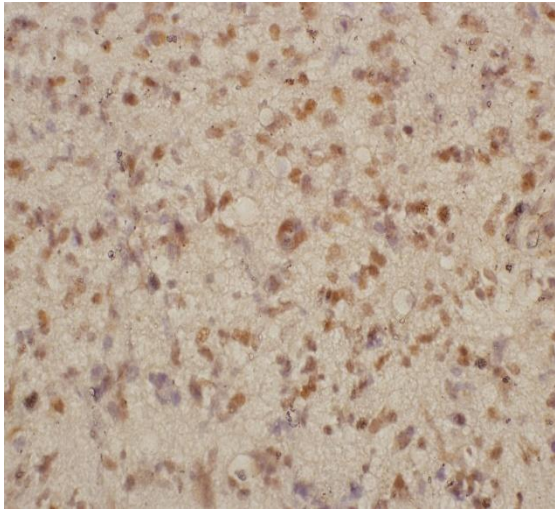
9a. Ábra - P53⁺ nukleáris festődés 18371/13
11424/05



9b. Ábra - anti-P53⁺ nukleáris festődés

Mindkét mintában detektáltunk p53 pozitivitást. A post mortem anyagban (9b) a festődés valamivel kifejezettebbnek mutatkozott.

Az anti-ATRX fehérje (HPA001906 SIGMA®, Saint Louis, Missouri, Egyesült Államok) (3. Táblázat) antitestünk festődési mintázatára a sejtmagi lokalizáció jellemző (10a és b ábrák).

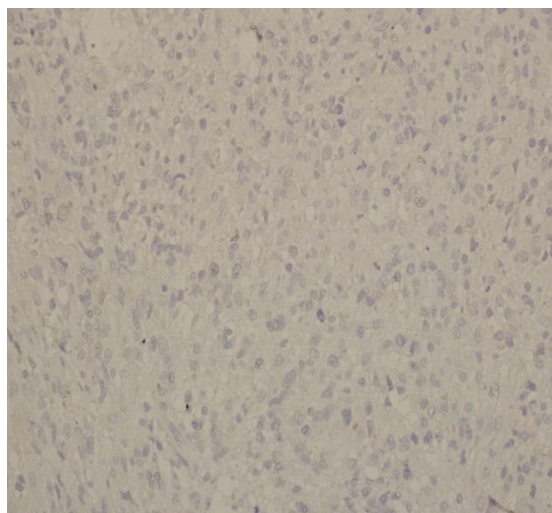
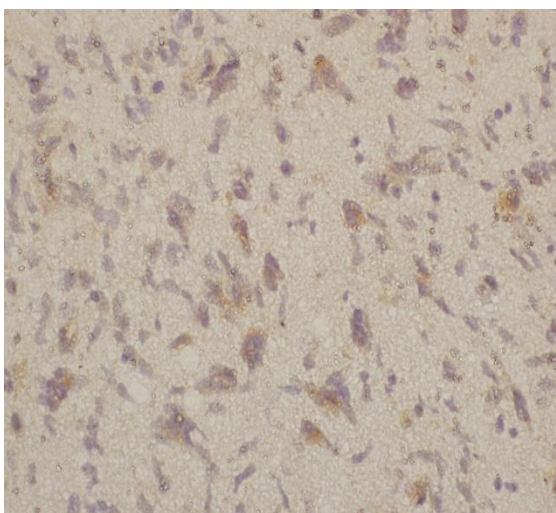


10a. Ábra – 18371/13 ATRX pozitív IHC

10b. Ábra – 11424/05 ATRX negatív IHC

A 10a Ábrán jól látható az ATRX-re jellemző pozitív nukleáris festődési mintázat. A 10b Ábrán ezzel szemben a gyenge háttérfestődésen kívül nem tapasztalni specifikus pozitívítást.

A mutáció specifikus anti-IDH-1 R132H monoklonális egér antitest (DIA-H09 Dianova GmbH, Hamburg, Németország) (3.Táblázat) festődési mintázatára citoplazmatikus festődés jellemző. Az „+” festődési intenzitást mutató IDH-1 R132H immunfestési eredményeinket a negatív kategóriába soroltuk be a kiegészítő pirosekvenálás eredmények alapján, mely bizonyította, hogy az „+” IHC festődésű minták mutációra negatívak voltak, míg a „++” és „+++” festődésű minták minden esetben pirosekvenálással is mutáció pozitívnak bizonyultak (11a és b ábrák).

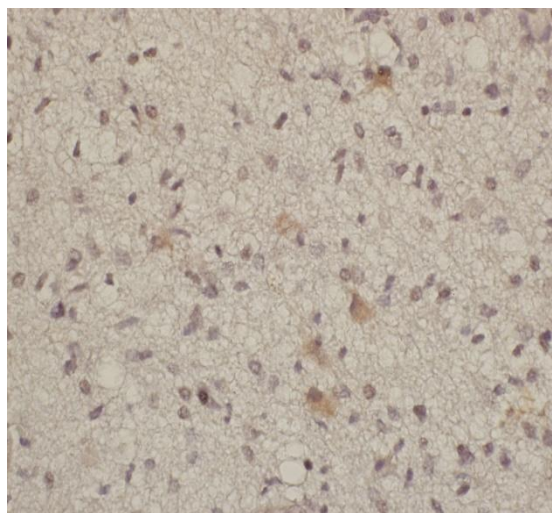
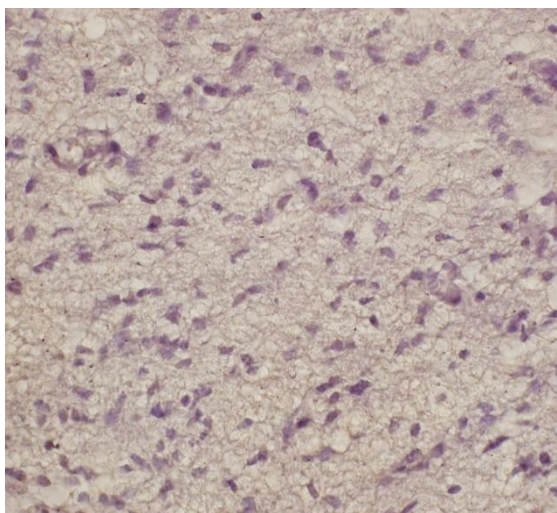


11a. Ábra – 18731/13 IDH-1 R132H IHC

11b. Ábra – 11424/05 IDH-1R132H IHC

A 11-es ábrapár IHC eredményei. A műtéti anyagból származó 18731/13-as minta IDH-1 R132H mutációra pozitív eredményt adott, jól láthatóak a citoplazmában festődött sejtek. A 11424/05-ös ábrán látható minta ellenben negatív IHC eredményt adott.

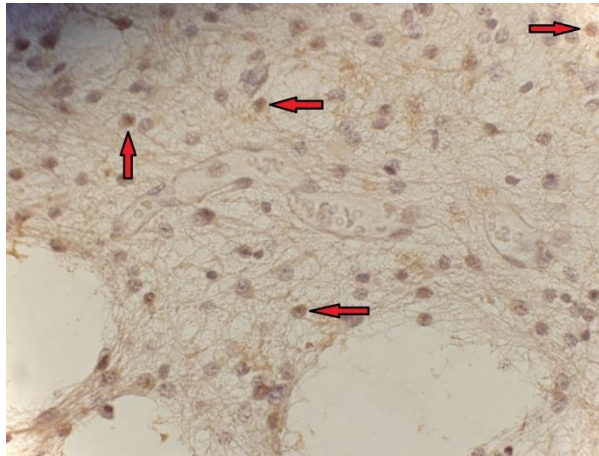
Az anti-CD133 antitest (orb372328 Biorbyt™, Cambridge, Egyesült Királyság) (3. Táblázat) elsősorban az őssejtek felszínén kifejeződő marker, ezért membránfestődést vártunk. Ennek illusztrációi alább láthatóak (12a és b ábra).



12a. Ábra – 18371/13 CD133 IHC

12b. Ábra – 11424/05 CD133 IHC

A 12-es a és b Ábra mindegyike negatív eredményt adott CD133 markerre. A 12a Ábrán a haematoxylin festődés látszik, specifikus membránfestődés azonban nem, a 12b Ábrán van ugyan látható citoplazmás festődés, de ez nem specifikus sejtmembrán festődési mintázat. Az alábbiakban (12c Ábra) egy technikai pozitív IHC-t is bemutatunk.



12c. Ábra – pozitív CD133 teszt 11238/07

A 12c. Ábrán látható vörös nyilak jelzik a pozitív jelet adó sejteket. A CD133⁺ sejtek jól láthatóan elkülönülnek a negatív, csak haematoxylinnel festődött sejtektől.

4.3.1. Immunhisztokémia értékelése

Az IHC értékelése során manuális és digitalizált leolvasást végeztünk. A digitalizált értékelés membrán és mag festődés esetében (EGFR, EGFRvIII, p53) történt. 3D HisTech Panoramic Scan, MiraxScan készüléket a tatabányai Szent Borbála Kórház Patológia Osztályán használtunk. A digitalizálás 100X nagyításon történt. Az elkészült digitális fotókat a tatabányai kórház központi szerveréről DVD lemezekre mentettük le.

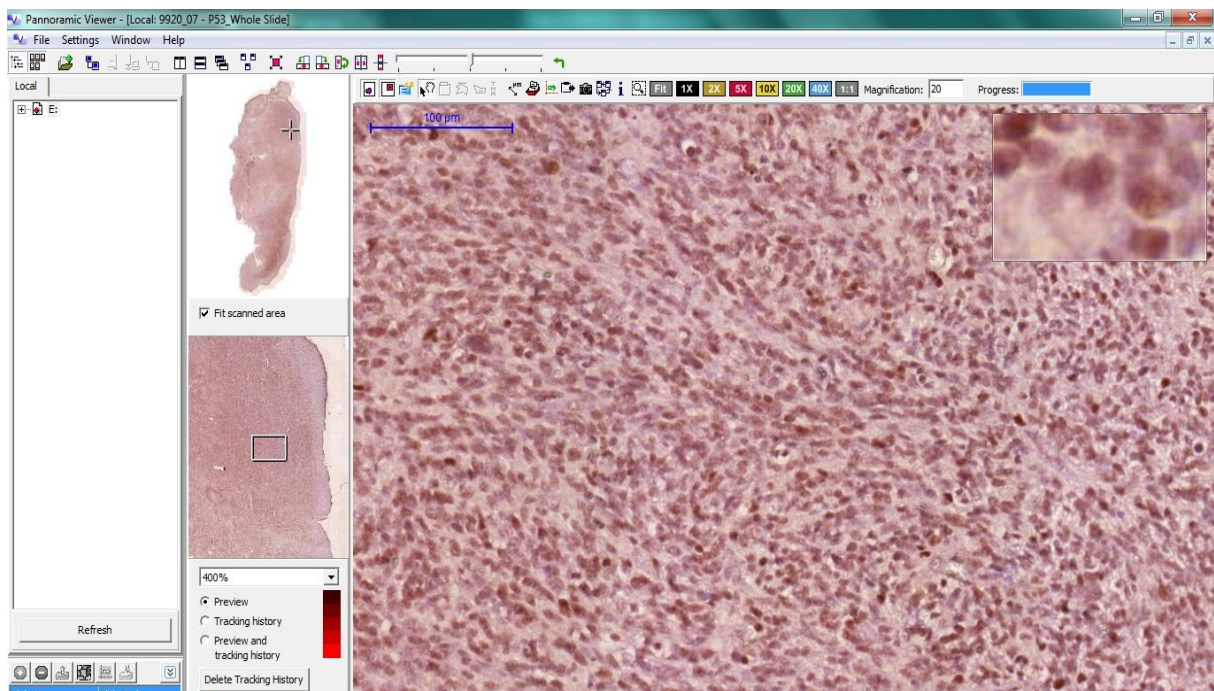
A beolvasott lemezeket a már említett 3DHisTech Panoramic Viewer 1.15 programmal, valamint a bővítményként hozzáadható QuantCenter modullal ((3D HisTech Kft. Budapest, Magyarország) értékeltük. A QuanCenter modul képes a kiválasztott nagyításon sejtmembrán és/vagy sejtmag festődés intenzitásának és a festődő sejtek százalékos arányának a meghatározására. Az egész tárgylemez területén, vagy bizonyos kiválasztott területeken lehetséges értékelést végezni.

A komputer által számolt sejtek festődési intenzitását -, +, ++ és +++ között értékeltük, míg a festődött sejtek számából a százalékos arányt határoztuk meg. A három antitest digitális értékelését a manuális leolvasás megerősítésére és pontosítására használtuk a ROI területén.

A kiválasztott ROI területek manuális értékelését az EGFR, p53, NF-1, CD133, ATRX, EGFRvIII, és az IDH-1 R132H esetében is elvégeztük. Az értékelést három különálló személy végezte 1:200 nagyításon, Olympus BX51 mikroszkóppal (Olympus Corp. Japan).

EGFR, p53, CD133 és ATRX esetében a festődési intenzitást ugyanúgy, mint a komputeres elemzés során, manuálisan is -, +, ++ és +++ kategóriákra osztottuk fel. Három-három látótér vizsgálata történt, 100-100 sejt leolvasásával. Az intenzitás értékelése mellett meghatároztuk a festődött sejtek százalékos arányát. A Histoscore értéket a festődött sejtek %-os értékének és a festődés intenzitásának a szorzatából nyertük. A kapott értéknek így 0 és 300 közé kell esnie. A neurofibromin esetében hasonlóan jártunk el és meghatároztuk az IHC festődési intenzitást, valamint a festődött sejtek százaléka alapján a Histoscore értékeket. Azonban a végső értékeléshez négy festődési kategóriát különítettünk el: 1. citoplazmatikus pozitivitás, 2. citoplazmatikus és mag pozitivitás, 3. mag pozitivitás és 4. citoplazma és mag negativitást.

A két mutációra specifikus antitest, EGFRvIII és IDH-1 R132H esetében a pozitív (mutáció) jelenlétét vagy hiányát dokumentáltuk, ahol a pozitívítást „++” vagy „+++” IHC festődési intenzitással definiáltuk (ld. fentebb). A pozitív/negatív eredmény meghatározásához az IDH-1 R132H mutáció jelenlétét piroszekvenálással, az EGFRvIII mutáció jelenlétét a digitalizált értékeléssel erősítettük meg.



13. Ábra – 9920/07-es mintánk elemzése a 3D HisTech Panoramic Viewer programmal
A digitális értékelést segítő Panoramic Viewer szoftverben könnyedén lehet festődött sejtszám elemzést végezni nukleáris és sejtmembrán festődés esetében is. A fenti képen 1:20-as nagyításon egy p53 magi festődést látunk, a digitális sejtszámolást előkészítő fázisban (értékelési terület azonosítása).

A manuális és digitális leolvasás között erős korreláció mutatkozott, 90%-ban megegyeztek a kapott adataink.

4.4. Piroszekvenálás

Az anti-IDH-1 R132H antitest működését piroszekvenálással is megerősítettük. Az Immunhisztokémiai előtanulmány által meghatározott kritériumoknak megfelelően az IHC tesztek során pozitívnak értékelt anyagokból, valamint két negatív anyagból (negatív kontroll) terveztük elvégezni a piroszekvenálási validálást. Szintén teszteltük piroszekvenálással az összes olyan mintát, ahol az IDH-1 R132H mutáció IHC értékelése nem volt egyértelmű.

Sajnos nem készülhetett valamennyi, immunhisztokémiával egyértelműen pozitívnak bizonyult blokkból molekuláris elemzés. Ennek oka, hogy az immunhisztokémiai tesztek során egyes minták elhasználódtak, így nem maradt elég szövetanyagunk a piroszekvenáláshoz. Így csak az IHC által nem egyértelműen pozitív mintákat, valamint a két kontrollt tudtuk megvizsgálni.

A kiválogatott és további tesztekhez megfelelőnek ítélt blokkokat első lépésként deparaffináltuk a QiaGen® Deparaffinization Solution for FFPE samples kit segítségével. A deparaffinált anyagokból a QiaGen® QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50) segítségével kitisztítottuk a DNS-t. A blokkokból kinyert DNS minták koncentráció értékeit Thermo Scientific® NanoDrop 2000 készülékkel és a hozzá tartozó NanoDrop 2000/2000c szoftvercsomag segítségével ellenőriztük.

A minták DNS koncentrációját 1ng/μl-re állítottuk be a PCR-hez.

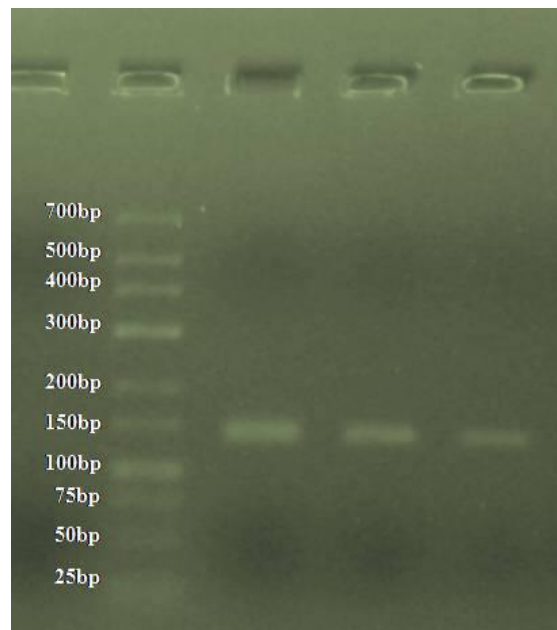
A PCR-t egy BOECO Thermal Cycler SQ BOE8085240 készüléken végeztük 40 ciklusban. A ciklusok az alábbiak szerint kerültek beállításra: I.ciklus: 95°C 10 percig, 2-39.ciklusig 95°C 3 másodpercig, 50°C 30 másodpercig, 72°C 30 másodpercig. Az utolsó ciklusban 72°C 10 percig, majd 4°C-on tárolás overnight. A Master Mix-et az alábbiak szerint mértük össze reakciónként, a Qiagen® PCR kit (Therascreen enzim mix, QiaGen, Hilden, Németország) segítségével:

Reagens	Mennyiség/reakció
2X Mix	12,5 μ l
10X Coral Load	2,5 μ l
Forward primer	1 μ l
Reverse primer	1 μ l
DNS minta	5 μ l
Desztillált víz	3 μ l
Végtérfogat:	25 μ l

4.Táblázat - PCR mix összeállítása

A 4. Táblázat tartalmazza a DNS mix összeállításához felhasznált összetevőket mikroliterben megadva. A feltüntetett mennyiségek egy reakcióra elegendő térfogatot jelölnek.

A PCRterméket agaróz gélen gélelektroforézissel ellenőriztük.



