

Pécsi Tudományegyetem Egészségtudományi Kar

Egészségtudományi Doktori Iskola

Pécs

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

A glioblastoma molekuláris osztályozása

PhD téziszfüzet

Nagy Ádám

Témavezető:

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

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

Programvezető:

PROF. DR. Kiss István, MD, PhD, DSc

Pécs, 2017

1. Bevezetés

A glioblastoma klinikai jellemzői

A glioblastoma szó a tudományos irodalomban legelőször 1926-ban szerepelt Bailey és Cushing közös munkájából. Feltételezték, hogy a glioblastoma a gliális sejtekből, illetve azok progenitoraiból alakul ki. Eredetileg a glioblastoma multiforme név volt a hivatalos elnevezés, mely utalni hivatott a tumor rendkívüli inter- és intratumor heterogenitására. A WHO 2007-ben javasolt glioma klasszifikációja óta már csak glioblastoma néven ismerjük, rövidítése „gbm”. A betegség tünetei nagymértékű változatosságot mutatnak, attól függően, hogy a daganat mely agyterületeket érinti, milyen biológiai tulajdonságai vannak, mennyire előrehaladott az állapota, illetve hogy a betegnek milyen az általános fizikai állapota. Gyakori a daganat térfogatnövelő duzzadását kísérő fejfájások, hányinger és hányás fellépése, a kérgi izgalom okozta epilepsziás rohamok megjelenése, és a kitett agyterületnek megfelelő neurológiai góctünetek jelentkezése, mint például a beszédzavar, végtagzsibbadás, végtagbénulás, személyiségváltozás, és kognitív zavarok.

A glioblastomára jellemző, hogy a központi idegrendszer bármely területén kialakulhat. Leggyakrabban a két hemiszfériumot érinti, azon belül is leginkább a frontális lebenyt. Valamivel kisebb eséllyel alakul ki a temporális, parietális és okcipitális lebenyben, ebben a gyakorisági sorrendben.

A felnőttkori glioblastomák tipikus megjelenésével szemben Gusnard és munkatársai 1990-ben kiemelték, hogy a gyermekkori glioblastoma inkább az agytörzsre és a kisagyi régiókra lokalizálódik.

A glioblastoma a leggyakrabban előforduló primer malignus agytumor felnőttekben. A medián túlélése a teljes műtéti reszekciót és a standard sugár-, valamint kemoterápiát követően is csak alig több mint egy év, az öt éves túlélés aránya pedig öt százalék alatt marad. 2005-ben a Stupp-protokoll elfogadása lényeges előrelépésnek számított. A tumor széles margójú műtéti eltávolítása, majd a temozolomid alapú kemoterápiával kombinált sugárkezelés megnövelte a betegek progressziómentes és teljes túlélési idejét. A 12,3 hónapos medián túlélés 14,6 hónapra nőtt, a két éves túlélés pedig 12 százalékról 26 százalékra emelkedett.

Míg számos molekuláris alapú kísérletes terápia van jelenleg fejlesztés alatt vagy már preklinikai vizsgálatban glioblastomában, világszerte és így Magyarországon is, az egyetlen jóváhagyott terápia ma még mindig a Stupp-protokollra épül a klinikai gyakorlatban.

A glioblastoma szövettani jellemzői

A WHO 2007 óta a gliomákat szövettani tulajdonságaik alapján négy grádusba sorolja (I-IV, ahol I a legkevésbé, IV a leginkább malignus). A glioblastoma IV-es grádusú glioma. Nagyfokú inter- és intratumor heterogenitás jellemzi, mely nemcsak a sejtek citomorfológiai változatosságát jelenti, hanem gyakran mezenchimalis és primitív neuroektodermális elemek gliális eredetű tumorsejtekkel történő keveredését is. Szövettani jellegzetességeik alapján, Burger és munkatársai 1987-ben nyolc alcsoportra osztotta fel a glioblastomákat, mely azonban nem nyert széleskörű klinikai alkalmazást.

