

EGYETEMI DOKTORI (PHD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

A *PARP1* és p53 útvonal bioinformatikai és neuropatológiai vizsgálata gliomákban

Murnyák Balázs

Témavezető: Dr. Hortobágyi Tibor



DEBRECENI EGYETEM

IDEGTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2017

A PARP1 ÉS P53 ÚTVONAL BIOINFORMATIKAI ÉS NEUROPATOLÓGIAI VIZSGÁLATA GLIOMÁKBAN

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az elméleti orvostudományok tudományágban

Írta: Murnyák Balázs okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem Idegtudományi doktori iskolája
keretében

Témavezető: Dr. Hortobágyi Tibor, az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Antal Miklós, az MTA doktora

tagok: Dr. Bagó Attila, PhD
Dr. Kovács Krisztina, az MTA doktora

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Anatómiai, Szövet- és
Fejlődéstani Intézet könyvtára 2018. január 5., 11 óra

Az értekezés bírálói:

Dr. Antal-Szalmás Péter, az MTA doktora
Dr. Tóth Erika, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Antal Miklós, az MTA doktora

tagok: Dr. Antal-Szalmás Péter, az MTA doktora
Dr. Bagó Attila, PhD
Dr. Kovács Krisztina, az MTA doktora
Dr. Tóth Erika, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet, A
épület tanterme, 2018. január 5., 13 óra

1. Bevezetés és irodalmi áttekintés

A központi idegrendszer leggyakoribb primer daganatait a gliomák képviselik. A daganatok klinikailag, szövettanilag és molekulárisan is különböző tumortípusokat foglalnak magukba. A gliomák jól körülhatárolt, illetve infiltráló tumorokra oszthatók. Előbbi kategóriába tartozik az I. grádusú pilocitás asztrocitóma, amit a lassú, nem invazív növekedés jellemez. Ezen tumorok biológiailag jóindulatúnak tekinthetők, főként gyermek, illetve fiatal felnőtt korban jelentkeznek. Az infiltráló tumorok közé a diffúz gliomákat soroljuk, melyek invazív növekedése gyakorlatilag lehetetlenné teszi a daganat teljes sebészeti eltávolítását, viszont a radio-, illetve kemoterápia hatásosnak bizonyult. A tumorok között elkülöníthetünk alacsony (II. grádusú asztrocitóma, oligodendroglioma és oligoasztrocitóma) és magas grádusú (III. grádusú anaplasztikus asztrocitóma, oligodendroglioma és oligoasztrocitóma; IV. grádusú glioblasztóma (GBM)) daganatokat.

A GBM klinikai és genetikai karakterétől függően két – szövettanilag egymástól elkülöníthetetlen – altípusáról beszélhetünk. A legújabb WHO klasszifikáció a glioblasztómát az *IDH1/2* mutációs státusztól függően vad típusú IDH GBM és mutáns *IDH1/2* gént hordozó GBM altípusokra különíti el. A primer GBM négy klinikailag releváns molekuláris alosztályra osztható a citogenetikai jellemzőik, kópiaszám-eltéréseik, pontmutációs státuszuk és génexpressziós profiljuk alapján: *Klasszikus*, *Mesenchimális*, *Proneurális* és *Neurális*.

A neuropatológiai diagnózis során a diffúz gliális daganatok altípusainak elkülönítésére – néhány molekuláris jellemző mellett – az *IDH1/2* mutációk, az 1p/19q kodeléción, az *ATRX* mutációk szolgálnak. A felsorolt markerek közül az *IDH1*^{R132H} mutáció és az *ATRX* mutációs státusza is pontosan kimutatható immunhisztokémiai (IHC) festéssel, viszont az 1p/19q kodeléción detektálása általában fluoreszcens *in situ* hibridizációval (FISH) történik. Irodalmi adatok alapján az *ATRX* mutáció következtében lecsökkent fehérje expresszió, valamint a *TP53* mutációk miatt jelentkező p53 IHC overexpresszió az 1p/19q kodeléciónal egymást kizáró események. Feltételezhető tehát, hogy az *ATRX* és a *TP53* a mutációs státusza tükrözheti az 1p/19q kodeléción jelenlétét vagy hiányát.