14. Ábra – PCR termékekről készített gélelektroforézis felvétele

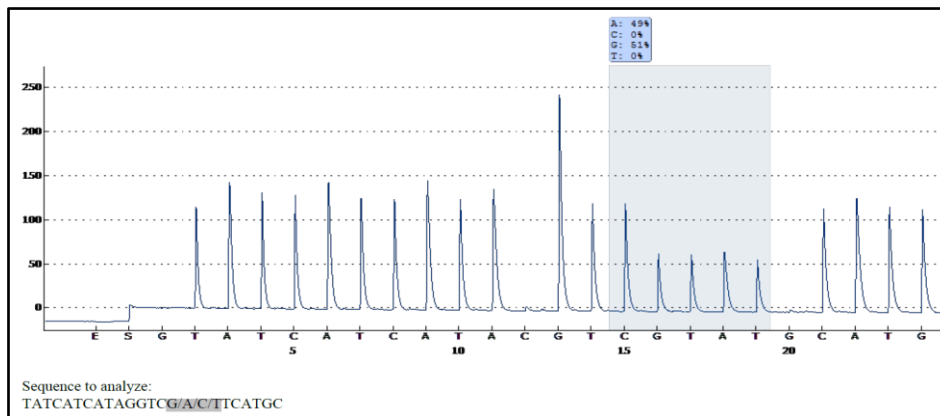
A 14-es ábra szemlélteti három IDH-1 R132H mutációt hordozó mintánk (létrától jobbra haladva: 4053/05; 5641/13; 19731/13) PCR utáni gélelektroforézis tesztjének eredményét. Jól látható, ahogy 150 bázispárnál (létrától jobbra) megjelentek a specifikus DNS minták csíkjai.

A biotinizált amplikont immobilizálással tisztítottuk, majd az IDH-1 R132H mutáció jelenlétét piroszekvenálással vizsgáltuk az előtanulmányok során már említett automata

készüléken a hozzátartozó pyromark szoftvercsomag segítségével. Publikált szekvenciát használtunk a szekvenáló primer esetében is [Setty és mtsai, 2010].

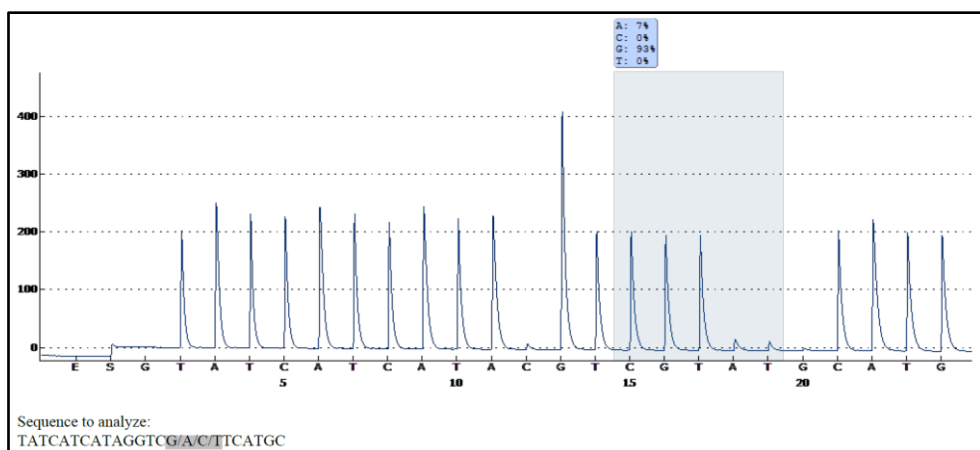
4.5. Piroszekvenálás értékelése

Piroszekvenálással megerősítettük valamennyi IHC „++” és „+++” értékelésű minta esetében az R132H IDH-1 mutáció jelenlétét 10 glioblastoma mintában.



15a. Ábra – Pozitív teszteredmény IDH-1R132H – 5641/13

A 15a ábrán látható kijelölt szekvencia kettős mutációra utal. A normál szekvencia az érintett R132H pozícióban CGT lenne, ehelyett itt 49%-ban a második pozícióban guaninról adeninre cserélődés (a Cosmic adatbázisban ilyen a COSM28746-os azonosítójú c.395G>A referencia), 19%-ban pedig a harmadik pozícióban timinről citozinra cserélődés történt (a Cosmic adatbázisban egyedül ilyen harmadik pozíció mutációra utaló referenciát nem találtunk, azonban kettős mutáció a második és harmadik pozícióban található, a COSM86993 c.395_396GT>AC referenciával). Ezért, a fenti pyrogram alapján mintánkban ilyen kettős mutáció valószínűsíthető, azonban teljességgel annak a lehetősége sem zárható ki, hogy két klón (egyik a kodon 2-es, a másik a 3-as pozíciós) mutációja fordult elő a vizsgált tumorban.



15b. Ábra – Az IDH-1 132-es kodont körülvevő vad típusú szekvencia – 11424//05
 A 15b ábrán IDH-1 R132H mutációra negatív eredményt adó piroszekvenálási teszt látható. A normál (vad típusú) szekvencia olvasható le „CGT” a kijelölt régióban a 132 pozícióban.

4.6. Az adatok rendezése és statisztikai elemzések

4.6.1. Klinikai adatgyűjtés és a master file elkészítése

A betegek retrospektív klinikai adatainak kigyűjtése az Etikai Bizottság engedélyével és a klinikai onkológus segítségével történt a betegek adatvédelmének értelmében részben az elektronikus *MedSolution* rendszerből, részben pedig a papír alapú kórlapból a vizsgált patológiai mintákhoz tartozó TAJ szám alapján.

A következő adatokat dokumentáltuk egy Excel táblázatban: nem, életkor, műtéti dátum, kezelés, recidívák megjelenése, recidívák műtéti dátuma, a recidívára adott terápia, szövettani lelet összefoglalói, elhalálzási dátum. Az ún. „master file”-ban a klinikai adatok mellett rögzítettük az immunhisztokémiai és a piroszekvenálási eredményeket.

4.6.2. Statisztikai módszerek

Miután az IHC eredményeket megerősítettük és letisztítottuk, a statisztikai elemzések több lépésben történtek. 1. Az IHC markerek alapján manuálisan megvizsgáltuk a betegek / minták elkülönülését. 2. Hierarchikus klaszterelemzést végeztünk az SPSS23 programcsomag alkalmazásával a molekuláris alcsoportok elkülönülésének tesztelésére és megerősítésére. Esetünkben felosztó hierarchikus klaszter analízis alkalmaztunk. A lépésről lépésre megjelenő klasztereket dendrogramon ábráztuk (lásd 38. és 39. Ábrák). Az új klasztereket csak akkor

tekintettük leválaszthatónak a fő csoportról, ha valamely dimenzió mellett szignifikánsnak tekinthettük. Pontosan annyi lépést iktattunk be, amíg a szignifikáns klaszter-leválasztás lehetséges volt. A további felosztást csak a neurofibromin-1 esetében végeztük el, leválasztásának határérték közeli szignifikancia szintje, valamint biológiai relevanciája miatt. A neurofibromin, EGFRvIII és IDH-1R132H IHC eredményeit +/- alapú nominális értékelésben teszteltük, mivel itt teljes expresszió elvesztésés genetikai mutációt tudtunk detektálni, míg a többi IHC marker esetében a Histoscore értékeket teszteltük. Ezekben az esetekben csak az expressziós mintázatokat tudtuk megfigyelni. Az adatcsoportok közti különbségeket elágazások formájában jelenítettük meg a klaszter elemzés ábráján. Végül pedig megvizsgáltuk a klinikai (beteg neme és kora, a betegség teljes túlélése) paraméterek korrelációját a molekuláris alcsoportokkal. A nemek eloszlására Pearson Khi-négyzet próbát használtunk. A betegek életkorát az adatok nem normál eloszlása miatt Kruskal-Wallis teszttel vizsgáltuk meg (több csoport összevethető), illetve az alcsoportokat a teljes beteganyaggal is összevetettük Mann-Whitney teszttel. A betegek túlélése és az alcsoportok közötti korrelációt Cox-regressziós, Kaplan-Meier, valamint Wilcoxon előjeles rang teszt elemzéssel vizsgáltuk. A túlélési vizsgálatainkkal kapcsolatban itt megjegyezzük, hogy a Kaplan-Meier analízis esetén a bevont csoportok kis mérete és a rendelkezésre álló túlélési adatok alacsony aránya miatt az eredmény torzul, ezért az alábbiakban bemutatott függvények csak óvatos prezentációk.

Az elemzés során kinyert adatainkat részben grafikus, részben táblázatos formában összesítettük. Az adataink statisztikai elemzését minden esetben 95%-os konfidencia szint mellett végeztük és itt is az SPSS 23-as programcsomagot alkalmaztuk.

5. Eredmények

5.1. A két vizsgálati kohort

Vizsgálatainkban összesen 104 glioblastomás beteg műtéti anyagát vizsgáltuk. A 104 betegből 96 betegtől egy minta volt elérhető a kezeléseik előtt, az első műtét során eltávolított tumorból. Ezek a minták képezték az első kohort anyagát, melyben az IHC markerek alapján vizsgáltuk a molekuláris alcsoportok elkülönülését, majd a molekuláris alcsoportokkal korreláltuk a betegek klinikai paramtereit (életkor, nem, teljes túlélés).

A maradék 8 betegtől, akik a második kohortot képezték, nemcsak az első műtétekből, hanem a recidívák miatti műtéti beavatkozások anyagából is tudtunk vizsgálatokat végezni, hogy a tumor evolúciója során vizsgálhassuk meg a marker profil változását.

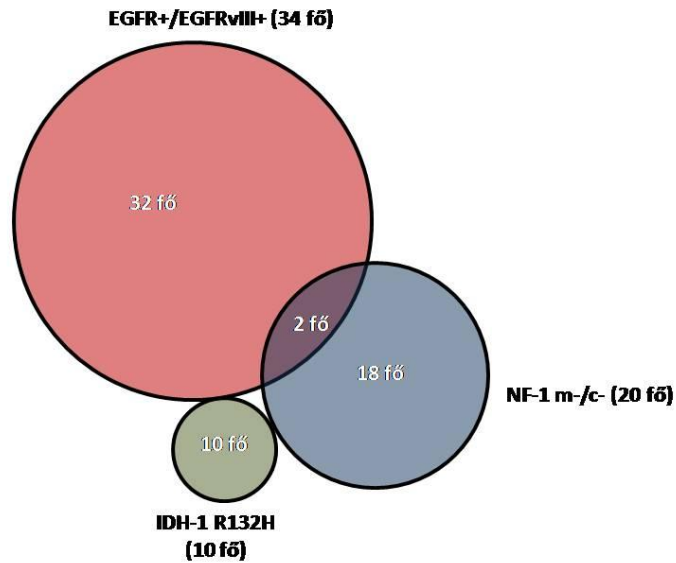
5.2. Nyers adatokból manuálisan levonható következtetések az 1. kohortban

Első megközelítésben, a statisztikai értékelést megelőzően, az immunhisztokémiai adatok előzetes, a glioblastoma alcsoportok markerek alapján történő elkülöníthetőségét „manuális” értékeléssel végeztük el. A manuális értékeléssel megbizonyosodhattunk arról, hogy az egyes betegek glioblastoma mintája a marker expresszió mintázata alapján, statisztikai értékelések nélkül is besorolható egy-egy molekuláris alcsoportba. A festődési mintázatok konstellációja kizárt bizonyos mintázatokat (pl. EGFRvIII és IDH-1R132H pozitívítás és NF-1 teljes negativitás). Ha a minták ilyen formájú szegregációja megerősítést nyer a statisztikai elemzéssel, és az alcsoportok korrelálnak a klinikai kimenetellel, akkor tervezhető lesz kis számú markerrel egy olyan immunhisztokémiai panel, amely segítségével a glioblastomák prognosztikus és terápiás szempontból is fontos molekuláris alcsoportokba lesznek besorolhatók a jövőben a klinikai gyakorlatban.

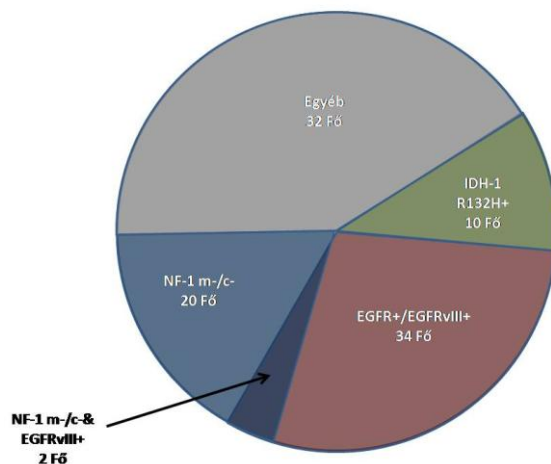
Ily módon az összes markerre megvizsgáltuk a betegek / minták szegregálódását, mely során három antitest bizonyult kulcs fontosságúnak a glioblastoma alcsoportok elkülönítésében. Ez a három alcsoport az EGFR-EGFRvIII ko-pozitív csoport (EGFR markerre +++ festődési intenzitást adó minták, melyekben 75%-nál magasabb a festődött sejt arány, vagyis 225-nél magasabb HistoScore értékkel, valamint EGFRvIII markerre pozitív IHC; olyan esetünk nem volt, ahol az EGFR negatív, az EGFRvIII markerünk pedig pozitív jelet adott volna a ROI-n

belül). A neurofibromin mag és citoplazma negatív csoport; valamint az IDH-1R132H pozitív csoport volt. Ezek a csoportok (a markerek által megjelölt molekulák alapján) valószínűleg átfednek a TCGA által meghatározott alcsoportokkal.

Ezek a molekuláris alcsoportok a TCGA alcsoportokkal átfedésben: 1) IDH-1 R132H pozitívitas (Verhaak és mtsai, 2010, proneurális alcsoportjának felelhet meg), 2) EGFR és EGFRvIII együttes pozitívitas (Verhaak és mtsai, 2010, klasszikus alcsoportjának felelhet meg) és 3) neurofibromin negatívitas (Verhaak és mtsai, 2010, mezenhimális alcsoportjával lehet átfedésben). A 16. Ábra mintáink megoszlását mutatja a 3 marker alapján és tükrözi az IDH-1 R132H alcsoport teljes mértékű elkülönülését a másik két alcsoporttól, míg jelzi az EGFRvIII pozitív és neurofibromin expresszió (mag és citoplazma) negatív csoport átfedését 2 minta esetében. A korábbi OMICS szintű elemzések eredményei alapján is a molekuláris klaszterek között részleges átfedések voltak várhatóak. A 17. Ábra mutatja, hogy az 1. kohortba tartozó mintáink 2/3-a (66 az összes 96 mintából) a három marker segítségével molekuláris besorolást nyert. Az Egyéb kategóriába sorolt minták a 3 markerrel nem voltak osztályozhatók. A többi marker (p53, CD133, ATRX) manualis elemzése során a már meghatározott három alcsoport nem nyert további megerősítést vagy finomítást, és az „Egyéb” jelzésű alcsoportot sem sikerült jobban meghatározni.



16. Ábra- A glioblastoma molekuláris alcsoportok elkülönülése IHC markerek alapján
 A 16-os ábrán látható színes körök jelentik meg az 1. kohort kirajzolódó alcsoportjait. A korongok méretarányai megegyeznek a beteganyagban talált molekuláris csoportok egymáshoz viszonyított arányaival. A legnagyobb csoport az EGFRvIII mutáns csoport, a legkisebb pedig az IDH-1 R132H csoport volt. Az NF-1 teljes negativitást 20 főnél detektáltuk.

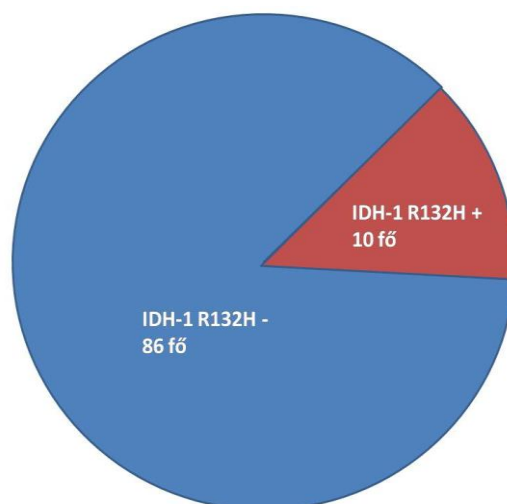


17. Ábra -A marker-alcsoportok megoszlása

A könnyebb áttekinthetőség kedvéért az adatokat egy másfajta megjelenítéssel is ábrázoljuk. A 17-es ábra megjeleníti a marker-alcsoportok viszonyát az 1. kohort teljes anyagában. A torta egy-egy színes szelete arányos a teljes betegszámhoz viszonyított adott marker-alcsoport betegszámával. Az NF-1 m-/c- és EGFRvIII csoportok közti átfedést két beteg anyaga reprezentálja, amit az ábrán is megjelenítettünk.

A továbbiakban a molekuláris markerek alapján elkülönített alcsoportokban megvizsgáltuk, hogy a betegek klinikai paraméterei korrelálnak-e ezekkel az alcsoportokkal. A vizsgált klinikai paraméterek a beteg korát, nemét és a teljes túlélést foglalták magukba. A túlélést a tumor reszekciója és az elhalálozás időpontja között eltelt idő jelenti, hetekben megadva.

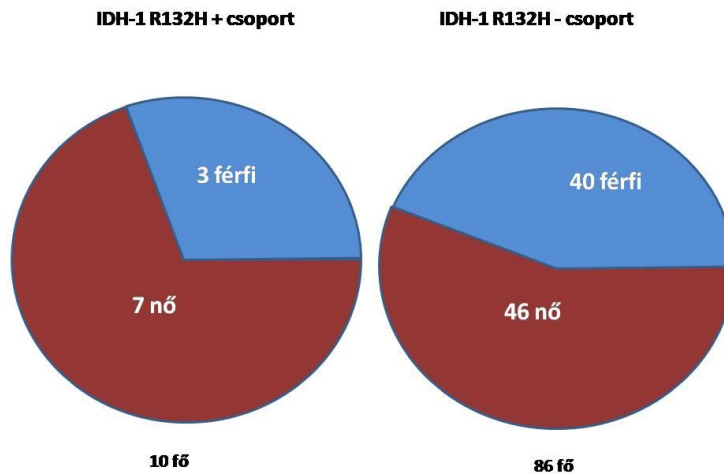
Az IDH-1R 132H mutáció aránya az 1. kohortban az alábbiak szerint oszlik meg:



18. Ábra -Az IDH-1R132H mutáció aránya az 1. kohorton belül

A 18-as ábrán a teljes 1. Kohort 96-fős beteganyagunkhoz viszonyított 10-főnyi IDH-1 R132H mutáció megjelenését illusztráljuk. Az arány megfelel a TCGA által lefektetett arányoknak.

96 beteg közül 10 főnél sikerült megerősíteni a mutáció jelenlétét IHC-val és pirosekvenálással. Ez a csoport így a Verhaak-i proneurális alcsoport egy részének felel meg, és a 10%-os előfordulás is megfelel a TCGA adatok alapján előrevetített előfordulási aránynak (18. Ábra).

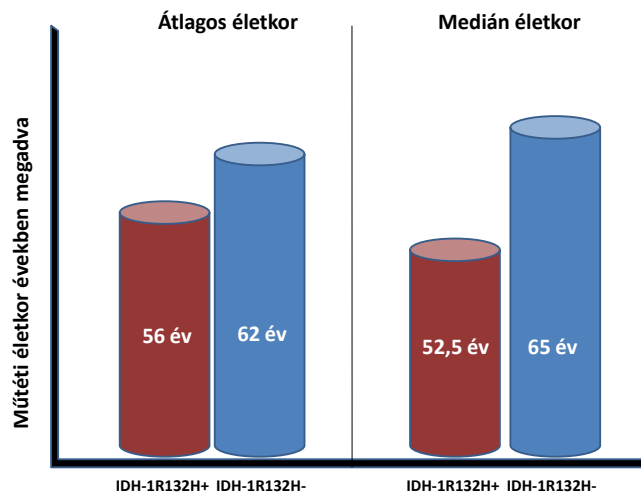


19. Ábra –IDH-1R132H mutációk megoszlása nemek szerint

A 19-es ábra két oldala az IDH-1 R132H tesztre pozitív és negatív eredményt adott csoport nemi arányát veti össze. A két csoport nemi arányainak térnek el egymástól ($p=0,34$).