A daganatsejtek egy fontos jellegzetessége az invazivitás, mely szerint e sejtek képesek a normál agyszövetbe infiltrálni, így a tényleges tumor sokszor jóval nagyobb lehet, mint amekkorának az MRI felvételeken látszik. A tumort jellemzi a pleomorfizmus, cellularitás, érújdonképződés és nekrozisok megjelenése. Az angiogenezissel összefüggésben a vér-agy gát a glioblastomára jellemző elváltozásokon megy keresztül. Az immunsejtek számára fokozottan átjárhatóvá válik. Berghoff és munkatársai 2014-ben, Bottino és munkatársai 2014-ben, és Navarro és munkatársai 2014-ben több irányból elemezték, hogy ez az immun infiltráció a túlélést milyen módon és mértékben befolyásolja, de nem jutottak egyértelmű következtetésre. Az anaplasztikus tumorsejtek a differenciáltság eltérő fázisaiban megrekednek, ami jól látható a szövettani képeken.

A tumorban glioblastoma őssejteket is találni, amelyek feltehetően a tumor gyógyszer és radioterápiával szembeni rezisztenciájához is hozzájárulnak a tumor növekedése és recidíváképző tulajdonságai mellett.

A glioblastoma lehet elsődleges (normális gliasejtek *de novo* transzformációjával, malignizációjával alakul ki), vagy másodlagos (alacsonyabb gradusú glioma transzformálódik glioblastomává). A másodlagos glioblastoma rendszerint jobb prognózissal rendelkezik, az ilyen betegek általában fiatalabbak (50 év alattiak) és hosszabb túlélést mutatnak, a tumor sajátos molekuláris genetikai profiljával összefüggésben.

A glioblastoma metabolikus jellegzetességei

A tumor növekedése hypoxiához vezet különösen a centrális, legrosszabb vérellátottságú részeiben, mely szövetelhalást eredményez. A tumor annak érdekében, hogy saját érellátását fokozza, mikrokörnyezetében angiogenezist indukál. Emiatt több specifikus gén is aktiválódik. Ilyenek például a hypoxia indukáló faktor 1 (HIF-1), a tumor nekrozis 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). Nagy és munkatársai 2014-es tanulmányukban összefoglalják, hogy a hypoxiát szabályozó géneknek ez a megváltozott kifejeződési mintázata a glioblastoma jellegzetes metabolikus profiljával társul.

Azonban a daganatban megjelenő szomatikus mutációk szintén kulcs szerepet játszanak az anyagcsere zavarak kialakulásában. Számos ilyen mutáció a mitokondriális DNS károsodásán vagy a mitochondriumba lokalizált proteinek nukleáris génjeinek károsodásán keresztül az oxidatív glikolízis irányába tolja el a metabolikus útvonalakat. Több mitokondriális szomatikus mutáció a citokróm-C oxidáz enzimet érinti. Griguer és munkatársai 2013-ban megfigyelték, hogy akiknek a tumorában ilyen citokróm-C mutációk jelentkeztek, azoknak rendszerint rosszabb prognózissal kellett szembenéznük.

A glioblastoma különösen jellegzetes mutációi az izocitrát-dehidrogenáz-1 és 2 (IDH-1 és IDH-2) enzimeket érinti. Ezek közül is a leggyakoribb az IDH-1 R132H kodon mutációja. Az IDH-1 R132H mutáns enzim nem képes ellátni funkcióját, hanem egy, a normál terméktől, az alfa-ketoglutaráttól eltérő termék, a 2-D-hidroxi-glutarát nevű onkometabolit keletkezik, míg a normál termék koncentrációja lecsökken. Az IDH-2 és 3 mutációk szintén a 2-D-hidroxi-glutarát felhalmozódásához vezetnek. A 2-D hidroxi-glutarát kompetitíven gátol számos, alfa-ketoglutarát függő molekuláris folyamatot, és ezáltal kiterjedt epigenetikai valamint transzkripciós mintázat változásokhoz vezet.

További fontos anyagcsere mutációk a piruvát kináz (PK) és a piruvát dehidrogenáz kináz (PDK) enzimek károsodása. A PK enzimek mutációi révén a glikolízis folyamata jelentősen lelassul, számos intermedier termék pedig felhalmozódik. Ezek pedig elősegítik a daganatsejtek proliferációját, nukleotid és aminosav szintézisét. A PDK enzimek mutációi a hypoxiával állnak kapcsolatban, annak aktiváló génjeivel kölcsönösen szabályozzák egymást. A PDK enzimek génjeinek mutációi révén az anyagcsere folyamatok szintén az oxidatív glikolízis irányába tolódnak el.