A p53 egy sejtmagi transzkripciós faktor, amely DNS károsodás, hősokk, hipoxia vagy onkogén túltermelés hatására aktiválódik. Az aktivált p53 képes fenntartani a genom integritását és stabilitását azáltal, hogy felfüggeszti a sejtciklust, illetve indukálja a DNS hibajavító mechanizmusát és az apoptózist. A legtöbb tumorszuppresszor mutációja következtében inaktív, csonka fehérje keletkezik, de a mutáció akár a fehérje teljes hiányát is előidézheti. A *TP53* gén ez alól kivételt képez, mivel gyakran misszensz mutációk történnek

benne, melyek a fehérjetermék lebontása helyett stabil és teljes hosszúságú fehérjét eredményeznek. A *TP53* mutációk gyors és megbízható azonosítása döntő fontosságú a pontos diagnosztikai döntésekhez és a célzott terápiához. Habár a mutációk a *TP53* gén bármely pontján létrejöhetnek, elsősorban a – konzervált DNS kötő domént lefedő – 5-8 exonokban következnek be. Fehérje szinten a 175, 245, 248, 249, 273 és 282 kodonokban képviselik a p53 mutációs forrópontjait. A *TP53* mutációk azonosítására a DNS szekvenálás a legpontosabb eljárás. Előnyös tulajdonságai miatt azonban a szövettani diagnosztikában az immunhisztokémia a legelterjedtebb módszer a p53 mutációs státuszának kimutatására. Egyes vélemények szerint a génmutációk és a fehérje overexpresszió közötti korreláció azonban nem tökéletes, így az IHC detektálás alapján nem állapítható meg pontosan a génmutációs státusza.

A tumorok rezisztenciájának biológiai alapját számos tényező, köztük a molekuláris heterogenitás és a károsodott DNS javító mechanizmusok alkotják. Továbbá a hibajavító útvonalakban közreműködő bizonyos fehérjék túlzott expresszióját is kimutatták már daganatokban. A nem megfelelően működő DNS hibajavító mechanizmusok genetikai rizikófaktorok lehetnek, mivel elősegítik a DNS egyik (SSB, single-strand break), vagy mindkét szálán (DSB, double-strand breaks) kialakuló törések következtében kialakult instabilitását. A legtöbb tumorelleses szer vagy közvetlenül, vagy a DNS replikációját követően DNS károsodást indukál. Az aktiválódó hibajavító útvonalak egyfajta rezisztencia mechanizmust biztosíthatnak ellenük, előidézve a daganatsejtek túlélését. A DNS hibajavítás gátlására több stratégia létezik. Az egyik megközelítés szerint az inhibitorok kombinált használata más DNS károsító ágenssel megnöveli a kezelés hatékonyságát, mivel gátolja a toxikus DNS léziók eltávolítását. A gátlószerek alkalmazhatók akár monoterápiaként is, amelyek szelektíven pusztítják el a DNS hibajavításban, vagy a DNS károsodásra adott válaszban hibás tumorsejteket.

A PARP1 DNS hibajavító fehérje inhibíciója új és ígéretes terápiás célpontot képvisel a glioblasztómában. Továbbá a PARP inhibitorok a tumorterápia vonatkozásában is előtérbe kerültek, és több esetben klinikai gyógyszerkipróbálási vizsgálatok is történtek. A PARP1 egy sejtmagi fehérje, amely normál körülmények között részt vesz a DNS javításában és a genom stabilitásának fenntartásában. A DNS törött szálához kötődik és poli(ADP-ribóz) láncot készít NAD⁺ szubsztrátból, amely egyfajta szignálként funkcionál a sejt számára a DNS hibajavítás elindításához. A PARP1 megnövekedett szintje fokozhatja a tumorok antiapoptotikus sajátosságát és rezisztenciát eredményez az egyes DNS károsító terápiás szerekkel szemben. A PARP gátlók azonban érzékennyé teszik a tumorsejteket a sugárterápia és a kemoterápiás szerek iránt. Az inhibitorok a PARP1 fehérje katalitikus doménjéhez kapcsolódva gátolják az ADP-ribóz

polimerek szintézisét, aminek hatására a DNS károsodásra adott sejtválasz elmarad a sejt apoptotikus halálhoz vezetve.