Bár a statisztikai elemzés a pozitív csoport kis betegszáma miatt korlátozott értékű, a pozitív és negatív csoportban a nemek aránya szignifikánsan nem tér el egymástól (Khi-négyzet próbával $p=0,34$ 95%-os konfidenciaszint mellett), és megegyezik a teljes mintaszámunk nemi arányával (19.ábra) (lásd még: 1.Táblázat). A betegek neme nagy valószínűséggel nem állt kapcsolatban a mutáció megjelenésével a vizsgálati anyagunkban.

Az IDH-1 R132H negatív és pozitív csoportok életkor szerinti elemzése:



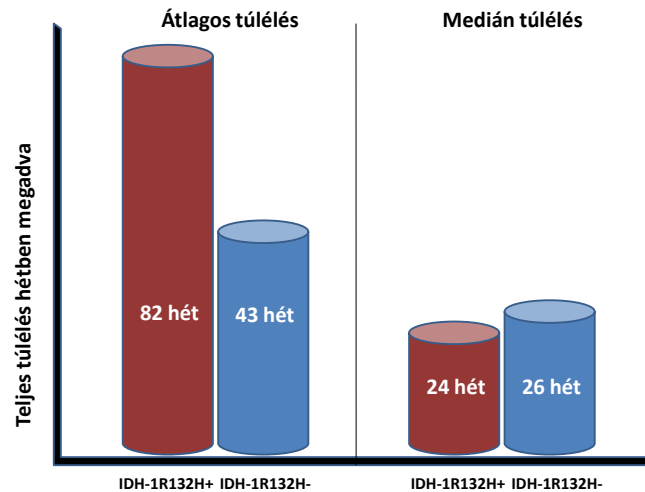
20. Ábra -Beteganyagunk életkori megoszlása

A 20-as ábrán oszlopdiaagram segítségével jelenítettük meg az IDH-1 R132H státusz eredményei alapján felvehető átlag és medián életkor értékeket csoportosítva. Az ábra bal oldalán az átlagos életkorok kerültek összehasonlításra (pozitív vs negatív csoport), a jobb oldalán a medián értékek (szintén pozitív vs negatív csoport); $p=0,234$.

A 20. Ábra azt sugallja, hogy az IDH-1 mutációval rendelkező betegek életkora alacsonyabb a többi alcsoportra jellemző életkori megoszlásnál. Az IDH-1 mutáns betegek átlagos életkora 56 év volt, szemben az IDH-1 vad típusú betegekkel, akiknek 6 évvel magasabb volt az átlagos életkoruk. Szembetűnő, hogy a medián életkorok között még nagyobb a különbség az IDH-1 mutáns és vad típust hordozó betegek között. Mann-Whitney teszttel az IDH-1R132H + és – csoportot összevetve az alábbi p értéket kaptuk: $p=0,234$, 95%-os konfidenciaszint mellett. Ez alapján a + és – csoport között nincs szignifikáns különbség az életkorokat illetően, inkább csak a tendencia látszik, miszerint az IDH-1 mutációt hordozó betegek fiatalabbak voltak. Ennek oka a pozitív csoport kis mintaszáma lehet.

A teljes túlélési adatok vizsgálata során tapasztaltuk, hogy az IDH-1R132H mutációval érintett betegek túlélése tendenciájában hosszabb, mint azon betegeké, akiknek IDH-1 vad típusú tumora volt. Az átlagos túlélés kis híján kétszer olyan hosszú az IDH-1 mutáns csoportban, mint az IDH-1 vad típus esetén. A medián túlélés azonban nem erősíti meg az IDH-1 mutációt hordozók jobb túlélési tendenciáját; feltehetően az IDH-1 R132H pozitív alcsoport kis mérete és az adatok nagy szórása miatt. Ezen kívül, az IDH-1 R132H pozitív csoportban voltak a másodlagos glioblastómások is, akiknek az alacsonyabb gradusú gliomájának kezdeti klinikai adatai nem voltak elérhetőek, csak a glioblastomás fázis adatai

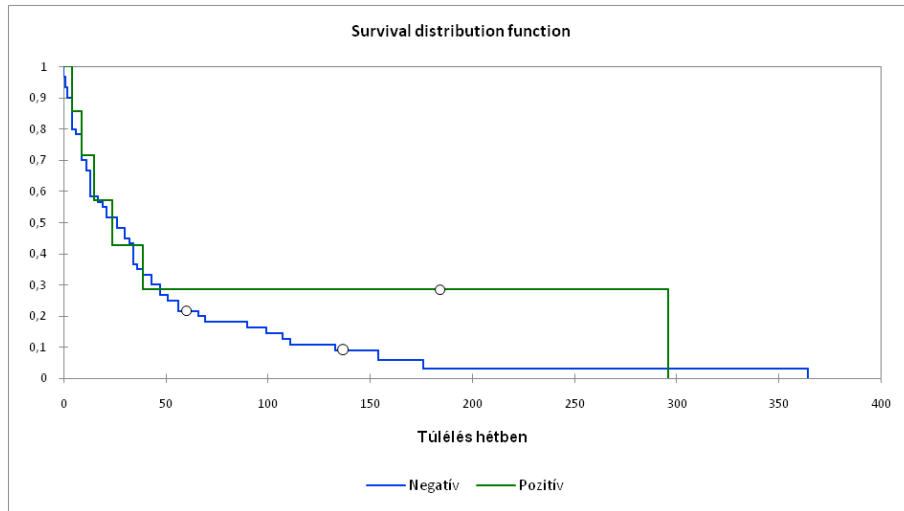
(ld. 1. Táblázat, 21. Ábra). A túlélések értékeléséhez Cox-regresszió számítást végeztünk, melynek eredményeit és szignifikanciáját az al csoportok tárgyalása után az 5.4-es fejezetben részletezzük.



21. Ábra -IDH-1+/- csoportok túlélésének összevetése

A 21 ábra a beteganyag IDH-1 R132H státusz szerinti pozitív és negatív csoportjainak átlagos és medián túlélési adatait hivatott összesíteni. Az ábra bal oldalán az átlagos értékeket hasonlítottuk össze egymással (IDH-1 R132H pozitív vs negatív csoport), jobb oldalon pedig a medián értékeket ugyanazon rendszer szerint.

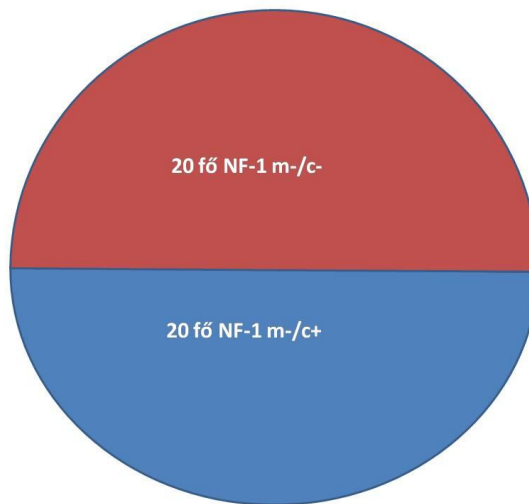
A túlélést Kaplan-Meier analízissel is megvizsgáltuk az IDH-1 R132H státusz szerint. Az IDH státusz szerinti Kaplan-Meier függvény a 22ábrán látható:



22. Ábra – A túlélés eloszlása Kaplan-Meier függvényen

A diagramon látható vonalak süllyedése (0 és 1 között) jeleníti meg az elhalálozásokat. Minden lépcsőfok megfelel minimum egy elhalálozásnak. A kék görbe az IDH-1 R132H negatív csoport, a zöld a pozitív csoport görbéje. Az Y tengelyen a teljes betegszámhoz számolt elhalálozási arányokat látjuk, az X tengelyen pedig a hetekben számított túlélést.

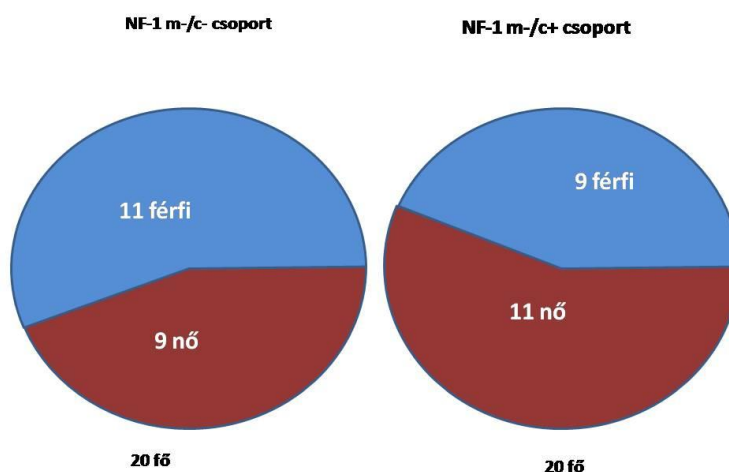
A következő markerünk a neurofibromin volt. Ennek négyféle festődési mintázatát figyeltük meg: citoplazma pozitív (m-/c+), mag és citoplazma pozitív (m+/c+), mag pozitív (m+/c-), mag és citoplazma negatív (m-/c-). Először a citoplazmában és nukleárisan is negatívjelet adó neurofibromin csoportot vetettük össze a citoplazmában pozitív és nukleárisan negativitást mutatókkal, mivel a citoplazma-/mag- csoport határozottan elkülönült a többi molekuláris glioblastoma alcsoporttól, és mivel a citoplazma+/mag- festődési mintázat a domináns normálisan előforduló NF-1 mintázat fiziológias körülmények között (itt referencia csoport). Negyven fő esetén kaptunk értékelhető információkat.



23. Ábra - Az NF-1 m-/c-expressziós mintázat megjelenése az 1. kohortban

A 23-as ábrán a fiziológias állapotok között várható citoplazma pozitív, nukleusz negatív neurofibromin IHC festődési mintázatot vetettük össze a dupla negatív csoporttal. Mindkét csoportba 20-20 fő került. Összesen negyven főt sikerült a két csoport valamelyikébe besorolnunk.

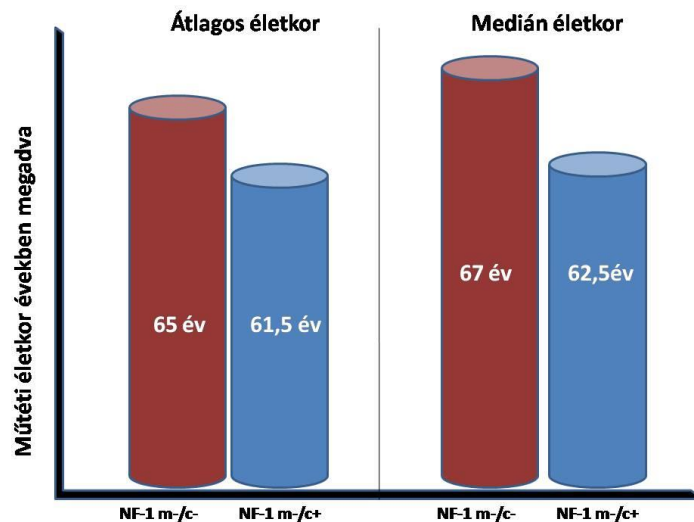
A teljes vizsgált betegcsoport körülbelül harmada, 20 fő került az NF-1 mag és citoplazma negatív csoportba. Mag negatív, citoplazma pozitív festődést 20 betegnél találtunk (23. ábra). A nemek megoszlása az NF-1 citoplazma és/vagy mag pozitivitást mutató 40 főt számláló beteganyagban hasonló a teljes első kohort nemi megoszlásához, ahol szintén enyhe női túlsúly figyelhető meg. Ez azonban egyik csoportban sem szignifikáns (Khi-négyzet próbával, 95%-os konfidencia szint mellett $p=0,4$). Az NF-1 negatív csoportnál ugyan a nemek aránya megfordul, a 20 beteg közül 11 a férfi és csak 9 a nő, de a fentiek alapján ez a különbség sem szignifikáns (24. Ábra).



24. Ábra –Az NF-1 expresszió (vagy annak hiánya) és a nemek kapcsolata

A 24-es ábrán a két NF-1 csoport IHC eredményeivel párhuzamba állított nemek eloszlását látjuk. A m-/c- csoportban 11 férfi és 9 nő, a m-/c+ csoportban 9 férfi és 11 nő található. Az arányok így torzultnak tűnhetnek, de a statisztikai elemzések eredményei szerint nincs szignifikáns különbség a két csoport között, mivel $p=0,40$.

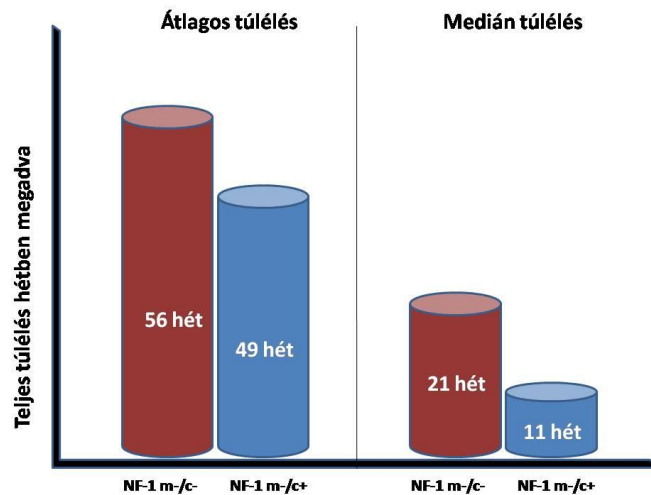
A műtéti életkorok megoszlása tendenciájában jellemzően magasabb volt, mint az előző (IDH-1 mutáns) csoportnál. Itt az átlagos műtéti életkor 65 év volt, míg a medián 67 év (25. Ábra). A két NF-1 csoport életkora közötti különbség Mann-Whitney teszttel nem minősült szignifikánsnak, 95%-os konfidencia szint mellett a p érték $p=0,22$ -nek adódott.



25. Ábra –NF-1 m-/c+ és m-/c- életkori megoszlása

A m-/c- és m-/c+ csoportok összevetése életkor szerint. Az ábra bal oldalán az átlag életkorokat tüntettük fel oszlopszerűen, a jobb oldalán pedig a medián értékek látszanak (m-/c- vs m-/c+ csoport). P-értékünk Mann-Whitney teszttel $p=0,22$.

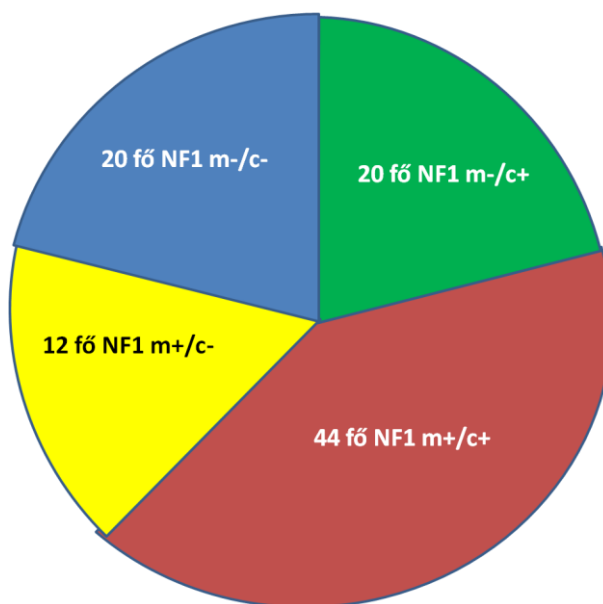
A teljesbeteganyag túlélése relatíve itt volt a legrövidebb. Ezt sejteni lehetett az irodalmi adatok alapján is, hiszen ez a csoport fed át a verhaak-i mezenhimális alcsoporttal, amelyre a rövid túlélés jellemző az agresszív biológiai tulajdonságok miatt. Az átlagos túlélés mindössze 56 hétben maximalizálódott, a medián túlélés pedig alig érte el a 21 hetet (26. Ábra). Az NF-1 pozitív és negatív csoportok között azonban nem volt statisztikailag szignifikáns különbség, vélhetően a kis minta elemszám miatt.



26. Ábra –NF-1 m-/c+ és m-/c- csoport túlélési aránya

A 26-os ábra a neurofibromin IHC teszt m-/c- és m-/c+ csoportjainak eredményeit hasonlítja össze a túlélési adatok szerint. Az ábra bal oldalán az átlagos túlélési adatokat látjuk oszlopszerűen egymás mellé állítva, a jobb oldalon pedig a medián értékeket.

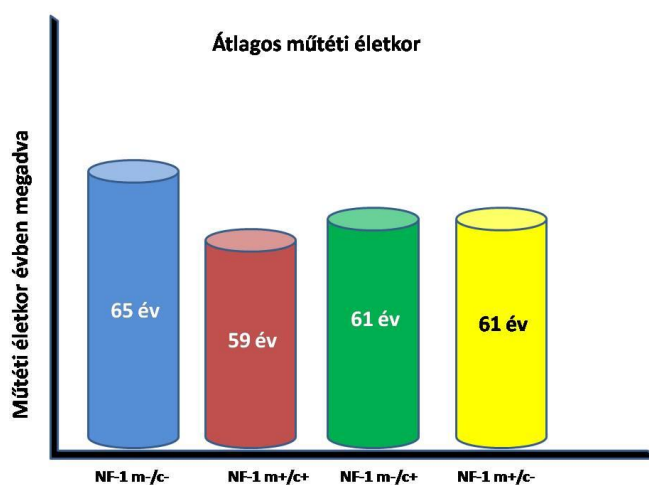
A továbbiakban összevetettük az NF-1 antitest négy különböző festődési mintázatát.



27. Ábra -Az NF-1 festődési mintázatok összevetése (c=citoplazma; m=sejtmag)

A 27-es ábrán az NF-1 IHC festés során tapasztalt négyféle festődési mintázatot látjuk. A torta minden egyes különböző színnel megjelenített szelete egy-egy festődési mintázatot mutató betegcsoportot illusztrál. A torta szeletei arányosak a festődési mintázatot mutató minták csoportjainak egymáshoz viszonyított arányaival. Látható, hogy a legkisebb csoport a plazma- mag+ csoport volt, míg a dupla pozitív csoport a legnagyobb.

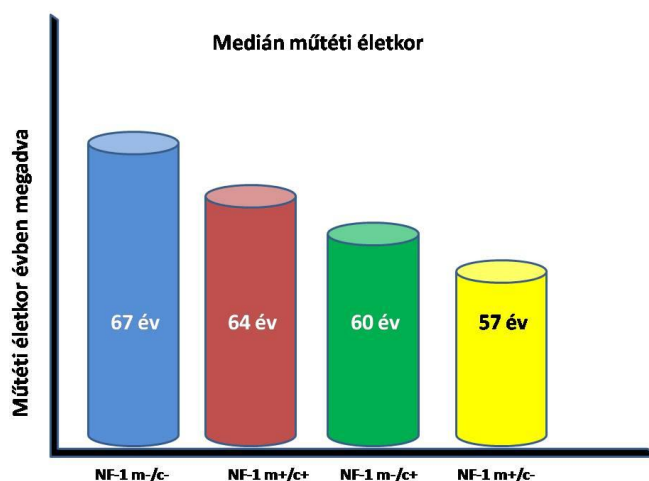
A négy NF-1 festődési mintázat megoszlását anyagunkban a 28. Ábra mutatja. A négy csoport között bizonyos fokú eltérések mutatkoznak a klinikai kimenetelben. A négy csoport életkorát Kruskal-Wallis teszttel összevetve 95%-os konfidencia szint mellett szignifikancia mutatkozott ($p=0,0097$). Ez alapján a négy festődési csoport az életkor alapján egyértelműen elkülönül. Az átlagos műtéti életkorok megoszlása szerint az NF-1 dupla negatív és NF-1 dupla pozitív csoport a két szélsőértéket jeleníti meg, előbbi a legmagasabb, utóbbi a legalacsonyabb műtéti életkor átlagértékkel (28. Ábra).