A glioblastoma molekuláris genetikai jellemzői

Mint minden tumorra, a glioblastomára is jellemző a szomatikus mutációk szekvenciális felhalmozódása, melyek közül néhány különös jelentőséggel bír a tumor biológiai alcsoportjainak elkülönítésében. Az egyik ilyen mutáció a már említett IDH-1R132H mutáció. A 2014-es WHO glioma klasszifikáció revízió óta a glioblastomák felosztásának első (és egyetlen javasolt) lépése az IDH-1 státusz meghatározása. A The Cancer Genome Atlas (TCGA) Network OMICS eredményeinek klaszter analízise a glioblastomákat négy molekuláris, egymással részben átfedő alcsoportra osztotta fel klaszter-analízissel. A négy

alcsoport a klasszikus, mezenhimális, proneurális és neurális alcsoportok. A glioblastoma proneurális alcsoportjára jellemző az IDH-1 mutációk, leggyakrabban az IDH-1 R132H jelenléte. A klasszikus alcsoportra jellemzőek az Epidermális növekedési faktor receptor (EGFR) abnormalitásai, köztük az *EGFR* gén amplifikációja és magas expressziója, valamint az EGFRvIII (exon II-VII) deléciós mutáns megjelenése. Az EGFRvIII egy konstitucionálisan aktív receptor, amely ligandum kötődése nélkül is képes a jelátvitelt közvetíteni. Így fokozza a sejt proliferációját és jelentősen csökkenti az apoptotikus folyamatait. A tumorszuppresszorok génjeinek szomatikus mutációi szintén fontos szerepet játszanak a glioblastoma molekuláris profiljának kialakításában és az alcsoportok meghatározásában. A mezenhimális alcsoportra jellemző az *NF-1* (neurofibromin) gén szomatikus mutációja vagy a gént kódoló 17q11.2 deléciója. Érdekes módon, az NF-1 gén csíravonal mutációja is jól ismert a neurológiai irodalomban, mely autoszomális dominánsan öröklődik, és a komplex neurofibromatózis-1 betegség kialakulásához vezet. Az NF-1 gén mutációi révén expresszálandó NF-1 fehérje (neurofibromin) nem képes normál tumor szuppresszor szerepét betölteni, mely a Ras/MAPK jelátviteli útvonal negatív regulációja lenne. Ennek hiánya vagy csökkenése a tumorban fokozott sejt proliferációhoz és túléléséhez vezet.

2. Hipotézisek, célkitűzések

A glioblastoma kutatás eredményei által megismert, de a klinikai gyakorlatban még nem alkalmazott fontos összefüggéseket figyelembe véve az alábbi hipotéziseket és célkitűzéseket jelöltük ki:

Hipotézisek

A tanulmányunkban feltételeztük, hogy:

- A TCGA által fagyasztott glioblastoma minták OMICS vizsgálatának 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.

Célkitűzések

A fenti feltételezések bizonyítása érdekében célul tűztük ki, hogy:

- A Markusovszky Egyetemi Oktatókórház (MEOK) Patológia Osztályán 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.

3. Anyag, módszer

Beteganyag

Kísérleti anyagunk a MEOK Patológia Osztályán 2000 és 2016 között összegyűjtött 112 betegről származó 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 beteganyagot két kohorra osztottuk. Az első kohortba azok a minták kerültek, amelyek azoktól a betegektől származtak, akiktől csak egy minta állt rendelkezésre. Ezek a minták a diagnózist követő műtéttől származnak, kemoterápia és sugárkezelés előtt. A második kohortba pedig azok az anyagok kerültek, amelyek azokhoz a betegekhez tartoztak, akiktől időben eltérő időpontokból kettő, vagy több anyag is rendelkezésre állt. Ezek közül a minták közül az első mindig az első műtéttől, sugár-, valamint kemoterápia előtről származnak, a többi minta a kezelést követő időszakokból származik. Az első kohortba 96 beteg 96 mintáját vizsgáltuk meg a kiválasztott molekuláris markerekkel, hogy a glioblastoma alcsoportok elkülönülését teszteljük. A második kohortba 8 beteg 18 mintája került, hogy a tumorok molekuláris alcsoport besorolásának időbeli alakulását teszteljük. A beteganyag túlnyomó

részét elsődleges glioblastoma adta (101), de a vizsgálati anyag összesen 3db másodlagos glioblastomát is magába foglalt.

Az első kohort vizsgálataiban 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 volt.