Az agytumороk közül glioblasztóma vonatkozásában állnak rendelkezésre korai eredmények. Újabb klinikai vizsgálatok alapján a PARP1 DNS javító fehérjét célzó terápia új és ígéretes megközelítést jelenthet glioblasztómában is. Az overexpresszált PARP1 következtében a nem megfelelő DNS hibajavító aktivitás elősegíti a tumorsejtek antiapoptotikus tulajdonságait, ami kemoterápia rezisztenciához vezethet. Bár a PARP1 legfontosabb szerepe az egyszálú DNS törések javítása, feltételezhetően hozzájárulhat a tumorprogresszió indukálásához is. A DNS károsodást követően PARP1 – a p53-hoz hasonlóan – az egyik legkorábban expresszáldó protein. A hibás DNS-sel rendelkező sejtben a p53 különböző poszttranszlációs modifikációkon megy keresztül, melyek között a PARP1 általi poli(ADP-ribozil)áció is szerepel. Továbbá az endogén PARP1 gátolja a p53 transzaktiváló funkcióját, így a PARP1 szabályozza a DNS károsodásokra adott p53 válaszokat is. Az ADP-riboz polimerek fontos szerepet töltenek be a p53 DNS kötő képességében is.

2. Célkitűzések

Az onkológia egyik legnagyobb kihívását a célzott hatóanyagokkal szemben kialakult rezisztencia jelenti. A klinikai vizsgálatok alapján a PARP1 DNS hibajavító fehérje egy új, ígéretes terápiás célpontot képvisel a glioblasztómában, viszont genomikai tulajdonságai, prognosztikus értéke a különböző GBM molekuláris altípusokban, illetve a kapcsolata a heterogenitással egyelőre nem tisztázott.

A *TP53* mutációk azonosítása a neuropatológiai diagnózis részét képezi, segít az asztrocita daganatok elkülönítésében, emellett prognosztikus értékkel is bír. Annak ellenére, hogy a p53 overexpresszió és a *TP53* mutációk közötti korreláció vitatott, rutin (neuro)patológiai diagnosztika során a mutációs státusz megállapítására a p53 immunhisztokémiai detektálása régóta használt módszer.

Vizsgálataink során az alábbi célokra fókuszáltunk:

- I. A Debreceni Egyetem Klinikai Központ Patológiai Intézetében öt év alatt (2007-2011) szövettanilag diagnosztizált gliális daganatok vizsgálata a WHO grádus, a betegek neme és életkora, illetve a daganatok anatómiai elhelyezkedése alapján
- II. A *PARP1* genomikai jellemzése és prognosztikai szerepének tisztázása a glioblasztómában:
 - a *PARP1* expresszió mértékének meghatározása a glioma WHO grádusok, valamint a IV. grádusú GBM molekuláris altípusai között
 - összefüggések keresése a *PARP1* (mRNS expresszió, kópiaszám-változás) és különböző glioma markerek mutációs státusza között (*ATRX*, *TP53*, *IDH1*)
 - a bioinformatikai analízis során nyert eredmények validálása immunhisztokémiai módszerrel egy független, klinikai kohorton
 - a pontos összefüggés meghatározása a PARP1 és a p53 útvonal között a glioblasztómában
- III. A szomatikus *TP53* mutációk gyakoriságának és immunhisztokémiai sajátosságainak vizsgálata, jellemzése agydaganatokban és egyéb gyakori tumortípusokban