28. Ábra -Az NF-1 festődési típusok műtéti életkori megoszlása

A négy NF-1 IHC festődési mintázatú csoport átlagos műtéti életkor szerinti megoszlását látjuk ezen az oszlopdiagramon. A legmagasabb műtéti életkorra a dupla negatív, a legalacsonyabbal a dupla pozitív csoport rendelkezett, szignifikáns különbséggel $p=0,0097$.

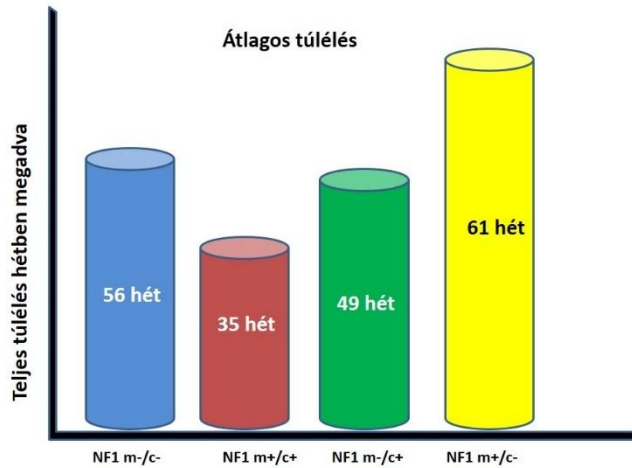
A medián adatokat illusztráló ábra szintén az NF-1 dupla negatív csoportot emeli ki szélsőértékként a betegség megjelenését/diagnosztizálását figyelembe véve (29. Ábra).



29. Ábra- Az NF-1 festődési típusok medián életkori eloszlása

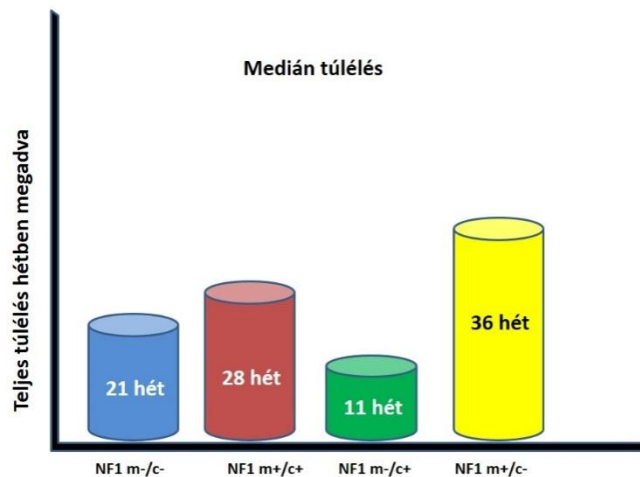
A 29-es ábra oszlopdiagramja a medián műtéti életkorokat állítja egymás mellé az NF-1 IHC négyféle festődési mintázata szerint. A legmagasabb értéket most is a dupla negatív csoport adta, a legalacsonyabbat pedig a plazma negatív, mag pozitív csoport.

Az első kohort beteganyagából a betegek neméről és életkoráról 100%-ban rendelkezünk információkkal. Ezzel szemben a túlélési adatokhoz az első kohortból csak 68 fő esetében sikerült hozzáférnünk. Ez az első kohortunk 71%-a. A véletlenszerű adatkiesés miatt az alább tárgyalt elemzések csak óvatos értékelések. A rendelkezésre álló adatok az alábbiak szerint oszlottak meg: m-/c- 65%-ban, m+/c- 75%-ban, m-/c+ 90%-ban, a m+/c+ csoportban pedig 59%-ban voltak elérhetők a túlélési adatok. A túléléssel összevetve ezeket a festődési típusok alapján szétválogatott tumorokat, az látszik, hogy a dupla pozitív daganatok túlélése rövidebb a többinél. A teljesen pozitív csoporté az átlagértékeknél rövidebb időtartamot jelöl, ennek lehetséges oka az, hogy a másik három típusba jóval kevesebb beteg került be, így az értékek kissé torzulhatnak. Ami viszont érdekes, hogy mind az átlagértékeknél, mind pedig a medián értékeknél azok a betegek rendelkeztek a leghosszabb túléléssel, akik tumorában a citoplazma negatívnak mutatkozott, de a magok pozitívnak (30. és 31. Ábrák). Statisztikailag nem mutatkozott szignifikánsnak a különbség az alcsoportok túlélési mutatóiban, 95%-os konfidencia szint mellett a p-értékünk $p=0,956$ -nak adódott. A csoportok közti különbségek tehát csak tendenciájukban jelentek meg.



30. Ábra- Az NF-1 festődési típusok átlagos túlélése

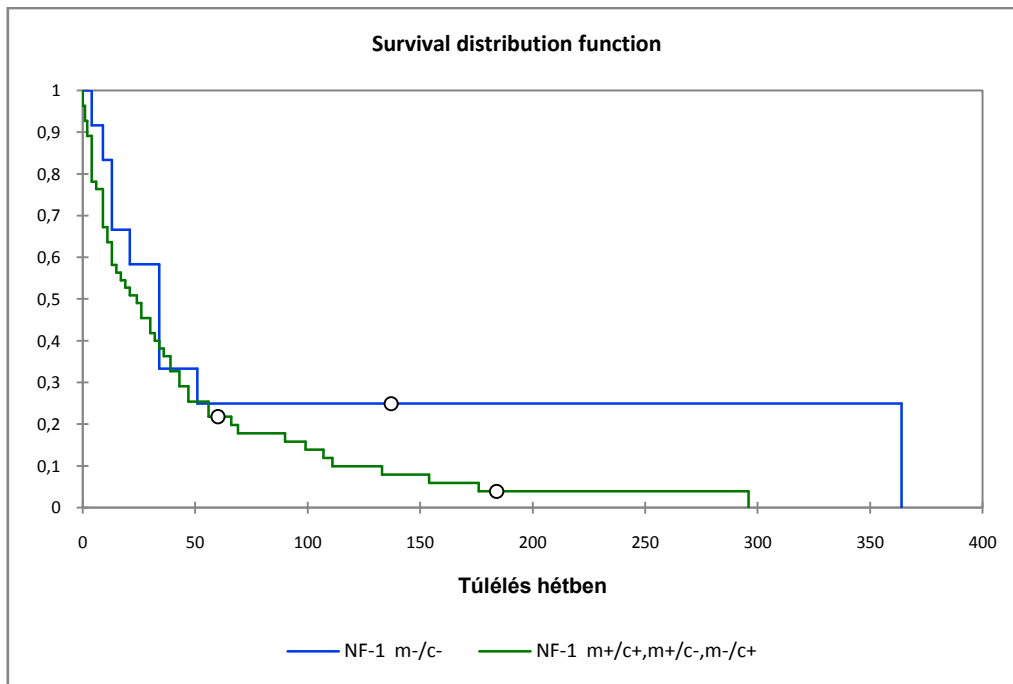
A 30-as ábrán az átlagos túlélési adatokat jelenítettük meg az NF-1 festődési típusok szerint. A legjobb túléléssel ez alapján a citoplazma negatív, mag pozitív csoport rendelkezett, a legrosszabbal pedig a dupla pozitív csoport.



31. Ábra- Az NF-1 festődési típusok medián túlélése

A 31-es ábra oszlopdiagramja az NF-1 IHC festődési típusok medián túlélési adatait szembeesíti. Ezek szerint a legjobb túléléssel a citoplazma negatív, mag pozitív csoport rendelkezett, a legrosszabbal pedig a citoplazma pozitív mag negatív csoport.

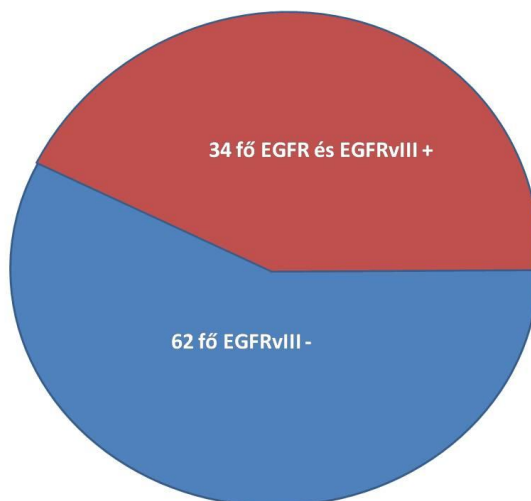
A 32-es ábrán az m-/c- csoport túlélési adatait vetettük össze a többi NF-1 expressziós csoporttal Kaplan-Meier függvényillesztéssel.



32. Ábra – Az NF-1 expressziós csoportok összevetése Kaplan-Meier függvénnyel

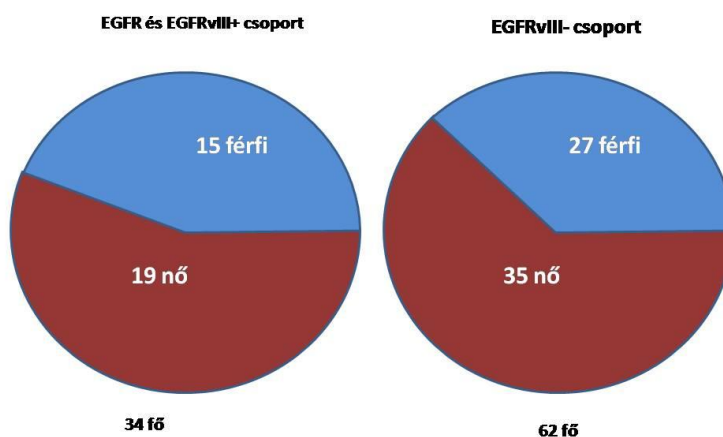
A diagramon agörbék 0 és 1 között felrajzolt meredeksége jeleníti meg az elhalálozási időpontokat. Minden lépés megfelel legalább egy elhalálozási eseménynek. A kék görbe az NF-1 teljesen negatív csoporthoz, a zöld az összes többi expressziós csoport együttes görbéjéhez tartozik. Az Y tengelyen az összes elérhető betegre számolt elhalálozási arányokat látjuk, az X tengelyen pedig a hetekre számított túlélést.

A harmadik antitest az EGFRvIII volt. Ennek megoszlását a 33. ábra mutatja:



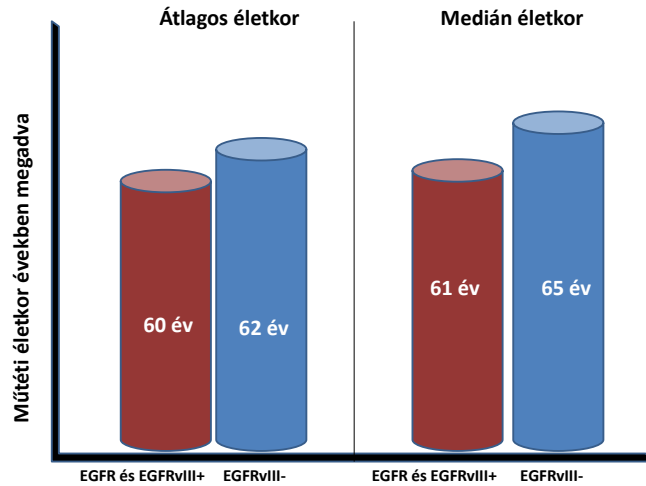
33. Ábra -Az EGFR fokozott expresszió és EGFRvIII mutáció együttes megjelenési aránya
 A 33-as ábrán az EGFRvIII mutáció megjelenésének arányát látjuk a teljes beteganyaghoz viszonyítva. Ezek szerint a 96 főből 34 főnél sikerült pozitivitást detektálni, 62 főnél viszont nem jelentkezett az EGFRvIII mutáció.

Az EGFRvIII mutáció megjelenése nem kötődik konkrétan egyik nemhez sem, a mutációval rendelkező betegcsoportban a nemek aránya szignifikánsan nem tér el a mutációval nem rendelkező betegek csoportjára jellemző aránytól. Khi-négyzet próbával a kapott p-érték $p=0,95$ (34. Ábra).



34. Ábra -Az EGFRvIII csoportok nem szerinti megoszlása
 A 34-es ábra bal oldalán az EGFRvIII+ csoport nemek megoszlása látszik, jobb oldalán pedig az EGFRvIII- csoporté. Jól látszik, hogy mindkét csoport teljesen hasonló a teljes beteganyag nemi eloszlási arányához ($p=0,95$).

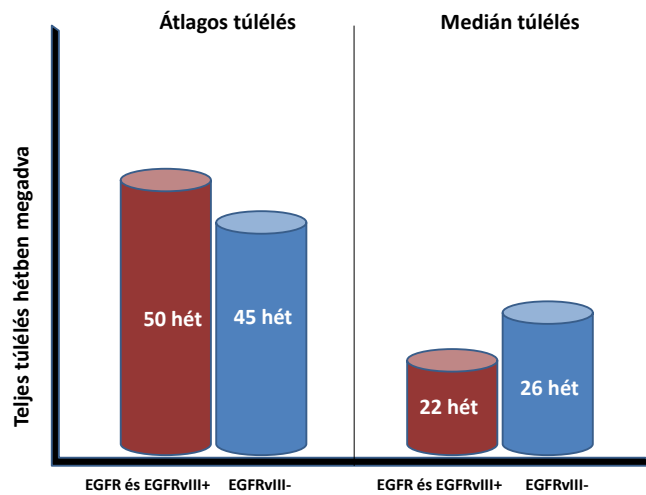
A műtéti életkorok a verhaak-i klasszikus alcsoporttal való átfedéssel összhangban átlagosan 60 év, medián értéket tekintve 61 év voltak az EGFR/EGFRvIII+ alcsoportban, míg a negatív csoportban ehhez nagyon hasonló értékeket kaptunk: átlag 62 év, medián 65 év. (35. Ábra). Ezek egyben a glioblastomára jellemző incidencia értékeknek is megfelelnek. Nem volt meglepő, hogy szignifikáns különbséget nem tudtunk kimutatni a két csoport között. 95%-os konfidencia szint mellett a Mann-Whitney teszt p-értéke $p=0,74$ -nek adódott.



35. Ábra -Az EGFRvIII mutáció életkori megoszlásai

Az ábrán az EGFRvIII + és – csoportok átlagos (ábrán balra) és medián (jobbra) műtéti életkorának összevetését látjuk. Mindkét esetben a negatív csoport adatai bizonyultak magasabb értékeknek. M-W teszttel $p=0,74$.

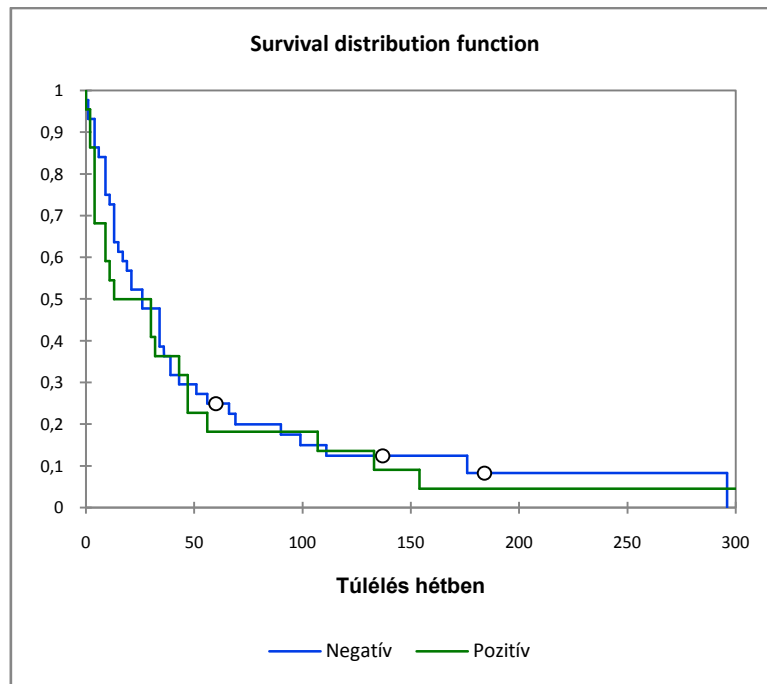
Az EGFRvIII teszthez a beteganyag 71%-ából sikerült kivonnunk a túlélési adatokat. Ez alapján elvégezve a számításokat, a túlélés tekintetében ez a csoport valamivel jobb prognózissal rendelkezik, mint az NF-1expressziót elvesztő daganatok, de rosszabbal, mint az IDH-1 pozitív daganatok (36. Ábra vs. 30-31. és 21. Ábra).



36. Ábra -Az EGFRvIII mutációt hordozó betegek túlélési arányai

A 36-os ábrán az EGFRvIII + és – csoportok túlélési adatait vetettük össze az átlag túlélés (balra) és a medián túlélés (jobbra) szerint. Bár az átlag túlélés még az EGFRvIII+ csoportban volt a magasabb, a medián túlélési értékek már az EGFRvIII csoportban bizonyultak jobbnak.

A 37-es ábrán az EGFRvIII+ és EGFRvIII- csoport túlélési adatait vetettük össze Kaplan-Meier függvénnyel.



37. Ábra – EGFRvIII pozitív és negatív csoportok összehasonlítása Kaplan-Meier függvényillesztéssel

A diagramon a görbék 0 és 1 között felrajzolt meredekségével jelentettük meg az elhalálozási időpontokat. Minden törés megfelel legalább egy elhalálozási isőpontnak. A kék görbe az EGFRvIII negatív csoporthoz, a zöld a pozitív csoport görbéjéhez tartozik. Az Y tengelyen az összes elérhető betegre számolt elhalálozási arányokat látjuk 0 és 1 között, az X tengelyen pedig a hetekre számított túlélést.