Immunhisztokémia

Az immunhisztokémiai tesztek minden elsődleges antitest esetében előtanulmányban állítottuk be. A mintáinkból készített lemezeken első lépésként értékelési területeket (region of interest v. ROI) jelöltünk ki, hogy a továbbiakban konzisztens és összevethető felületeket vizsgálhassunk meg. Ehhez haematoxylin-eozin festést és anti-gliális fibrilláris savas protein (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 marker tollal körülírtuk valamennyi tárgylemezen. Így 1-1 blokkból a 8 primer antitesttel készült IHC elemzés 8 egymást szekvenciálisan követő metszeten történt, melyek mindegyike ugyanazon ROI-t tartalmazta (a 8x3 µm-en belül az ROI megerősíthető volt). Antitestünk az alábbiak voltak: anti-GFAP, anti-NF-1, anti-EGFR, anti-EGFRvIII, anti-P53, anti-ATRX, anti-IDH-1R132H, anti-CD133. Másodlagos antitestünk és a vizualizáláshoz szükséges Diamino-benzidin alapú előhívó a Novolink Polymer Detection System RE-7140-K része volt (Leica Biosystems, Newcastle, UK). . Az elvégzett tesztek mennyiségi értékelése manuális és digitális leolvasással történt. A digitalizált értékelés membrán és mag festődés esetében (EGFR, EGFRvIII, p53) 100X nagyításon történt. Az elkészült digitális fotókat a tatabányai kórház központi szerveréről DVD lemezekre mentettük le. A beolvasott lemezeket a 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. A komputer által számolt sejtek festődési intenzitását 0, +, ++ és +++ között értékeltük, míg a festődött sejtek számából a százalékos arányt határoztuk meg. A három antitest digitális értékelését a manuális leolvasás

mege erősítésére 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 0, +, ++ 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. NF-1 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 pozitívitas, 2. citoplazmatikus és mag pozitívitas, 3. mag pozitívitas és 4. citoplazma és mag negatívitas. A két mutációra specifikus antitest, EGFRvIII és IDH-1 R132H esetében a pozitívitas (mutáció) jelenlétét vagy hiányát dokumentáltuk, ahol a pozitívítást „++” vagy „+++” IHC festődési intenzitással definiáltuk (ld. fentebb).

Piroszekvenálás

Az anti-IDH-1 R132H antitest működését piroszekvenálással is mege erősítettük. 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 terveztük tesztelni piroszekvenálással az összes olyan mintát, ahol az IDH-1 R132H mutáció IHC értékelése nem volt egyértelmű. 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 NanoDrop2000/2000c szoftvercsomag segítségével ellenőriztük. A PCR-t egy BOECO Thermal Cycler SQ BOE8085240 készüléken végeztük 40 ciklusban. A PCR és szekvenáló primereket az elérhető irodalomból választottuk ki, ahol a PCR reverz primer biotinilált volt (Setty és munkatársai, 2010). A PCR terméket agaróz gélen gélelektroforézissel ellenőriztük. A biotinilált amplikont immobilizálással tisztítottuk, majd az IDH-1 R132H mutáció jelenlétét piroszekvenálással vizsgáltuk az előtanulmányok során már említett automata készüléken a hozzátartozó pyromark szoftvercsomag segítségével. .

Statisztikai módszerek

Miután az IHC eredményeket megerősítettük és letisztáztuk, a statisztikai elemzések több lépésben történtek először az 1. kohortban, majd a 2. kohortban. Az 1. kohort 96 mintájában: 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. Itt az NF-1, EGFRvIII és IDH-1R132H IHC eredményeit +/- alapú nominális értékelésben teszteltük, míg a többi IHC marker esetében a Histoscore értékeket teszteltük. Az adatcsoportok közti különbségeket 0 és 1 formában jelenítettük meg a kluszter elemzés ábráján. 3. 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 elemzéssel vizsgáltuk. A 2. kohort 8 betegének 18 mintájában megvizsgáltuk a tumorok molekuláris alcsoport besorolását, és annak változásait a szekvenciális mintákban.

4. Eredmények

Előzetes értékelések

Az 1. kohortban, a statisztikai elemzések megkezdése előtt „manuálisan” is levonhattunk néhány következtetést. 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, az NF-1 teljesen (mag és citoplazma) negatív csoport, valamint az IDH-1R132H pozitív csoport volt. Ezek (a markerek által megjelölt molekulák alapján) valószínűleg átfednek a TCGA által meghatározott alcsoportokkal: 1) IDH-1 R132H pozitivitás (Verhaak és mtsai, 2010, proneurális alcsoportjának felelhet meg), 2) EGFR és EGFRvIII együttes pozitivitás (Verhaak és mtsai, 2010, klasszikus alcsoportjának felelhet meg) és 3) NF-1 negativitást (Verhaak és mtsai, 2010, mezenchimális alcsoportjával lehet átfedésben). Eredményeink szerint a legnagyobb csoport az EGFRvIII mutációt hordozóké, ide 34 fő került. 20 betegnél mutattunk ki NF-1 expresszió hiányt, valamint 10 főnél IDH-1R132H mutációt. 32 beteget nem tudtunk besorolni a három molekuláris mintázat egyikébe sem. Vagyis a teljes beteganyag kétharmadát (64/96) sikerült már három markerrel alcsoportba sorolnunk, jó egyezéssel a TCGA molekuláris

alcsoportjaival. Míg az IDH-1 R132H markerre pozitív alcsoport teljes mértékben elkülönült a többi alcsoporttól, a két másik alcsoportban kismértékű átfedést detektáltunk: 2 főnél NF-1 expresszió hiányát és EGFRvIII mutáció hordozást is kimutattunk, jelezve hogy az alcsoportok klaszter-szerűen, de nem teljes mértékben, a TCGA adatokhoz hasonlóan különíthetők el markereinkkel.

Részletes IHC és klinikai korrelációs eredmények az 1. kohortban

Immunohisztokémiával 96 beteg közül 10-nél sikerült megállapítani az IDH-1R132H mutáció jelenlétét. Ez az arány körülbelül 10%-nak felel meg, amely jó átfedést mutat a TCGA proneurális alcsoport relatív arányával. A betegek nemét összevetve a negatív csoportba (86 fő) 46 nő és 40 férfi került. A pozitív csoportba (10 fő) 7 nő és 3 férfi. A nemek és az IDH-1 mutáns glioblastoma megjelenése között nem tudtunk kapcsolatot kimutatni (Khi-négyzet próba, 95%-os konfidencia szint mellett a $p=0,34$).

A betegek életkorát szintén a pozitív és negatív csoport szerint vetettük össze. Az IDH-1 pozitív (R132H mutációt hordozó) csoport tagjainak átlag életkora 56 évnek mutatkozott, szemben a negatív csoporttal, ahol ez a szám 62 év volt. Hasonlóan, a medián életkorok között is különbség látszott (52,5 év a pozitív és 56 év a negatív csoportban). Azonban az életkor és a mutáció közti kapcsolat Mann-Whitney teszttel történő elemzésekor nem kaptunk különbséget az IDH-1 mutáció hordozók alacsony száma miatt (95%-os konfidencia szint, $p=0,234$). Ugyanakkor érdemes kiemelni, hogy tendencia jelleggel a pozitív csoportba sorolt betegek valamivel fiatalabban voltak, mint a negatív csoport betegei.

A harmadik körben a betegek túlélési adatait is összevetettük a mutáció jelenlétével. A mutáns csoportból 9 (90%), a negatív csoportból 59 (69%) beteg túlélési adataihoz férünk hozzá, lévén a klinikai adatgyűjtés retrospektív. A túlélést a műtét ideje és a halál beállta közti időintervallumként azonosítottuk, hetekben megadva. Az IDH-1 R132H pozitív csoport túlélése átlagosan 82 hétnek adódott, mediánja pedig 24 hétnek. A negatív csoporttal összevetve, melynek átlagos és medián túlélése rendre 43 hét és 26 hét. Bár szignifikáns különbség itt sem látszott, az átlag érték jól kifejezi, hogy az IDH mutációt hordozó betegek átlagosan fiatalabban voltak, mint a többi alcsoport betegei (negatív csoport).