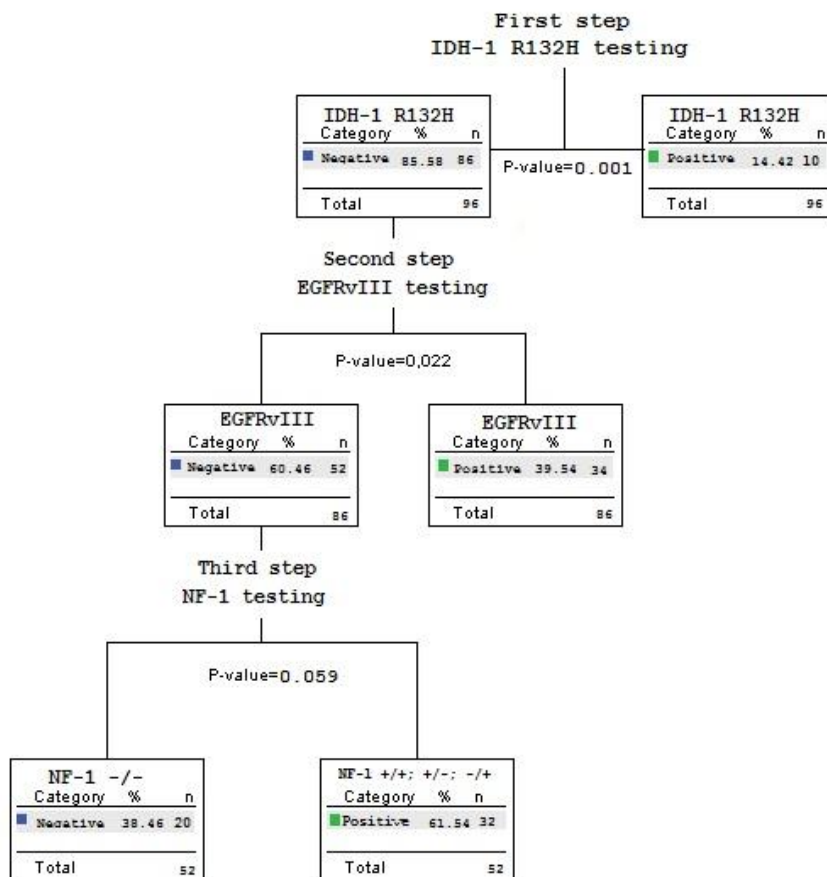
Összefoglalva elmondhatjuk, hogy az 1. kohortba foglalt beteganyag körülbelül 2/3-át lefedő három mutáció közül a legnagyobb arányban az EGFRvIII mutáció jelent meg, ez 34 főt jelentett. A második legnagyobb csoportot a neurofibromin expresszió hiány jelezte, mely 20 főnél mutatkozott. A két csoport között 2 minta mindkét markert mutatta. Az IDH-1 mutáció a legkisebb a három molekuláris alcsoport közül 10 fővel, míg további 32 fő egyik marker-alcsoportba sem volt besorolható. Az ATRX, CD133 és p53 markerek nem javították az alcsoportok meghatározását. A kor, nem és túlélési adatok az IDH-1 R132H csoportban mutattak tendencia jelleggel erős eltérést a teljes beteganyagtól. Ezek az eltérések az alábbiak:

- Az ide tartozó betegek relatíve fiatalabbak voltak
- Az ide tartozó betegek relatíve jobb túlélési adatokkal rendelkeztek

Mindez azonban a kis minta elemszám miatt csak óvatos interpretálást enged.

5.3. A molekuláris alcsoportok elkülönítése klaszterelemzéssel az 1. kohortban

Második megközelítésben, a molekuláris alcsoportok elkülönülését klaszter-analízissel vizsgáltuk az 1. kohortban. A klaszter elemzés eredményét a statisztikai „fa” illusztrálja. Számos lehetséges statisztikai fát és elágazódást vizsgáltunk meg változtatva a markereink sorrendjét az alcsoportok szekvenciális tesztelésével. A 41. Ábrán bemutatott fa volt az egyik leginformatívabb kijelzés (szignifikáns leágazásokat tartalmazó), ahol vertikálisan, fentről lefelé lehet olvasni az alcsoportok megoszlását a statisztikai p-értékekkel.

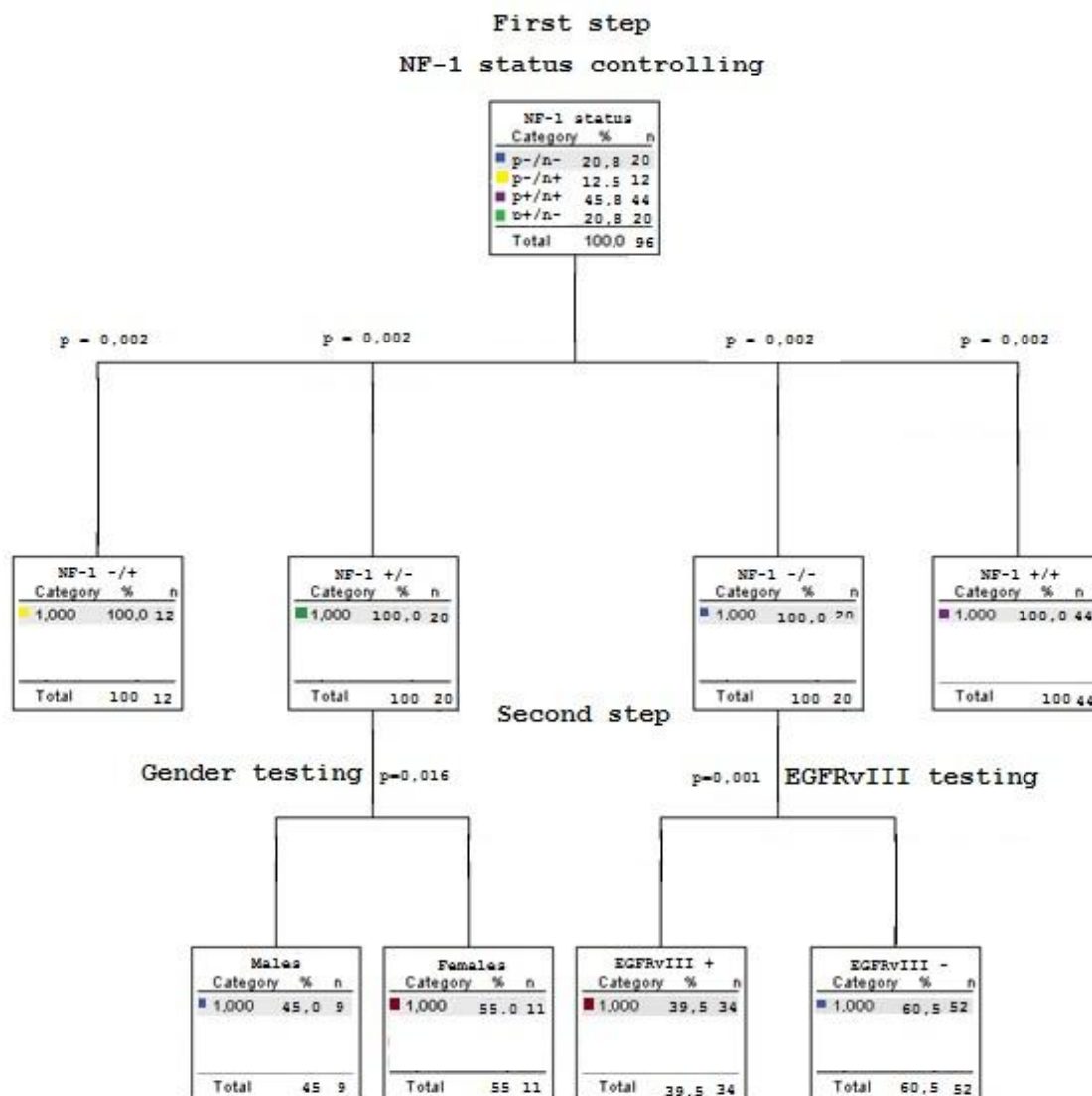


38. Ábra - Molekuláris alcsoportok elkülönítése klaszter-analízissel

A 38-as ábra bemutatja a klaszter analízis során létrehozott legrepresentatívabb statisztikai fát. Az első lépésben az IDH-1 R132H státusz elemzése történt, majd az EGFRvIII, végül az NF-1 expressziós státusz megállapítása. A fa jobb és bal oldalának leágazásai attól függenek, hogy az adott IHC teszt pozitív, vagy negatív eredményt adott. A három lépés során feltüntettük a p-értékeket is. A statisztikai program az ábrázolás során csak angol nyelvű feliratokat engedett (-/- = m-/c-; +/+ = m+/c+; +/- = m+/c-; -/+ = m-/c+).

Ahogy a 38. Ábra mutatja, az első lépésben az IDH-1 R132H mutáció jelenléte alapján különítettük el $p=0.001$ szignifikancia értékkel az erre a markerre pozitív és negatív alcsoportokat. Az elsődleges glioblastomák körülbelül 90%-a IDH-1 mutációra negatív, a másodlagos glioblastomák körülbelül 10%-a negatív. Munkánkba mi csaknem kizárólag elsődleges glioblastomát válogattunk be, csak 3 minta volt másodlagos glioblastoma, melyből mindössze 1 az IDH-1 R132H alcsoportba sorolódott. Következő lépésben az IDH-1 R132H „negatív” csoportot vizsgáltuk tovább az EGFRvIII mutáció hordozás szempontjából. Eszerint további két további csoport jön létre (pozitív és negatív) $p=0.022$ szignifikancia értékkel. Amennyiben IDH-1-re és EGFRvIII-ra is „negatív” értéket kaptunk, egy további markert, az NF-1 variánsokat vettük alapul. Ezzel a csoportot tovább lehetett bontani, a fent említett négy alcsoportra (citoplazma+/mag-; citoplazma+/mag+; citoplazma-/mag+; és citoplazma -/mag-). A statisztikai fán ebből két alcsoportot jelenítettünk meg a citoplazma-/mag- alcsoporttal szembe állítva az összes többi pozitív alcsoportot (ahol v. a citoplazma, v. a mag, vagy mindkettő pozitív). Ez a lépés azonban már csak tendencia jelleggel különítette el az NF-1 negatív és pozitív alcsoportokat, és kissé a formális statisztikai szignifikancia érték felett volt ($p=0.059$), valószínűleg az alcsoportok lecsökkent száma miatt.

Mint említettük, további statisztikai fákat is nyertünk a klaszter elemzéseink során, melyek eltérnek a 41. Ábrán bemutatottól, de matematikailag a közöttük lévő korrelációk szintén hitelesek. Egy ilyen alternatív osztályozási rendszert mutat be a 39. Ábra. Azonban mi a 38. Ábrán bemutatott fát találtuk a legillusztratívabbnak, mely egyben a manuális elemzés 16. és 17. Ábrákon bemutatott eredményeivel is teljes mértékben összhangban áll.



39. Ábra - Egy alternatív osztályozási rendszer

A 39-es ábra egy másik statisztikailag létrehozott fát ábrázol. Ennek felépítése hasonló logikát követ, mint a 38-ös ábráé, viszont itt az NF-1 státusz meghatározása volt a bevezető lépés. Ezt követően nemi és EGFRvIII megoszlásra is teszteltük a leágazásokat. Az IDH-1 R132H státusznak itt nem volt szignifikáns jelentősége. Ezt és a többi alternatív fát statisztikailag a 38-as ábrán bemutatott fával szemben inferiornak ítéltük (-/- = m-/c-; +/+ = m+/c+; +/- = m+/c-; -/+ = m-/c+).

A 39. Ábra megjeleníti számunkra a fordított logika elvét, amikor is az alsoportokat nem az IDH-1 alapú szeparálással, hanem az NF-1 expressziós és mutáns variánsok alapján kezdjük. Ez négy lehetséges kimenetet ad:

- 1 a citoplazma és a magok is pozitív festődést mutatnak [m+/c+]
- 2 a citoplazma pozitív, de a magok negatív festődést mutatnak [m-/c+]
- 3 a citoplazma negatív, de a magok pozitív festődést mutatnak [m+/c-]
- 4 a citoplazma és a magok is negatívak [m-/c-]

A négy alcsoport mindegyikét teszteltük a nemek megoszlása, valamint az EGFRvIII marker szerint is. Ezeknek a lépéseknek a matematikai érdekessége, hogy csak két esetben adtak statisztikailag szignifikáns eredményt. A m-/c+ csoport esetében a nemek, a m-/c- csoportnál pedig az EGFRvIII adott szignifikáns eredményt ($p=0,016$ és $0,001$). Ez alapján akár a nemek megoszlása is fontos tényező lehetne, amit a második lépés jelenít meg a fa bal alsó oldalán (A jobb érthetőség kedvéért a második lépésnél csak a szignifikáns eredményt adó nem és EGFRvIII leágazásokat tüntettük fel). A jobb alsó oldalon a nemekkel szimultán az EGFRvIII-as változó megfigyelése is beiktatásra került. A beteganyag klinikai kimenetelei azonban nincsenek jó korrelációban ezzel a felosztással, sőt semmilyen korrelációt nem sikerült kimutatni (pl. a nemek és a túlélés, vagy a mutációk megjelenése kapcsán), így ez csak egy statisztikailag lehetséges megközelítés maradt.

5.4. A molekuláris alcsoportok és atúlélési adatok korrelációja az 1. kohortban

A tanulmányban részt vevő 96 beteg közül 68 beteg klinikai adataiból sikerült a túlélési információkat kinyernünk (5. táblázat). A túlélést hetekben adtuk meg. A túlélést két biztosan megállapítható dátumhoz kötött időpont szerint határoztuk meg. A kiindulópont a műtéti dátum volt, tehát a kemo- és sugárterápiát megelőző műtéti beavatkozás időpontja. A végpont pedig a beteg elhalálozási dátuma. Minden nyolcadik nap +1 hétnak számít táblázatunkban, ahol pedig a túlélés 7 napon belül maradt, ott ez a szám 1 hét. A betegek elhalálozási dátumai ott voltak elérhetőek, ahol a betegek a kórházban hunytak el. Azoktól, akik otthonukban tartózkodtak az elhalálozás pillanatában, nem maradt fenn pontos dátum információ, az azokhoz való hozzáférést kizárólag a hozzátartozókon keresztül lehetett volna elérni, amitől kegyeleti okokra és az igen nagy mintaszámra való tekintettel elvetettünk. Három beteg jelen értekezés megírásának pillanatában még életben volt, ezt az alábbi táblázatban is feltüntettük. A három alcsoportban talált túlélési adatokat egymással is összevetve levonhatjuk a konklúziókat. 95%-os konfidencia szint mellett számított Cox-regresszió analízis segítségével a kapott p-értékünk $p=0,386$ -nak adódott. Eszerint a három alcsoport túlélése között nincs

szignifikáns különbség, azok között maximum tendenciájukban lehet eltérés (az viszont egyértelműen látszik). Ezek a tendenciák az alábbiak:

- 1) Az IDH-1R132H pozitív csoportban a betegek átlagos életkora körülbelül 10%-al alacsonyabb, mint a többi csoportban.
- 2) Az IDH-1R132H pozitív csoport átlagtúlélése csaknem kétszer mutatkozott hosszabbnak, mint a többi csoportban (a kiugró adatok nélkül*).
- 3) Az NF-1 m-/c- csoportban az átlag túlélési adatok 6-8%-al rövidebbnek mutatkoztak, mint a többi csoportban (a kiugró adatok nélkül*).
- 4) Az EGFR+EGFRvIII+ csoport átlag életkorát és átlag túlélését tekintve rásimul az átlagértékekre, meghatározza (nagyobb létszámaival) a teljes beteganyag mutatóinak arányát.

* A túlélés szempontjából kiugró értéknek tekintettük a műtétet követő egy héten belüli elhalálozást, valamint az, ha a beteg a dolgozat megírásának időpontjában még életben volt.

Az alcsoportok erősen eltérő minta elemszáma, valamint az egyes alcsoportok (ld. IDH-1+ alcsoport) kis elemszáma csak óvatos interpretálást enged számunkra. Minden bizonnyal kijelenthető, hogy a kapott p-érték eredménye is ebben keresendő. Egy prospektív tanulmány, ahol a teljes klinikai adat-repertoár rendelkezésre áll, már folyamatban van.

Szövettani szám	Nem	Műtéti életkor	Túlélés hétben	Szövettani szám	Nem	Műtéti életkor	Túlélés hétben
11192/00	nő	67	66	15234/08	nő	59	176
13439/01	férfi	66	11	8236/09	nő	54	364
10342/02	nő	54	9	13532/09	nő	56	13
4514/03	nő	34	1	14650/09	férfi	73	30
5017/03	nő	68	69	21656/09	férfi	40	43
7255/03	férfi	51	133	3606/10	nő	51	296
9478/03	férfi	41	2	6137/10	férfi	71	4
14588/03	férfi	50	111	10484/10	nő	32	17
17729/03	nő	49	24	14480/10	nő	68	9
15723/04	nő	58	4	2256/11	nő	61	99
4053/05	nő	72	39	3828/12	nő	65	1
6565/05	férfi	50	4	14072/12	férfi	26	21
8626/05	nő	56	47	15021/12	férfi	71	34
11396/05	férfi	53	9	15755/12	férfi	77	4
11424/05	férfi	51	30	4102/13	nő	82	39
13602/05	nő	64	43	5641/13	nő	45	184 (most is él)
16190/05	nő	34	1	6952/13	férfi	50	1
19701/05	nő	66	107	7718/13	férfi	68	32
7028/06	férfi	64	9	11356/13	férfi	72	4
7269/06	férfi	51	6	624/14	férfi	61	56
7367/06	férfi	58	11	1012/14	férfi	77	4
12989/06	nő	71	26	1748/14	nő	74	34
19313/06	nő	65	4	1749/14	nő	74	34
578/07	férfi	47	9	1750/14	nő	74	34
8139/07	nő	78	90	4834/14	férfi	71	137 (most is él)
9920/07	nő	68	36	10436/14	férfi	71	13
10845/07	férfi	58	26	8070/16	nő	78	2
11466/07	férfi	72	13	3718/15	férfi	72	56
2400/08	férfi	54	9	8473/15	férfi	73	47
2621/08	férfi	63	13	9536/15	nő	69	21
3125/08	nő	59	19	16945/15	férfi	66	60 (most is él)
12820/08	nő	61	51	18243/15	nő	74	154
12993/08	nő	76	15	22344/15	nő	58	13

5. Táblázat – Beteganyagunk túlélési adatai

Az 5.Táblázat megjeleníti a teljes beteganyagunk összes adatát a nem, műtéti életkor, valamint a túlélés hetekben megadott értékével. A betegeket egymástól a MEOK Patológiáján adott szövettani számok alapján különítettük el.

5.5. A molekuláris mintázat hosszmetzeti változása a 2. kohortban

A második kohortot (összesen 8 fő és a hozzájuk tartozó 18 FFPE blokk) egy másfajta elemzésnek vetettük alá. Az itt elvégzett IHC tesztek a molekuláris mintázat időbeli változásai alapján vettük figyelembe egyéni szinten belül. Ezek alapján kijelenthető, hogy a tumorokban az idő során számottevő változást nem tapasztaltunk a mutációs mintázatban az alkalmazott kevés markerrel, azonban bizonyos expressziós mintázat változások mégis megfigyelhetőek voltak.

A fő kérdés a második kohort recidíváinak molekuláris genetikai profiljának megváltozása volt az időben előre haladva (6. táblázat). Elsőként az IDH-1 státusz ellenőrzése történt meg. A 2. kohortba tartozó nyolc beteg tumorai közül egy sem bizonyult IDH-1 R132H pozitívnak. Vagyis sem a primer, sem a recidíva tumorok nem rendelkeztek ezzel a mutációval, ami a kis betegszám (nyolc) és az IDH-1 R132H mutáció 10%-os előfordulása alapján nem volt meglepő. A második körben az NF-1 tesztelésére került sor. Státuszváltozás egyedül a „4-es” betegnél történt, akinél a primer daganatban nem tapasztaltunk anti-NF-1 festődést, míg a recidívában már a magban igen. Az EGFR tesztelést a Histoscore értékekkel végeztük (festődési intenzitás szorozva a festődött sejtek százalékaival), a recidívák esetén vagy körülbelül ugyanolyan, vagy magasabb értéknek adódtak, mint az első tumor esetében. Ez teljesen megfelel a nemzetközi irodalom alapján várható értékeknek (Verhaak és mtsai, 2010; Louis és mtsai, 2016). Az EGFRvIII státusz a második kohort túlnyomó többségben pozitívnak adódott, mely a kis minta elemszám alapján véletlenszerűnek tekinthető. Az EGFRvIII státusz primer-recidíva összehasonlításban nem változott. Az ATRX antitestünk festődése azonban éppen az eddigiek fordítottja, mivel a recidívák esetében az ATRX IHC státusza festődése több betegnél negatív lett. A p53 és CD133 esetében pedig semmiféle változást nem tapasztaltunk a második kohort primer és recidív tumorai között (6. táblázat).