Második lépcsőben az NF-1 mutációkat teszteltük a klinikai adatokkal összevetve. Négyféle festődési mintázatot figyeltünk meg: mag és citoplazma együttes pozitivitás (+/+), mag és citoplazma együttes negativitást (-/-), mag pozitív, citoplazma negatív (m+/c-) és mag negatív citoplazma pozitív (m-/c+). Ez utóbbi festődési mintázat (m-/c+) jellemző a fiziológiásan normális állapotra. A -/- csoportot a továbbiakban a m-/c+ csoporttal vetettük össze. Összesen

negyven fő esetén kaptunk használható túlélési és immunhisztokémiai eredményeket. A nemek megoszlása a következőképp alakult: 20 nő és 20 férfi. Az NF-1 -/- csoportba 9 nő és 11 férfi került. A m-/c+ típusú csoportba 11 nő és 9 férfi. A nemek megoszlása itt sem mutat szoros összefüggést a mutáció jelenlétével (Khi-négyzet próba, 95%-os konfidencia szint mellett $p=0,40$). Az életkorok megoszlása hasonlóan alakult, mint az IDH-1 mutáns csoportban. Az átlagos műtéti életkor az NF-1 -/- betegek körében 65 év volt, szemben a m-/c+ típusú tumorú betegek 61,5 évével, a mediánjuk pedig 67 év volt, az NF-1 m-/c+ betegek 62,5 évével szemben (Mann-Whitney teszt, 95%-os konfidencia szint mellett a $p=0,22$). Az átlagos túlélés mindössze 56 hét volt az NF-1 -/- csoportban, míg a m-/c+ típusú csoport túlélése még rövidebb, 49 hét volt. A medián értékek is hasonlóan alakultak, a -/- csoport medián túlélése 21 hét, a m-/c+ típusé 11 (Cox-regresszió teszt, 95% konfidencia mellett $p=0,19$).

A harmadik lépés az EGFRvIII tesztelése volt a klinikai kimenettel összevetve. 96 tesztből 34 mutatkozott pozitívnak, 62 negatívnak. Az EGFRvIII mutánsok tipikusan fokozott EGFR fokozott expressziót is mutattak. A TCGA adatokkal való összevetés alapján ez a kirajzolódó alcsoport jó átfedést mutat a TCGA klasszikus alcsoportjával. A betegek nemét meghatározva a pozitív csoportba 19 nő és 15 férfi került, a negatív csoportba 35 nő és 27 férfi (Khi-négyzet próba, 95%-os konfidencia szint mellett $p=0,95$). A műtéti életkorok a pozitív csoportban átlag 60 évnek, medián 61 évnek mutatkoztak, a negatív csoportban ezek a számok rendre 62 év és 65 év, mely statisztikailag szintén nem szignifikáns (Mann-Whitney próbával 95%-os konfidencia szint mellett $p=0,74$). A betegek túlélési adataihoz a pozitív csoportban 22 fő esetében fértünk hozzá, 43 fő esetében pedig a negatív csoportból. Ez összesen 65 fő (67,70%). Ahogy várható volt, a túlélési adatok is egybevágnak a teljes beteganyag átlagával és mediánjával 50 hét átlagos túléléssel a negatív csoport 45 hetével szemben, míg 22 hét mediánnal a negatív csoport 26 hete áll átellenben (Cox-regresszió, 95%-os konfidencia szint, $p=0,18$).

A következőkben a három molekuláris glioblastoma alcsoportban végeztünk klinikai korrelációs elemzéseket.

A tanulmányban részt vevő 96 beteg közül 68 (~71%) beteg teljes túlélési adatait sikerült összegyűjteni. Ez alapján a teljes első kohortra Cox-regresszió számítást végeztünk, hogy megállapíthassuk, hogy az általunk kijelölt molekuláris alcsoportok közül szignifikánsan elkülönül-e valamelyik a betegek túlélési adatai alapján (95%-os konfidencia szint mellett $p=0,386$). Ez alapján elméletben nincs eltérés a három felvázolt alcsoport túlélési adatai között. A kis minta elemszám és a látható tendenciák miatt azonban óvatos következtetést

levonhattunk: a leghosszabb túléléssel az IDH-1 mutációt hordozó csoport rendelkezett, a legrövidebb túlélést pedig az NF-1 -/- csoportban találtuk.

Hierarchikus klaszter analízis

A felismert molekuláris csoportok egymástól való elkülönülését statisztikailag, klaszter analízissel vizsgáltuk meg az 1. kohortban. Ennek eredményeit fa-diagramon jelenítettük meg. Számos ilyen statisztikailag lehetséges fát készítettünk, melyek közül a statisztikailag leginkább reprezentáns fát mutatjuk be.