Betegek	NF-1 m-/c+ / m-/c-	EGFR Membrán Histoscore	EGFRvIII +/-	IDH-1 +/-	p53 Nukleusz Histoscore	ATRX Nukleusz Histoscore
Beteg 1 / 1. minta	-	n.e.	+	-	136	70
Beteg 1 / 2. minta	-	81	+	-	174	0
Beteg 2 / 1. minta	+	156	+	-	186	80
Beteg 2 / 2. minta	+	176	+	-	62	0
Beteg 3 / 1. minta	+	0	-	-	0	216
Beteg 3 / 2. minta	+	180	-	-	216	12
Beteg 4 / 1. minta	-	249	+	-	237	98
Beteg 4 / 2. minta	+	273	+	-	174	216
Beteg 5 / 1. minta	+	150	+	-	126	18
Beteg 5 / 2. minta	+	79	+	-	276	0
Beteg 6 / 1. minta	+	76	+	-	237	195
Beteg 6 / 2. minta	+	234	+	-	60	148
Beteg 7 / 1. minta	+	234	+	-	228	32
Beteg 7 / 2. minta	+	152	+	-	118	87
Beteg 8 / 1. minta	+	150	+	-	159	0
Beteg 8 / 2. / a minta	+	264	+	-	213	0
Beteg 8 / 2. / b minta	-	210	n.e.	-	216	156
Beteg 8 / 3. minta	+	255	+	-	172	152

6. Táblázat – A 2. kohort IHC eredményei

A 6-os táblázatban a második kohort IHC eredményeit foglaltuk össze. A + és – jelölések az adott teszt pozitív, vagy negatív eredményére utalnak. A szám adatok HistoScore értékek, amelyek a statisztikai elemzések során nyújtottak számunkra segítséget. Ezek értéke 0 és 300 között változott. Sárgával jelöltük, ahol az egy betegtől származó minták között pozitív / negatív eltérést tapasztaltunk az első műtéti anyaghoz képest az általunk vizsgált molekuláris genetikai profilban.

6. Diskusszió

6.1. A glioblastoma molekuláris jellegzetességei

Ebben a tanulmányban 8, a TCGA elemzések eredményei alapján kiválasztott markert teszteltünk a glioblastoma molekuláris alcsoportjainak elkülönítése céljából. Ezeket a markereket archivált FFPE glioblastoma tumorokban, rutin szövettani módszerekkel, immunhisztokémiával tudtuk megvizsgálni. Az 1. kohort 96 mintájában megvizsgáltuk a minták szétválasztását a 8 molekuláris marker kvantitatív és kvalitatív expressziója alapján, és megvizsgáltuk a klinikai paraméterek korrelációját a markerként definiált alcsoportokkal. Ezek alapján négy marker bizonyult meghatározónak a molekuláris osztályozás szempontjából. Ezek az EGFR és az EGFRvIII együttes pozitivitás, a neurofibromin (NF-1) expresszió teljes elvesztése, valamint az IDH1 R132H mutáció pozitivitás. A többi marker a molekuláris alcsoportok elkülönülését érdemben nem befolyásolta.

Eredményeink alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a TCGA OMIC elemzések kulcsfontosságúnak bizonyuló néhány markerének alkalmazásával, a fő glioblastoma molekuláris altípusok azonosítása a klinikai FFPE blokkokban is megvalósítható (16. 17. és 35. Ábrák). Az EGFR+EGFRvIII ko-pozitívitas, a neurofibromin negativitás, valamint az IDH-1 R132H pozitívitas meghatároznak egy-egy elkülönülőnek látszó csoportot/klasztert. A legnagyobb csoport az EGFRvIII mutáns csoport, mely a teljes mintaszám harmadát képviselte. A legkisebb pedig az IDH-1 R132H pozitív csoport, amely kb. a teljes mintaszám tizedét adta. Az NF-1 dupla negatív csoport az összes anyagunk ötödét tette ki. A kiválasztott markerek átfedése miatt az általunk IHC módszerrel meghatározott és a TCGA OMICS módszerekkel elkülönített (proneurális, klasszikus és mezenhimális) alcsoportok közötti átfedés nagyon valószínű. Eredményeink nemcsak reprodukálják a molekuláris alcsoportok elválasztását a klinikai glioblastoma mintákban, de ezeknek a molekuláris alcsoportoknak a százalékos megoszlása is hasonló a TCGA network adataihoz [TCGA Research Network, 2008, Verhaak és mtsai, 2010]. Eredményeink szintén egyetértésben állnak más szerzők korábbi munkáival a kulcs markerek azonossága, az alcsoportok szétválasztása és aránya, valamint bizonyos klinikai korrelációk tekintetében, bár ez utóbbi pont további megerősítést igényel a tanulmányainkban valós időben gyűjtött klinikai adatokkal [Cai és mtsai, 2016; Olar és mtsai, 2014; Mercier és mtsai, 2012, Conroy és mtsai, 2014, Aubry és mtsai, 2016].

Vizsgálatunkban általánosságban a betegek neme nem mutatott differenciális eloszlást a glioblastoma molekuláris alcsoportjaiban, és nem mutatott semmilyen kapcsolatot a betegség kialakulásának korával vagy az általános túléléssel. Azonban az IDH-1 R132H státuszhoz társuló hosszabb túlélés anyagunkban is erős tendencia jelleggel megmutatkozott: Azok a betegek, akiknek a tumorában IDH-1 R132H szomatikus mutációt detektáltunk a betegség kezdetekor fiatalabbak voltak, és hosszabb túlélést mutattak a mutáció nélküliekhez képest, a TCGA adatokkal összhangban [Verhaak és mtsai, 2010]. Mivel azonban csak 10 betegnek volt glioblastomája ezzel a mutációval, a korrelációs analízisekben a „power” hiány miatt statisztikailag szignifikáns p-értékeket nem találtunk. Összességében az IDH-1 R132H státusz fontos prognosztikai markernek látszik tanulmányunkban, melynek tesztelése a hétköznapi rutinban célszerű.

A 2. kohortban, amely nyolc beteget foglalt magába, több mint egy sebészeti reszekcióból származó tumormintát tudtunk vizsgálni. Ez a kisméretű kohort, bár statisztikai vizsgálatokhoz nem alkalmas, mégis tükrözni képes, hogy a glioblastoma tumorok legalább részben megtartják fő molekuláris jellemzőiket az idő múlásával. Mindazonáltal korlátozott adataink arra is utalnak, hogy néhány klonális változás bekövetkezhet idővel a daganatok szomatikus mutációs profiljában, de a mintavétel, az intratumor heterogenitás és a 2. kohort kis minta száma bonyolíthatja ezenváltozások interpretálását.

Megfigyeléseink összhangban vannak a WHO glioma osztályozásának 2016-os módosítási javaslatával, amely javasolja a molekuláris markereknek a tumorok hisztopatológiai alapú besorolásába való integrálását, valamint a glioblastomák szétválasztását az IDH mutációs státus szerint pozitív és negatív alcsoportokra [Louis és mtsai, 2016]. Ennek megfelelően az IDH-1 R132 pozitív glioblastomák határozottan elválaszthatók a többi glioblastoma alcsoporttól, és a TCGA proneurális altípusnak megfelelő alcsoportot képviselik [Verhaak és mtsai, 2010] (8, 9 és 29. Ábra). Az IDH-1 R132H pozitív státus egyben jelentős mértékben (bár nem teljességben) differenciálisan jelenik meg az elsődleges és a másodlagos glioblastomákban (lásd a bevezetésben szereplő ábrákat).

Míg a WHO glioma-osztályozás 2016-os revíziója nem javasolja további markerek alkalmazását és a glioblastoma molekuláris alcsoportok további szétválasztását, eredményeink azt sugallják, hogy a kiegészítő kulcsmarkerek segítségével a főbb molekuláris alcsoportok elkülönítése nemcsak megvalósítható, hanem hasznos is a klinikai döntéshozatal

támogatásához. Molekuláris megfigyeléseink validálásához és a klinikai korrelációk pontosabb meghatározásához azonban szükség van egy prospektív vizsgálatra, amelyben sebészeti daganatminták gyűjtése a valós idejű klinikai paraméterek gyűjtésével együtt fog történni. Egy ilyen prospektív tanulmány jobb betekintést nyújthat abban a kérdésben, hogy a molekuláris glioblastoma alcsoportok hogyan különböznek egymástól a biológiai tulajdonságaik alapján. Ha meg tudjuk erősíteni a glioblastoma IHC-alapú alcsoportok szétválasztását és az alcsoportok szoros társulását a tumorok biológiai tulajdonságaival, akkor indítványozni fogjuk egy molekuláris diagnosztikus panel létrehozását, mely prognosztikus és a személyre szabott terápiát támogató információval szolgálhat a jövőben a klinikai gyakorlat számára.

Az NF-1 festődés (neurofibromin expresszió) alapján kirajzolódott négyféle mintázat mögött több ok is állhat. Ilyen okok lehetnek például gén deléció, mutáció vagy epigenetikai szabályozás miatti változás a gén expressziós mintázataiban, az antitest felismerésben szerepet játszó epitópok törlődése, vagy az antigén megváltozott lokalizációja. Ennek hátterét további kutatásokkal lehetne biztonsággal tisztázni, de az eddigi adatbázis és irodalmi adatok is lehetőséget adnak néhány következtetésre.

Glioblastomában gyakori a teljes gén deléciója, vagy a teljes 17q kar deléciója. Ezen kívül, mint a neurofibromatózis nevű örökletes, csírvonal-beli *NF-1* gén deléciókkal és mutációkkal társuló betegségben, glioblastomában is előfordulnak kisebb, génen belüli szomatikus deléciók (lásd a bevezető 2.3.3-as fejezetét). A deléciók és frameshift mutációk következtében a neurofibromin fehérje expressziója csökkenést mutathat, és lokalizációja is megváltozhat.

Egy csonkolt, kisméretű mutációs termék például nem feltétlenül juthat ki a sejtmagból, így amennyiben az NF-1 specifikus antitest epitópját kifejezi, úgy kizárólag a magban fog pozitív jelet adni. A 43-as alternatív exon beépülése szintén sejtmagi lokalizációt okoz (a 43-as exon felel a nukleusz lokalizációs szignálért) [Vandenbroucke és mtsai, 2004; Way és mtsai, 2017; Viczaíno és mtsai, 2015; Xie és mtsai, 2016; Verhaak és mtsai, 2010].

Érdeemes röviden áttekinteni az IHC által kimutatott fehérje-expressziós mintázatokban megfigyelt variációkat, amelyek gyakran különböznek a nem daganatos agyszövet-expressziós mintázataitól. Vizsgálataink célja nem a genomikai és genetikai variációk (szomatikus mutációk és átrendeződések) feltárása volt a glioblastomák szubcelluláris fehérje

expressziós mintázatainak háttérében, mindazonáltal szeretnénk felhívni a figyelmet néhány, a vizsgálat értelmezésére vonatkozó összefüggésre. Az *NF-1* gén termék, a neurofibromin fehérje egy fontos tumor szuppresszor molekula, mely normálisan a citoplazmában expresszálódik. Az *NF-1* gént érintő leggyakoribb mutáció tumorokban a 17-es kromoszóma hosszú karjának elvesztése vagy a q11.2 régió deléciója, amely a fehérje expresszió részleges vagy teljes elvesztését eredményezi. Ezenkívül számos pontmutáció, valamint kisebb és nagyobb inszerció és deléció léphet fel, amely befolyásolhatja a neurofibromin fehérje expresszióját, szubcelluláris lokalizációját és epitope változás miatt IHC detektálhatóságát (McKeever és mtsai, 1996; Vandenbroucke és mtsai 2004; Liu, és mtsai, 2015). Továbbá ismert számos olyan mutáció is, amely a teljes fehérje vagy a neurofibromin peptidek magban történő retencióját okozzák. Missense és nonsense mutációk szintén megváltoztathatják a neurofibromin epitópjait, amelyek egy adott monoklonális antitesttel való kimutathatóságuk elvesztését, és így negatív IHC festődést eredményezhetnek. Ezeknek a változtatásoknak a fehérje szinten történő feltérképezése átfogó megközelítést igényel, például (következő generációs) genom vagy gén szekvenálást, a 17q11.2 régió FISH analízisét, vagy a transzkripciós mintázatok elemzését. Habár a TCGA adatbázis részletes információkat [The Cancer Genome Atlas Network, 2008] nyújt az NF-1 genotípus-fenotípus korrelációit illetően, a neurofibromin négy általunk megfigyelt expressziós mintázatának további tanulmányozása folyamatban van laborunkban.

Az EGFR és az EGFRvIII IHC festés szintén tartalmazott néhány sajátos, tumorra jellemző fehérjeexpressziós mintázatot a szokásos mintázatokkal szemben. Általánosságban főleg sejt membrán festődést figyeltünk meg, hasonlóan a normál sejtekben észlelt festődéshez. Azonban néhány mintában és néhány sejtben citoplazmatikus és perinukleáris festődést is láttunk. Az EGFR-t kódoló gén a 7p13-q22 kromoszóma régióban található [Kondo és munkatársai, 1983]. A glioblastoma esetében a leggyakoribb EGFR gén mutáció a kópiaszám változás, különösen az amplifikáció (a daganatok körülbelül 30%-ában detektálható, mely megmagyarázza az EGFR protein IHC módszerrel talált upregulációját anyagunkban), de az egész gén deléciója is előfordulhat. Az mRNS érése és translációja során a receptorhoz kapcsolódó molekulák intracitoplazmatikus organelumokon keresztül érik el a teljes kiérésüket. Ennek megfelelően receptor epitópok lehetnek jelen a mag körül, de a citoplazmán belül is (Golgi, endoszómák, endoplazmatikus retikulum és még a mitokondriumban is). Általában ezek a festési mintázatok nem vagy csak kis mennyiségben fordulnak elő. Azonban, amikor az EGFR (és az EGFRvIII) gén amplifikálódik, és a keletkező fehérjemolekulák

mennyisége is megnövekszik, a köztes termékek szokatlan szubcelluláris lokalizációban is fokozottan detektálhatóvá válhatnak [Lopez-Gines és munkatársai, 2010, Dasari és munkatársai, 2012]. Az EGFR / EGFRvIII molekulák funkcionális aktivitása ilyen szubcellularis elhelyezkedésben jelenleg még nem tisztázott.

A p53 tumorszuppresszor gén mutációi számos rák típus növekedésének és progressziójának elősegítésében játszanak szerepet. Általában a fehérje a magban található. Saját glioblastoma mintáink tanulmányozása során is ezt tapasztaltuk. A p53-at kódoló gén a 17p3 kromoszómális régióban található [Miller és munkatársai, 1986], ahol „forró pontok” vannak jelen a kromoszóma törés és kar deléción kialakulásához, melyek a p53 fehérje expressziójának hiányát eredményezhetik. A pontmutációs „forró pontok” közé tartoznak a 175, 245, 248, 249, 273 és 282 kodonokat érintő mutációk, amelyek megváltoztatják a fehérje funkcióját vagy izoformáját, valamint lokalizációját a sejten belül. Következésképpen a molekula a sejtmag helyett a citoplazmában is megjelenhet, amelyet mi nem figyeltünk meg glioblastoma mintákban, de más szerzők leírták [Smardova és munkatársai, 2013; Kawasoe és mtsai, 2015; Murnyák és mtsai, 2016].

A glioblastoma molekuláris alcsoportjainak meghatározásától, valamint az alcsoportokhoz kapcsolható túlélési különbségek feltárásától nem csak egy olyan algoritmus kidolgozását tervezzük, amely klinikai prognosztikai jelentőséggel bír. Tesztelt molekuláris markereink egyben új terápiás célpontokat jelenthetnek. Több ilyen terápia kidolgozása már kísérletes és pre-klinikai fázisban van.

Ilyen megközelítések például az EGFRvIII ellen irányuló – technikailag nagyon széles spektrumot lefedő – molekuláris alapú terápiák, mint az EGFRvIII elleni antitestek, kis molekulájú tirozin kináz gátlók, vakcinák, és RNS alapú terápiák. Bár eddig még humán tesztelés során is áttörést hozó EGFRvIII specifikus terápia nem született, a klasszikus alcsoportba tartozó betegek EGFRvIII specifikus (és kombinációs) hatékony kezelése valószínűleg csak idő kérdése [Schuster és mtsai, 2015; Swartz és mtsai, 2014].

Egy másfajta terápiás megközelítés a kimérikus antigénreceptorral rendelkező mesterséges T limfociták, a CAR T sejtek alkalmazása. Ezeknek a T sejteknek az antigén felismerő receptora tetszőleges specificitásúra alakítható ki, így képesek lehetnek bármilyen kiválasztott mutációval rendelkező, pl. EGFRvIII-t expresszáló sejteket célpontként felismerni és

eliminálni [Sridhar és mtsai, 2017; Brown és mtsai, 2015; Walseng és mtsai, 2017; Yeku és mtsai, 2017].

Az IDH-1 R132H elleni terápia kérdése már az előző évtized második felében aktuális kérdés volt. Azóta egyre inkább fejlődő hatékonyságú készítmények és vakcinák látnak napvilágot, bár még ezek is csak preklinikai fázisban vannak [Szopa és mtsai, 2017; Ranjit és mtsai, 2015; Kim és mtsai, 2017;

<https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=Glioblastoma&term=idh1&cntry1=&state1=&Search=Search> Elérés dátuma: 2017.09.12.].

Az NF-1 tumor szuppresszor molekula expressziós és funkcionális zavarainak javítására irányuló terápiaik szintén fontos irányvonalat képviselhetnek, ráadásul nem csak glioblastomában, hanem számos egyéb daganatban is jelentőséggel bírhatnak. Ennek ellenére áttörő siker még nem született ezen a téren. NF-1 expressziót vagy funkciót helyreállító terápia nem elérhető, bár a károsult RAS jelátviteli útvonalat blokkoló beavatkozások már részben elérhetők [See és mtsai, 2012; Liu és mtsai, 2014; Tang és mtsai, 2012].

Az itt meghatározott glioblastoma alcsoportok mélyebb molekuláris jellemzése azért is fontos lesz a jövőben, hogy az itt felsorolt markereinkkel társuló, driver géneket érintő mutációs profilok alapján a betegek célzott és több molekuláris útvonalat is befolyásoló komplex terápiát kaphassanak. Ilyen terápiaik fejlesztése már folyamatban van, vagy más tumorokban alkalmazást is nyert.

6.2. Következtetések

Összességében vizsgálataink arra a kérdésre adtak választ, hogy a klinikai FFPE glioblastoma minták fő molekuláris alcsoportjai a histopatológiai laborban elérhető módszerek alkalmazásával elkülöníthetők-e a korábbi genom-szintű kutatások eredményeivel összhangban. Ez a megközelítés képes volt glioblastoma mintáink 2/3-át osztályozni olyan molekuláris alcsoportokba, amelyek a hasonló kulcsmarkerek alapján valószínűleg átfedésben vannak a korábban javasolt TCGA alcsoportokkal. Mivel azonban ez a tanulmány retrospektív természetű volt, a túlélési adatokat csak a betegek 2/3-ában tudtuk a dokumentációból kinyerni. Ezért a klinikai korrelációs elemzésekben túl kicsivé vált az alcsoportokra jutó mintaszám. Mindazonáltal, még ezen korlátozás mellett is határozott

tendenciákat figyelhettünk meg, különösen az IDH-1 R132H mutációt hordozó tumorok esetében. Az ezzel a mutációval rendelkező egyének korai betegség megjelenéssel és hosszabb általános túléléssel rendelkeztek, összehasonlítva azokkal, akiknek a tumorában nem volt jelen az IDH-1 R132H mutáció. A jelen vizsgálatot egy új tanulmányban prospektív minta és a klinikai adatgyűjtéssel kiterjesztjük, hogy eredményeinket reprodukáljuk és a glioblastoma molekuláris alcsoportok biológiai tulajdonságait pontosabban meghatározzuk. Tanulmányaink végső sikere egy klinikai diagnosztikai panel létrehozását eredményezheti a prognózis és a terápiás megfontolások támogatása érdekében.

7. Az értekezés új eredményei

- A TCGA fagyasztott mintákon OMICS módszerekkel nyert adataiból felállított molekuláris alcsoportokat a klinikai rutinban használható FFPE blokkokon, a hétköznapi klinikai rutin eljárásokkal (IHC) vizsgáltuk meg és reprodukáltuk.
- Az IHC-val létrehozott molekuláris alcsoportokat a betegek klinikai adataival korreláltuk.
- A WHO legfrissebb glioma klasszifikációs ajánlását tovább finomítottuk, hiszen elemzésünk bizonyította, hogy az EGFR^{vIII} és az NF-1 mutációs státusz vizsgálata klinikai jelentőséggel bírhat az IDH-1 mutációs státusz meghatározása mellett és azon túl.
- Vizsgálataink eredményeinek prospektív mintákon való megerősítése folyamatban van, és amennyiben első tanulmányunk következtetései bizonyítást nyernek, úgy egy klinikopatológiai algoritmus kialakítása lesz várható a glioblastomás betegek prognózisának és majd célzott terápiás lehetőségeiknek a feltérképezése érdekében.
- Felismertük, hogy a recidívák – még ebben a kis minta elemszámú tanulmányban is – nagy vonalakban megőrzik molekuláris profiljukat, a tumorban részben lezajló klonális evolúciós tendenciák ellenére is.

8. Összefoglalás

A glioblastoma a leggyakoribb és legrosszindulatúbb primer glioma felnőttekben. Medián túlélése alig éri el az egy évet és az öt éves túlélése is öt százalék alatt marad. Jelenlegi standard kezelése a lehető legteljesebb sebészeti eltávolítás, amelyet sugár és temozolomid alapú kemoterápia követ (Stupp protokoll). A glioblastoma a WHO besorolás szerint IV-es gradusú glioma, amely nagyfokú inter és intratumor heterogenitással rendelkezik. Jellemzők rá a nekrotikus területek megjelenése, a glomerulus szerű érhálózat benövések, a cellularitás és a polimorfizmus. Tünetei változatosak, és a tumor megjelenésének lokalizációjától is függenek. Két formája létezik, az azonnal glioblastomaként azonosított primer glioblastoma, valamint az alacsonyabb gradusú gliomákból transzformálódott szekunder glioblastoma. Utóbbi jobb prognózissal rendelkezik. A TCGA és Verhaak munkacsoportjának 2010-es eredményei óta ismerjük, hogy a glioblastoma molekulárisan alcsoportokra bontható. Mindegyik alcsoport jellegzetes genetikai és anyagcsere zavarokkal rendelkezik. A négy alcsoport: klasszikus, mezenhimális, neurális és proneurális. Az alcsoportokat klaszter analízissel választották szét egymástól, ezért bizonyos átfedések előfordulnak közöttük. Ennek ellenére a klasszikus alcsoportra főleg az EGFR mutációk jellemzőek (leggyakrabban az EGFR ν III), valamint a *PTEN* expressziós szintjének csökkenése. A proneurális alcsoportra ezzel szemben az IDH-1 R132H mutáció megjelenése a jellemző, valamint a TP53 gén mutációi. A mezenhimális alcsoportban az NF-1 és a *PTEN* mutációk jelennek meg. A neurális alcsoportra ilyen jellemző mutációs mintázatot nem sikerült felvázolni. Ezzel mintegy párhuzamban, az alcsoportok nem csak molekulárisan, hanem az érintett betegek klinikai adatait összevetve is elkülöníthetőek egymástól. A legjobb prognózissal a proneurális alcsoportoz tartozó glioblastomás betegek rendelkeznek. Itt gyakoriak a szekunder glioblastomák. A mezenhimális alcsoport betegek ezzel ellentétben rosszabb prognózissal néznek elébe. A MEOK Patológia osztályán 2000 óta összegyűlt glioblastoma mintákon – saját tanulmányunkban – FFPE blokkokból IHC tesztek végeztünk. Megvizsgáltuk a GFAP, NF-1, EGFR, EGFR ν III, P53, ATRX, IDH-1 R132H, valamint a CD133 IHC markerek alapján a glioblastoma alcsoportok elkülönülését. A kapott alcsoportokat ezután összevetettük a beteganyag klinikai adataival (nem, műtéti életkor, valamint teljes túlélés). Statisztikai elemzéseink eredményei alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy – bár beteganyagunk viszonylag kicsi volt, mindössze 104 fő – rutin eljárásokkal (IHC, pirosekvenálás) és markerekkel FFPE blokkokból kimutathatóak a fent felsorolt molekuláris alcsoportok. Markereink között több olyan is szerepel, amely fontos lehet terápiás célpontként is. Noha

statisztikailag nem sikerült minden esetben szignifikáns különbségeket kimutatnunk a klinikai korrelációkban, bizonyos tendenciákat sikerült felismernünk. Az IDH-1 R132H mutációt hordozó betegek valamivel fiatalabbak voltak, túlélésük pedig relatíve hosszabbnak mutatkozott, mint a mutációt nem hordozóké. Ezzel szemben az NF-1 expresszióhiányt mutató betegek túlélése rövidebbnek adódott. Eredményeink összhangban vannak a WHO legfrissebb eredményeivel, hiszen klaszter analízisünk során is első lépésként az IDH-1 R132H pozitív és negatív csoportok szétválasztása volt a legszignifikánsabb. Ezen kívül a glioblastomák osztályozása szempontjából még további két marker bizonyult fontosnak, az EGFRvIII, valamint az NF-1, melyek bizonyos kapcsolatban álltak a betegek klinikai adataival. Az eredményeink megerősítése folyamatban van egy prospektív tanulmányban, nagyobb mintaelem szám bevonásával. Tanulmányunk második kohortjában kitértünk a recidívák molekuláris változásaira az első sebészileg eltávolított mintához képest. Azt találtuk, hogy a szekvenciális tumor minták nagy vonalakban megőrzik molekuláris profiljukat némi klonális evolúció ellenére. Transzlációs tanulmányunk eredményei bizonyítják, hogy a hétköznapi rutinban nem csak lehetséges, hanem fontos is a glioblastomák osztályozása prognosztikus és terápiás célból is.

9. Summary

Glioblastoma is the most frequent and most malignant primary glioma in adults. The median survival is barely over a year and its five-year survival is below five percent. The current standard of care includes surgical removal of the tumor as completely as possible, which is followed by radiation and temozolomide-based chemotherapy (Stupp protocol). According to the WHO classification, glioblastoma is a grade IV glioma that has a high degree of inter- and intratumor heterogeneity. Main characteristics of this tumor include the appearance of necrotic areas, glomerular-like vascular growth, cellularity and polymorphism. Symptoms often vary depending on the localization of tumor. The tumor has two forms: primary glioblastoma that is first diagnosed as glioblastoma, and secondary glioblastoma that is transformed from lower grade gliomas. The latter has a better prognosis. Since the published results by the TCGA Network and the Verhaak team in 2010, we know that glioblastomas can be subdivided into molecular subgroups. Each subgroup has its own genetic and metabolic features. The four subgroups are: classic, mesenchymal, neural and proneural. As the subgroups were separated by cluster analysis, there are some overlaps among them. Nevertheless, the classic subgroup is mainly characterized by EGFR mutations (most often the EGFRvIII) and a decrease of PTEN expression level. In contrast, mutations in the TP53 gene and the appearance of the IDH-1 R132H mutation are the characteristics of the proneural subgroup. In the mesenchymal subgroup, NF-1 and PTEN mutations are frequent. Finally, there are no characteristic mutational patterns associated with the neural subgroup. In parallel, the subgroups can be distinguished not only based on their molecular profiles, but also based on the clinical parameters of the affected patients. Patients with proneural glioblastomas have the best prognosis, and secondary glioblastomas are common among them. In contrast, patients with the mesenchymal subtype have the worst prognosis. In our study, we performed IHC tests from FFPE blocks of glioblastoma samples collected since 2000 in the Pathology Department at the Markusovszky University Teaching Hospital. We investigated separation of the glioblastoma molecular subgroups based on the GFAP, NF-1, EGFR, EGFRvIII, P53, ATRX, IDH-1R132H, and CD133 IHC markers. Then we correlated the subgroups with the patient's clinical data (gender, surgical age, and overall survival). Based on our statistical analyses, we can conclude that with routine methodologies and markers (IHC and pyrosequencing) the molecular subgroups of glioblastomas may be reproduced even in a relatively small cohort of 104 patients. Several of our markers may even directly serve as therapeutic targets. Although we were unable to detect significant

differences in the clinical correlation analyses, certain trends were noted. Patients with the IDH-1 R132H mutation were slightly younger and their survival was relatively longer than those without this mutation. Conversely, the overall survival of patients with glioblastoma defective in NF-1 expression was shorter. Our results are in line with WHO's latest recommendations, as separation of the IDH-1 R132H mutant and wild type subgroups as a first step in our hierarchical cluster analysis appeared to be most significant. Furthermore, two additional markers, EGFRvIII, and NF-1, were important for the molecular classification of glioblastomas, which also had some associations with the patient's clinical data. Confirmation of our findings is underway in a prospective study involving a larger sample size. In the second cohort of our present study, we investigated changes in the molecular markers of the recurrent tumors as compared to those of the first surgically removed tumors. We found that despite signs of some clonal evolution, the sequential samples largely retained their molecular profiles. The results of this translational study demonstrate that classification of glioblastomas in the every day routine is not only feasible, but it may also have important prognostic or therapeutic values.

10. Referenciák

- Aubry M, de Tayrac M, Etcheverry A, Clavreul A, Saikali S, Menei P, et al (2016). Correction: From the core to beyond the margin: a genomic picture of glioblastoma intratumor heterogeneity. *Oncotarget*, 7(41):67685
- Bailey P, Cushing H (1926) A Classification of the Tumors of the Glioma Group on a Histogenetic Basis with a Correlated Study of Prognosis. JB Lippincott, Philadelphia
- Berghoff AS, Kiesel B, Widhalm G, Rajky O, Ricken G, Wöhrer A, et al (2014). Programmed death ligand 1 expression and tumor-infiltrating lymphocytes in glioblastoma. *Neuro-oncology*, 17(8):1064-1075
- Bottino C, Dondero A, Bellora F, Moretta L, Locatelli F, Pistoia V, et al (2014). Natural killer cells and neuroblastoma: tumor recognition, escape mechanisms, and possible novel immunotherapeutic approaches. *Frontiers in immunology*, 5(8):369
- Brown DV, Daniel PM, Giovanna MD, Gogos ANW, Morokoff AP, et al (2015). Coexpression analysis of CD133 and CD44 identifies proneural and mesenchymal subtypes of glioblastoma multiforme. *Oncotarget*, 6(8):6267
- Burger PC, Green SB (1987). Patient age, histologic features, and length of survival in patients with glioblastoma multiforme. *Cancer*, 59(9):1617-1625
- Cai J, Zhang C, Zhang W, Wang G, Yao K, Wang Z, et al (2016). ATRX, IDH1-R132H and Ki-67 immunohistochemistry as a classification scheme for astrocytic tumors. *Oncoscience*, 3(7-8):258
- Colman H, Li Z, Sulman EP, McDonald JM, Shooshtari NL, et al (2010). A multigene predictor of outcome in glioblastoma. *Neuro-Oncology*, 12(1):49-57
- Conroy S, Kruyt FA, Joseph JV, Balasubramanian V, Bhat KP, Wagemaker M, et al (2014). Subclassification of newly diagnosed glioblastomas through an immunohistochemical approach. *PloS one*, 9(12):e115687

Curran WJ, Scott CB, Horton J, Nelson JS, Weinstein AS, Nelson DF, Asbell S (1992). The influence of tumor size and location and extent of surgery on outcome for anaplastic astrocytoma: A report from three Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) trials. *J. Neuro.-Oncol*, 12:219-227

Dasari VR, Velpula KK, Alapati K, Gujrati M, Tsung AJ (2012). Cord blood stem cells inhibit epidermal growth factor receptor translocation to mitochondria in glioblastoma. *PloS one*, 7(2):e31884

Downward J, Waterfield MD, Parker PJ (1985). Autophosphorylation and protein kinase C phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. Effect on tyrosine kinase activity and ligand binding affinity. *Journal of Biological Chemistry*, 260(27):14538-14546

Dunn GP, Rinne ML, Wykosky J, Genovese G, et al (2012). Emerging insights into the molecular and cellular basis of glioblastoma. *Genes*, 15;26(8):756-84

Eder K, Kalman B (2015). The dynamics of interactions among immune and glioblastoma cells. *Neuromolecular medicine*, 17(4):335-352

Fathi AT, Nahed BV, Wander SA, Iafrate AJ, Borger DR, Hu R, et al (2016). Elevation of urinary 2-hydroxyglutarate in IDH-mutant glioma. *The oncologist*, 21(2):214-219

Flavahan WA, Drier Y, Liau BB, Gillespie SM, Venteicher AS, Stemmer-Rachamimov AO, et al (2016). Insulator dysfunction and oncogene activation in IDH mutant gliomas. *Nature*, 529(7584):110-114

Fritz L, Dirven L, Reijneveld JC, Koekkoek JA, Stiggelbout AM, Pasma HRW, Taphoorn MJ (2016). Advance care planning in glioblastoma patients. *Cancers*, 8(11):102

Forbes V, Vredenburgh J (2016). Primitive Neuroectodermal Tumor with Glioblastoma Multiforme Components in an Adult: A Collision Tumor. *Cureus*, 8(1):456

Georgiu C, Mihut E, Raus I, Mirescu ȘC, Szabo L, Sovrea AS (2015). Pediatric glioblastoma with giant cells and “supratentorial” primitive neuroectodermal component—case report and review of the literature. *Rom J Morphol Embryol*, 56(3):1165-1171

Giunti L, Pantaleo M, Sardi I, Provenzano A, Magi A, Cardellicchio S, et al (2014). Genome-wide copy number analysis in pediatric glioblastoma multiforme. *American journal of cancer research*, 4(3):293

Goldmann J, Kwidzinski E, Brandt C, Mahlo J, et al (2006). T cells traffic from brain to cervical lymph nodes via the cribroid plate and the nasal mucosa. *Journal of leukocyte biology*, 80(4):797-801

Griguer EC, Oliva CR (2011). Bioenergetics pathways and therapeutic resistance in gliomas: emerging role of mitochondria. *Current Pharmaceutical Design*, 17:2421-2427

Griguer CE, Cantor AB, Fathallah-Shaykh HM, Gillespie GY, Gordon AS, Markert JM, et al (2013). Prognostic relevance of cytochrome C oxidase in primary glioblastoma multiforme. *PloS one*,8(4):e61035

Gupta P, Han SY, Holgado-Madruga M, Mitra SS, Li G, Nitta RT, et al (2010). Development of an EGFRvIII specific recombinant antibody. *BMC biotechnology*, 10(1):72

Gusnard DA (1990). Cerebellar neoplasms in children. In *Seminars in roentgenology*25(3):263-278

Gutmann DH, Donahoe J, Brown T, James CD, Perry A (2000). Loss of neurofibromatosis 1 (NF1) gene expression in NF1-associated pilocytic astrocytomas. *Neuropathology and applied neurobiology*, 26(4):361-367

Gutmann DH, McLellan MD, Hussain I, Wallis JW, Fulton LL, Fulton RS, et al (2013). Somatic neurofibromatosis type 1 (NF1) inactivation characterizes NF1-associated pilocytic astrocytoma. *Genome research*, 23(3):431-439

Hegi ME, Rajakannu P, Weller M (2012). Epidermal growth factor receptor: a re-emerging targeting glioblastoma. *Curr Opin Neurol* 25(6):774-779

Herbst RS (2004). Review of epidermal growth factor receptor biology. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*,59(2):S21-S26

Hsu PP, Sabatini DM (2008). Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell*, 134(5):703-707

Hur H, Jung S, Jung TY, Kim IY (2008). Cerebellar glioblastoma multiforme in an adult. *Journal of Korean Neurosurgical Society*, 43(4):194-197

Jeremic B, Grujicic D, Antunovic V, Djuric L, Stojanovic M, Shibamoto Y (1994). Influence of extent of surgery and tumor location on treatment outcome of patients with glioblastoma multiforme treated with combined modality approach. *Journal of neuro-oncology*, 21(2):177-185

Kalman B, Szep E, Garzuly F (2013). Epidermal growth factor receptor as a therapeutic target in Glioblastoma. *Neuromol Med*, 15:420-434

Kawasoe T, Takeshima H, Yamashita S, Mizuguchi S, Fukushima T, Yokogami K, Yamasaki K (2015). Detection of p53 mutations in proliferating vascular cells in glioblastoma multiforme. *Journal of neurosurgery*, 122(2):317-323

Kim JE, Patel MA, Mangraviti A, Kim ES, Theodros D, Velarde E, et al (2017). Combination therapy with anti-PD-1, anti-TIM-3, and focal radiation results in regression of murine gliomas. *Clinical Cancer Research*, 23(1):124-136

Krell D, Assoku M, Galloway M, Mulholland P, Tomlinson I, Bardella C (2011). Screen for IDH1, IDH2, IDH3, D2HGDH and L2HGDH mutations in glioblastoma. *PloS one*, 6(5):e19868

Koestner A, Higgins RJ (2002). Tumors of the nervous system. *Tumors in Domestic Animals*, Fourth Edition, ISBN: 9780813826523, page:697-738

Kondo I, Shimizu N (1983). Mapping of the human gene for epidermal growth factor receptor (EGFR) on the p13→ q22 region of chromosome 7. *Cytogenetic and Genome Research*, 35(1):9-14

Laperriere N, Zuraw L, Cairncross G, Cancer Care Ontario Practice Guidelines Initiative Neuro-Oncology Disease Site Group (2002). Radiotherapy for newly diagnosed malignant glioma in adults: a systematic review. *Radiotherapy and Oncology*, 64(3):259-273

Larjavaara S, Mäntylä R, Salminen T, Haapasalo H, Raitanen J, Jääskeläinen J, Auvinen A (2007). Incidence of gliomas by anatomic location. *Neuro-oncology*, 9(3):319-325

Le Mercier M, Hastir D, Lopez XM, De Néve N, et al (2012). A simplified approach for the molecular classification of glioblastomas. *PLoS One*, 7(9):e45475