Az első lépésben a fa az IDH-1R132H mutáció alapján különíti el a glioblastoma alcsoportokat (teljes összhangban a legújabb WHO glioma klasszifikációs revízióval, melyet 2016-ban Louis és munkatársai írtak le) (95%-os konfidencia szint mellett $p=0,001$). Az IDH-1 mutáns csoport teljesen elkülönül a többitől. A második lépésben az IDH-1R132H tesztre negatív csoportot bontottuk tovább. A statisztikai elemzések szerint az EGFRvIII státusz megállapítása a releváns lépés (95%-os konfidencia szint mellett $p=0,022$). Az EGFRvIII csoport is jól elkülöníthető az EGFRvIII negatív csoporttól. Az utolsó lépésben az EGFRvIII negatív csoportot teszteltük az NF-1 markerünkkel. Itt a négyféle festődési mintázat közül csak a -/- csoport elkülönülését figyeltük meg a többi NF-1 közül (NF-1 +/+, NF-1 +/- és NF-1 -/+ csoporttal szemben) (95%-os konfidencia szint mellett $p=0,059$). Ez éppen nem mutatkozik szignifikánsnak. Tekintettel arra, hogy a p-érték a szignifikancia határérték közelében van, lehetséges, hogy az itt már lecsökkent kis minta elemszám miatt nem szignifikáns az alcsoport elkülönülése.

A többi tesztelt fa statisztikailag gyengébb és biológiailag nem olyan plauzibilis mintázatot mutatott mint a fenti, kiemelt hierarchikus klaszter elemzés fája.

A második kohort értékelése

A második kohortban (összesen 8 főtől legalább 2 vagy több műtéileg eltávolított, összesen 18 glioblastoma FFPE mintában) elvégzett IHC tesztek alapján látott molekuláris mintázat időbeli változásait vizsgáltuk meg. A szekvenciális mintákban számottevő változást nem tapasztaltunk a mutációs mintázatban, viszont bizonyos tendenciákat itt is leírunk. Elsőként az IDH-1 státusz ellenőrzése történt meg. A második kohortba tartozó nyolc beteg tumorai közül egy sem bizonyult IDH-1 R132H pozitívnak. 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. 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.

5. Diskusszió

Eredményeink alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a TCGA OMICS-elemzések kulcsfontosságúnak bizonyuló néhány markerének alkalmazásával, a fő glioblastoma molekuláris altípusok azonosítása a klinikai FFPE blokkokban is megvalósítható. A kiválasztott markerek átfedése miatt az általunk IHC módszerrel meghatározott és a TCGA OMICS módszerekkel meghatározott (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. Vizsgálatunkban 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 kiemelés érdemel az a határozott trend, miszerint 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.

A második kohort, bár statisztikai vizsgálatokra nem alkalmas, mégis tükrözni képes, hogy a glioblastoma tumorok fő vonalakban megtartják fő molekuláris jellemzőiket, bár klonális változások is megfigyelhetők a szomatikus mutációs profilokban a szekvenciális tumorok evolúciója során. Megfigyeléseink összhangban vannak a WHO glioma osztályozásának 2016-os revíziójával, 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. Az IDH-1 R132H pozitív státus egyben jelentős mértékben (bár nem teljességben) differenciálisan jelenik meg az elsődleges és a másodlagos glioblastomákban. Míg a WHO glioma-osztályozás 2016-os revíziója nem javasolja kiegészítő

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.

Az NF-1 festődés alapján kirajzolódott négyféle mintázat mögött több ok is állhat. Ilyen okok lehetnek például a megváltozott gén expressziós mintázatok, az antitest felismerésben szerepet játszó epitópok törlődése, vagy az antigén megváltozott lokalizációja. Ennek hátterét további kutatásokkal lehetne biztonságosan tisztázni, de már az eddigi átfogó TCGA adatok is bepillantást adnak a genotípus és fenotípus korrelációk megállapítására.

Vizsgálataink erőssége az volt, hogy az archivált klinikai FFPE glioblastoma mintákban egy hisztopatológiai laborban könnyen elérhető módszereket alkalmaztunk annak megvizsgálására, hogy a tumor fő molekuláris altípusai azonosíthatók-e. 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.

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.

A modern terápiák olyan molekulákat is célba vesznek, amelyek a molekuláris genetikai klasszifikáció során is fontos szerephez jutottak. Ilyen megközelítés például az EGFRvIII ellen irányuló technikailag széles spektrumú molekuláris stratégia, beleértve a vakcináció és antitest alapú terápiákat. Bár ezen a területen még igazi áttörés nem született, várható, hogy a közeljövőben a „klasszikus” (EGFRvIII mutációval rendelkező) alcsoportba kerülő betegek túlélése meghosszabbodhat ezen terápiák hatékonyságának javulásával. Egy új terápiás megközelítés az úgynevezett CAR T sejtek biotechnológiai létrehozása. Ezek olyan T sejtek, amelyek tetszőlegesen kialakított specificitású kimérikus antigén receptorokkal rendelkeznek, és amelyek képesek kiválasztott mutációkat expresszáló, mint például az EGFRvIII-t hordozó glioblastoma sejteket felismerni és elpusztítani.

A mutáns IDH-1 molekulák terápiás célpontként való azonosítása már az előző évtized végén szintén felmerült, és azóta egyre nagyobb hatékonyságú megközelítések kísérleti tesztelése van folyamatban, bár még egyik sem lépett a preklinikai fázisból klinikai fázisba.

Az NF-1 tumor szuppresszor molekula expressziós és funkcionális hiányának kijavítása vagy pótlása szintén számos daganat, köztük a glioblastoma gyógyítás fontos stratégiája lehetne, de egyelőre még ilyen siker nem született. Várható azonban, hogy nem csak az itt kulcsfontosságúnak tűnő markereket, hanem az azokkal társuló további mutációkat és azok kombinációit célzó új generációs beavatkozások hoznak majd a glioblastoma kezelésben áttörő sikert. Az eddigi ismeretek összességükben határozottan arra utalnak, hogy a glioblastoma molekuláris profiljának egyre mélyülő gyakorlati meghatározása fontos szerepet fog játszani a közel jövőben e nagy malignitású és agresszív tumor legyőzésében.

6. Új tudományos eredmények

1. 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.
2. Az IHC-val létrehozott molekuláris alcsoportokat a betegek klinikai adataival korreláltuk.
3. 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.
4. Vizsgálataink eredményeinek prospektív mintákon való megerősítése folyamatban van, és amennyiben első tanulmányunk következtetései bizonyítást nyernek, úgy egy kliniko-patológiai algoritmus kialakítása lesz várható a glioblastomás betegek prognózisának és majd célzott terápiás lehetőségeiknek a feltérképezése érdekében.
5. 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.

7. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények, absztraktok és előadások

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények idegen nyelven

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 Ádám, Garzuly Ferenc, Padányi Gergely, Szűcs Iván, Feldmann Ádám, Murnyák Balázs, Hortobágyi Tibor, Kálmán Bernadette (2017). Molecular Subgroups of Glioblastoma – an Assessment by Immunohistochemical Markers. *Pathology & Oncology Research*, 1-11.

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények magyar nyelven

Nagy Ádám MSc, Éder Katalin PhD, Kálmán Bernadette MD PhD DSc Az immunválasz jellegzetességei és az immunterápia lehetőségei glioblastomában *EGÉSZSÉG AKADÉMIA*7:(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 *MAGYAR ONKOLÓGIA* – nyomtatás alatt

Az értekezés alapjául szolgáló absztraktok magyar nyelven

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)

8. Összefoglaló tudományometriai táblázat

Készült az MTMT közlemény és idéző összefoglaló táblázata alapján

Közlemény típusok	Száma	Független hivatkozások száma
I. Tudományos folyóiratcikk	2 (4)	7
Teljes cikk, nemzetközi folyóiratban (idegen nyelven)	1 (2)	7
Teljes cikk, magyar nyelven	1 (2)	-
II. Könyv	-	-
Szakkönyv/ Szerkesztett könyv	-	-
Szakkönyv/Szerkesztett könyv, idegen nyelven	-	-
Szakkönyv/Szerkesztett könyv, magyar nyelven	-	-
III. Könyvfejezet	-	-
a) Szakkönyv/Szerkesztett könyv	-	-
Könyvfejezet idegen nyelven	-	-
Könyvfejezet magyar nyelven	-	-
IV. Proceedings*	4	-
Idegen nyelven	-	-
Magyar nyelven	4	-
Tudományos közlemények összesen (I-IV.)	6 (8)	7
Egyéb tudományos művek**	14	-
Összesített impakt faktor	2.561	
Idézetség száma		7
Hirsch-index	1	

Megjegyzések:

* Konferencia előadások folyóiratban vagy könyvben, absztraktok nélkül.

** Ide értve a nem-teljes folyóiratcikket és a nem ismert lektoráltságú folyóiratokban megjelent műveket.