Lindberg OR, McKinney A, Engler JR, Koshkakyaryan G, Gong H, Robinson AE, et al (2016). GBM heterogeneity as a function of variable epidermal growth factor receptor variant III activity. *Oncotarget*, 7(48):79101

Liu W, Zhang S, Zhang L, Cui Q, Wang J, Gui T, Pang Q (2014). A prognostic analysis of pediatrics central nervous system small cell tumors: evaluation of EGFR family gene amplification and overexpression. *Diagnostic pathology*, 9(1):132

Liu Y, Wang F, Liu Y, Yao Y, Lv X, Dong B, et al (2016). RNF135, RING finger protein, promotes the proliferation of human glioblastoma cells in vivo and in vitro via the ERK pathway. *Scientific reports*, 6:20642

Lopez-Gines C, Gil-Benso R, Ferrer-Luna R, Benito R, Serna E, Gonzalez-Darder J, et al (2010). New pattern of EGFR amplification in glioblastoma and the relationship of gene copy number with gene expression profile. *Modern Pathology*, 23(6):856

Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, et al (2007). The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta neuropathologica*, 114(2):97-109

Louis DN, Perry A, Burger P, Ellison DW, et al (2014). International Society Of Neuropathology-Haarlem consensus guidelines for nervous system tumor classification and grading. *Brain Pathol*,24(5):429-35

Louis DN, Perry A, Reifenberger G, Von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, et al (2016). The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: a summary. *Acta neuropathologica*, 131(6):803-820

Mallick S, Madan R, Julka PK (2015). Primary spinal glioblastoma treated with adjuvant radiation and temozolomide: Report of two cases. *Journal of cancer research and therapeutics*, 11(3):654

Mazurek S, Boschek CB, Eigenbrodt E (1997). The role of phosphometabolites in cell proliferation, energy metabolism, and tumor therapy. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 29(4):315-330

Mazurek S, Zwerschke W, Jansen-Dürr P, Eigenbrodt E (2001). Effects of the human papilloma virus HPV-16 E7 oncoprotein on glycolysis and glutaminolysis: role of pyruvate kinase type M2 and the glycolytic-enzyme complex. *Biochemical Journal*, 356(1):247-256

McKeever PE, Dennis TR, Burgess AC, Meltzer PS, Marchuk DA, Trent JM (1996). Chromosome breakpoint at 17q11. 2 and insertion of DNA from three different chromosomes in a glioblastoma with exceptional glial fibrillary acidic protein expression. *Cancer genetics and cytogenetics*, 87(1):41-47

Milinkovic M, Vedrana P, (2014). The impact of TP53 and RAS mutations on cerebellar glioblastomas. *Experimental and molecular pathology*, 97(2):202-207

Miller C, Mohandas T, Wolf D, Prokocimer M, Rotter V, Koeffler HP (1986). Human p53 gene localized to short arm of chromosome 17. *Nature*, 319(6056):783-784

Murat A, Migliavacca E, Hussain SF, Heimberger AB, et al (2009). Modulation of angiogenic and inflammatory response in glioblastoma by hypoxia. *PloS one*, 4(6):e5947

Murnyák B, Hortobágyi T,(2013). "Magas grádusú gliomák elo {combining double acute accent} fordulása és molekuláris patológiája." Ideggyógyászati szemle 66(9-10):312-321

Murnyák B, Hortobágyi T, (2016). Immunohistochemical correlates of TP53 somatic mutations in cancer. *Oncotarget*, 7(40):64910

Nagy A, Eder K, Selak M, Kalman B, (2014). Mitochondrial energy metabolism and apoptosis regulation in glioblastoma. *Brain Research*, Nov 4. pii: S0006-8993(14)01484-X. doi: 10.1016/j.brainres. 2014.10.062. 2015;1595C:127-142.

Nagy Á, Éder K, Kálmán B (2016). Az immunválasz jellegzetességei és az immunterápia lehetőségei glioblastomában. *Egészség Akadémia* 7(1):44-60

Nagy Á, Garzuly F, Padányi G, Szűcs I, Feldmann Á, Murnyák B, Hortobágyi T, Kálmán B, (2017). Molecular subgroups of glioblastoma– an assessment by immunohistochemical markers 2017 Sep 26. doi:10.1007/s12253-017-0311-6 [Epub ahead of print]

Navarro AG, Kmiecik J, Leiss L, Zelkowski M, Engelsen A, Bruserud Ø, et al (2014). NK cells with KIR2DS2 immunogenotype have a functional activation advantage to efficiently kill glioblastoma and prolong animal survival. *The Journal of Immunology*, 193(12):6192-6206

Oda K, Matsuoka Y, Funahashi A, Kitano H, (2005). A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling. *Molecular systems biology*, 1(1):0010

Olar A, Aldape KD, (2014). Using the molecular classification of glioblastoma to inform personalized treatment. *The Journal of pathology*, 232(2):165-177

Park I, Mukherjee J, Ito M, Chaumeil MM, Jalbert LE, Gaensler K, et al (2014). Changes in pyruvate metabolism detected by magnetic resonance imaging are linked to DNA damage and serve as a sensor of temozolomide response in glioblastoma cells. *Cancer research*, 74(23):7115-7124

Prayson RA, (2009). Lipomatous supratentorial primitive neuroectodermal tumor with Glioblastomatous differentiation. *Annals of Diagnostic Pathology*, 13:36–40

Ranjit M, Motomura K, Ohka F, Wakabayashi T, Natsume A (2015). Applicable advances in the molecular pathology of glioblastoma. *Brain tumor pathology*, 32(3):153-162

Ryzhova MV, Shishkina LV (2015). Molecular methods in diagnosis of poorly differentiated malignant brain tumors in children. *Zhurnal voprosy neirokhirurgii imeni NN Burdenko*, 79(2):10-20

Sasaki M, Knobbe CB, Munger JC, Lind EF, Brenner D, Brüstle A, et al (2012). IDH1 (R132H) mutation increases murine haematopoietic progenitors and alters epigenetics. *Nature*, 488(7413):656

Schuster J, Lai RK, Recht LD, Reardon DA, Paleologos NA, Groves MD, et al (2015). A phase II, multicenter trial of rindopepimut (CDX-110) in newly diagnosed glioblastoma: the ACT III study. *Neuro-oncology*, 17(6):854-861

See WL, Tan IL, Mukherjee J, Nicolaides T, Pieper RO, (2012). Sensitivity of glioblastomas to clinically available MEK inhibitors is defined by neurofibromin 1 deficiency. *Cancer research*, 72(13):3350-3359

Setty P, Hammes J, Rothämel T, Vladimirova V, Kramm CM, Pietsch T, Waha A, (2010). A pyrosequencing-based assay for the rapid detection of IDH1 mutations in clinical samples. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 12(6):750-756

Simpson JR, Horton J, Scott C, Curran WJ, Rubin P, Fischbach J, et al (1993). Influence of location and extent of surgical resection on survival of patients with glioblastoma multiforme: results of three consecutive Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) clinical trials. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 26(2):239-244

Sizoo EM, Braam L, Postma TJ, Pasman HRW, Heimans JJ, Klein M, et al (2010). Symptoms and problems in the end-of-life phase of high-grade glioma patients. *Neuro-oncology*, 12(11):1162-1166

Smardova J, Liskova K, Ravcukova B, Kubiczkova L, Sevcikova S, Michalek J, et al (2013). High frequency of temperature-sensitive mutants of p53 in glioblastoma. *Pathology & Oncology Research*, 19(3):421-428

Sridhar P, Petrocca F, (2017). Regional Delivery of Chimeric Antigen Receptor (CAR) T-Cells for Cancer Therapy. *Cancers*, 9(7):92

Suri V, Das P, Jain A, Sharma MC, Borkar SA, Suri A, et al (2009). Pediatric glioblastomas: a histopathological and molecular genetic study. *Neuro-oncology*, 11(3):274-280

Stix G, (2007). A malignant flame. *Scientific American*, 297(1):60-67

Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJ, Janzer RC, et al, (2009). Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *The lancet oncology*, 10(5):459-466

Sutendra G, Michelakis ED (2013). Pyruvate dehydrogenase kinase as a novel therapeutic target in oncology. *Frontiers in oncology*, 3

Swartz AM, Li QJ, Sampson JH (2014). Rindopepimut: a promising immunotherapeutic for the treatment of glioblastoma multiforme. *Immunotherapy*, 6(6):679-90

Szopa W, Burley TA, Kramer-Marek G, Kaspera W, (2017). Diagnostic and therapeutic biomarkers in glioblastoma: Current status and future perspectives. *BioMed research international*, 2017:8013575

Tang Y, Dai Y, Grant S, Dent P, (2012). Enhancing CHK1 inhibitor lethality in glioblastoma. *Cancer biology & therapy*, 13(6):379-388

The Cancer Genome Atlas (TCGA) Research Network (2008). Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature*, 455:1061–1068

Trovó-Marqui AB, Tajara EH, (2006). Neurofibromin: a general outlook. *Clinical genetics*, 70(1):1-13

Vandenbroucke I, Van Oostveldt P, Coene E, De Paepe A, Messiaen L, (2004). Neurofibromin is actively transported to the nucleus. *FEBS letters*, 560(1-3):98-102

Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB, (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *science*, 324(5930):1029-1033

Velpula KK, Bhasin A, Asuthkar S, Tsung AJ, (2013). Combined targeting of PDK1 and EGFR triggers regression of glioblastoma by reversing the Warburg effect. *Cancer research*, 73(24):7277-7289

Venneti S, Thompson CB (2013). Metabolic modulation of epigenetics in gliomas. *Brain pathology*, 23(2):217-221

Verhaak RGW, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, et al (2010). Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer cell*, 17.1:98-110

Vizcaíno MA, Shah S, Eberhart CG, Rodriguez FJ (2015). Clinicopathologic implications of NF1 gene alterations in diffuse gliomas. *Human pathology*, 46(9):1323-1330

Walker MD, Strike TA (1980). Misonidazole peripheral neuropathy: its relationship to plasma concentration and other drugs. *Cancer clinical trials*, 3(2):105-109

Walseng E, Köksal H, Sektioglu IM, Fåne A, Skorstad G, Kvalheim G, et al (2017). A TCR-based Chimeric Antigen Receptor. *Scientific reports*, 7(1):10713

Warburg O, Wind F, Negelein E (1927). The metabolism of tumors in the body. *The Journal of general physiology*, 8(6):519

Way GP, Allaway RJ, Bouley SJ, Fadul CE, Sanchez Y, Greene CS (2017). A machine learning classifier trained on cancer transcriptomes detects NF1 inactivation signal in glioblastoma. *BMC genomics*, 18(1):127

Wolf A, Agnihotri S, Guha A (2010). Targeting metabolic remodeling in glioblastoma multiforme. *Oncotarget*, 1(7):567

Xie B, Fan X, Lei Y, Chen R, Wang J, Fu C, et al (2016). A novel de novo microdeletion at 17q11. 2 adjacent to NF1 gene associated with developmental delay, short stature, microcephaly and dysmorphic features. *Molecular cytogenetics*, 9(1):41

Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, et al (2009). IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *New England Journal of Medicine*, 360(8):765-773

Yarden Y, Schlessinger J (1987). Self-phosphorylation of epidermal growth factor receptor: evidence for a model of intermolecular allosteric activation. *Biochemistry*, 26(5):1434-1442

Yeku OO, Purdon TJ, Koneru M, Spriggs D, Brentjens RJ (2017). Armored CAR T cells enhance antitumor efficacy and overcome the tumor microenvironment. *Scientific Reports*, 7(1):10541

Zadeh G, Bhat KP, Aldape K (2013). EGFR and EGFRvIII in glioblastoma: partners in crime. *Cancer Cell*, 24(4):403-404

Zhang X, Neufeld AH (2007). Signal transduction pathways for epidermal growth factor stimulated cyclooxygenase-2 induction in astrocytes. *Experimental eye research*, 85(2):280-288

Zhang C, Zhang J, Wang G, Xu J, Li Y, Guo Q, et al (2016). Benefit of Sunitinib in the treatment of pulmonary primitive neuroectodermal tumors: a case report and literature review. *Oncotarget*, 7(52):87543

Sugárterápiás és Onkológiai Szakmai Kollégium (2009). Melléklet, V. I. I. Az Egészségügyi Minisztérium szakmai protokollja.

Internetes források jegyzéke:

Cosmic adatbázis (*NF-1* gén mutációihoz – Elérés dátuma: 2017.06.11.):

<http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>

Folyamatban lévő klinikai kísérletek (Elérés dátuma: 2017.09.12.):

<https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=idh&cond=Glioblastoma>

11. Saját publikációk jegyzéke

11.1. A disszertáció alapjául szolgáló publikációk jegyzéke

Adam Nagy, Katalin Eder, Mary A Selak, Bernadette Kalman Mitochondrial energy metabolism and apoptosis regulation in glioblastoma Brain Research 1595: pp. 127-142. (2015)

Nagy Á, Garzuly F, Padányi G, Szűcs I, Feldmann Á, Murnyák B, Kálmán B (2017). Molecular Subgroups of Glioblastoma—an Assessment by Immunohistochemical Markers. Pathology & Oncology Research, 1-11.

Nagy Ádám MSc, Éder Katalin PhD, Kálmán Bernadette MD PhD DSc Az immunválasz jellegzetességei és az immunterápia lehetőségei glioblastomában Egészség Akadémia7:(1) pp. 44-60 (2016).

Nagy Ádám MSc, Garzuly Ferenc MD PhD, Kálmán Bernadette MD PhD DSc A neurofibromin-1 biológiája és patogén elváltozásai onkológiai betegségekben MagyarOnkológia – Elfogadva, nyomtatásban (2017 december).

11.2. A disszertáció alapjául szolgáló konferencia előadás és absztrakt

Nagy Ádám MSc, Garzuly Ferenc MD PhD, Padányi Gergely MD, Szűcs Iván MD, Kálmán Bernadette MD PhD DSc A glioblastoma molekuláris alcsoportjainak meghatározása: - In: Ács K, Bódog F, Mechler M, Mészáros O (szerk.) Book of Abstracts. Interdisciplinary Doctoral Conference - Absztraktkötet. Interdiszciplináris Doktorandusz Konferencia. 188 p. Konferencia helye, ideje: Pécs, Magyarország, 2017.05.19-2017.05.21. Pécs: Pécsi Tudományegyetem Doktorandusz Önkormányzat, 2017. p. 173. (ISBN:978-963-429-113-8)

Adam Nagy, Ferenc Garzuly, Bernadette Kalman Molecular classification of glioblastoma: Lecture at the conference of the Society of the Hungarian-Austrian Neuropathology, Budapest 2017.09.11.

Nagy Ádám MSc, Garzuly Ferenc MD PhD, Kálmán Bernadette MD PhD DScDr Miklós Egon (szerk.) A glioblastoma molekuláris osztályozása MagyarországXLI. Nyugat-Pannon Neurológiai Konzultációs Fórum 2017.06.08. Ajka, Magyar Imre Kórház, Konferencia előadás (2017).

Nagy Ádám MSc, Garzuly Ferenc MD PhD, Szűcs Iván MD, Murnyák Balázs MSc, Hortobágyi Tibor MD PhD, Kálmán Bernadette MD PhD DScKlivényi Péter MD PhD (szerk.) A glioblastoma molekuláris genetikai osztályozása. Magyar Neurológiai Társaság Kongresszusa, Eger, 2016. október 20-22.

Nagy Ádám, MSc, Gyurján István, PhD, Szűcs Iván, MD, Garzuly Ferenc, MD, Murnyák Balázs, MSc, Hortobágyi Tibor, Md, PhD, Kálmán Bernadette, MD, PhD, DSc, Hortobágyi Tibor (szerk.) A glioblastoma genom szintű eredményeinek adaptálása a neuropatológiai gyakorlatban. Az MTA Idegtudományi Köztestületi Bizottság Symposiuma (2016), Konferencia előadás (2016).

Nagy Ádám, Éder Katalin PhD, Garzuly Ferenc MD, Szűcs Iván MD, Murnyák Balázs MSc, Hortobágyi Tibor MD PhD, Kálmán Bernadette MD PhD DScKlivényi Péter MD (szerk.) A glioblastoma molekuláris osztályozása. Magyar Neurológiai Társaság Kongresszusa, Székesfehérvár, 2015 december.

12. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani mindazon személyeknek, akik segítségével, közreműködése nélkül jelen értekezés nem készülhetett volna el.

Elsőként Prof. Dr. Kálmán Bernadett Témavezetőmnek mondok köszönetet az értekezés elkészültéhez nyújtott segítségével, végtelen türelméért és a rengeteg időért, amit az elmúlt három évben munkásságomra és szakmai fejlődésem előmozdítására fordított.

Köszönettel tartozom a Markusovszky Egyetemi Oktatókórház Patológia Osztályának minden dolgozójának az értekezésben szereplő kísérletes munkába való betanuláshoz nyújtott önzetlen segítségükért.

Megköszönöm a tatabányai Szent Borbála Kórház Patológia Osztályának a tanulmányunk értékeléséhez szükséges tárgylemezek szkenneléséhez szükséges feltételek biztosítását.

Köszönöm a Debreceni Egyetem, Klinikai Központ Patológia Intézetében dolgozó Dr. Hortobágyi Tibor Úrnak és Murnyák Balázs PhD hallgatónak a munkavégzés során kialakított kooperációt, mely remélhetőleg jelen értekezés lezárta után is folytatódik.

Köszönetet mondok a Pécsi Tudományegyetem Egészségtudományi Karának Doktori Iskolájának dolgozóinak is, a munkásságom során felmerült valamennyi problémám megoldásában, melyek nélkül ez az értekezés szintén nem készülhetett volna el.

Köszönetet mondok Dr. L. Éder Katalinnak és Dr. Gyurján Istvánnak a munkám során előforduló hibák javításában, a módszerek tökéletesítésében nyújtott önzetlen segítségükért.

Külön, kiemelt köszönettel és hálával tartozom Dr. Garzuly Ferenc Főorvos Úrnak a glioblastomával kapcsolatos tömördek információért, türelméért és szakmai segítségével, amelyet a tanulmányunk egésze során, de különösen az értékelési fázisában nyújtott.

Végül, de nem utolsó sorban köszönettel tartozom Páromnak, Beának, valamint Családomnak a dolgozat – olykor megterhelő – írása során irántam tanúsított végtelen türelmükért és szeretetükért, amely nélkül nem tudtam volna végigjárni ezt az utat.

7. sz. melléklet

**DOKTORI ÉRTEKEZÉS BENYÚJTÁSA ÉS NYILATKOZAT A DOLGOZAT
EREDETISÉGÉRŐL**

Alulírott

név:.....

születési név:

anyja neve:

születési hely, idő:

.....
.....

című doktori értekezésemet a mai napon benyújtom a(z)

.....Doktori Iskola

.....Programjához/témacsoportjához

Témavezető(k) neve:

Egyúttal nyilatkozom, hogy jelen eljárás során benyújtott doktori értekezésemet
- korábban más doktori iskolába (sem hazai, sem külföldi egyetemen) nem nyújtottam be,
- fokozatszerzési eljárásra jelentkezésemet két éven belül nem utasították el,
- az elmúlt két esztendőben nem volt sikertelen doktori eljárásom,
- öt éven belül doktori fokozatom visszavonására nem került sor,
- értekezésem önálló munka, más szellemi alkotását sajátomként nem mutattam be, az
irodalmi hivatkozások egyértelműek és teljesek, az értekezés elkészítésénél hamis
vagy hamisított adatokat nem használtam.

Dátum:

.....
doktorjelölt aláírása