3. Anyagok és módszerek

3.1 *PARP1* genomikai analízise glioblasztómában

Munkánk során a cBioPortal for Cancer Genomics (www.cbioportal.org) portálon keresztül két TCGA kohort genomikai adatait (szomatikus mutációk, kópiaszám-eltérések, mRNS expresszió) töltöttük le: Glioblastoma Multiforme (TCGA, Provisional) és Brain Lower Grade Glioma (TCGA, Provisional). Vizsgálatunk elsősorban a IV. grádusú glioblasztómára fókuszált, így az analízisek során a “*Glioblastoma Multiforme*” adathalmazt használtuk. Célunk közé tartozott a *PARP1* genomikai tulajdonságainak vizsgálata a tumorok malignus transzformációja során is, így a II. és III. grádusú gliomákat magába foglaló “*Brain Lower Grade Glioma*” adathalmazt is bevontuk az analízisbe. A genomikai adatokat a minták azonosítói alapján kiegészítettük az esetekhez tartozó klinikopatológiai paraméterekkel (életkor, nem, túlélés, *IDH1/2* és *ATRX* mutációs státusz, GBM transzkripciós alosztályok), melyeket a TCGA portálról (www.tcgadata.nci.nih.gov) töltöttünk le. A vizsgálatba bevont minták kiválasztása során az alábbi kritériumokat vettük figyelembe: a gyermekkori glioblasztómák egyedi genetikai profilja miatt csak a 18 éven felüli betegek genomikai adatait használtuk fel és csak az asztrocita eredetű tumorokat értékeltük. A *PARP1* mRNS expresszió analízist azokban az esetekben végeztük el, ahol az mRNS expresszió mellett mind szomatikus mutációs, mind a kópiaszám-változás adatok is ismertek voltak. Ezek alapján, összesen 135 GBM és 96 alacsonyabb grádus mintát vontuk be a vizsgálatba. A molekuláris altípus 119 esetben volt elérhető, melyek megoszlása a következő volt: 57 *Mesenchimális*, 43 *Klasszikus*, 16 *Proneurális* és 5 *Neurális*. A mintákat *PARP1* expresszió és a p53 útvonal asszociációja, illetve a túlélési vizsgálatok miatt a medián *PARP1* mRNS z-score értékek alapján alacsony- (n=67), illetve magas-PARP1 (n=68) csoportokra osztottuk.

3.2 A vizsgálatok beteganyagai

Retrospektív vizsgálataink során a Debreceni Egyetem Klinikai Központ Pathológiai Intézetében 2007-2011 között rutin kórszövettani feldolgozáson átesett glioma 127 esetben (62 férfi / 65 nő) II. grádusú, illetve 214 (110 férfi / 104 nő) WHO III. és IV. grádusú gliális daganatot foglalt magába. A vizsgálatainkhoz szükséges minták retrospektív előkeresése a korábban szövettanilag diagnosztizált, *eMedSolution* adatbázisban meglévő adatok alapján történt. Munkánk során a daganatokat az alábbi szempontok alapján vizsgáltuk és

csoportosítottuk: WHO grádus, a betegek neme és életkora, illetve a daganatok anatómiai elhelyezkedése.

A bioinformatikai eredmények validálása érdekében egy szintén retrospektív vizsgálat során 60 (30 nő és 30 férfi) a Debreceni Egyetem Klinikai Központ Pathológiai Intézetében 2006 és 2014 között glioblasztómával diagnosztizált beteg formalin-fixált, paraffinba ágyazott (FFPE) blokkjait gyűjtöttük össze. A betegek átlagéletkora 58,5 év volt. Minden kiválasztott eset haematoxylin-eosin (H&E) metszetét a 2016-os 'WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System' alapján neuropatológus segítségével átvizsgáltuk.

3.3 Immunhisztokémiai vizsgálatok

Az immunhisztokémiai vizsgálatokat 4 µm-es FFPE metszetekből automatizált és standardizált körülmények között végeztük a *Leica Bond Max™* immunhisztokémiai automatán (Leica Biosystems, Wetzlar, Németország) a *Bond™ Polymer Refine Detection* kittel. Az immunhisztokémiai jelölések minden esetben a gyártók protokollja alapján történt az anti-p53, anti-ATRX, anti-IDH1^{R132}, és anti-PARP1 primer antitestek alkalmazásával. Vizualizációra a *Bond™ Polymer Refine Detection* kittet használtuk, emellett hematoxylin festést is alkalmaztunk. A reakciókhoz a gyártók által javasolt pozitív kontrollokat alkalmaztunk, emellett negatív kontrollként minden esetben a primer antitestet kihagytuk a reakcióelegyből. Az immunhisztokémiai festések kiértékelése szemi-kvantitatív módon két független megfigyelő által történt. A kiértékelés során azokat a mintákat tekintettük IDH1^{R132H} és p53 pozitívnak, ahol a tumorsejtek több mint 10%-a pozitív festődést. Az ATRX jelölés esetében szintén a 10%-os cut-off értéket alkalmaztunk a nukleáris pozitivitás megállapítására. A PARP1 expressziója a pozitív sejtek százalékos eloszlása alapján történt az alábbi módon: "0" (<5%, negatív), "1" (5–25%, sporadikus), "2" (25–50%, fokális), és "3" (>50%, diffúz). A későbbi statisztikai kiértékelés kedvéért a negatív és a sporadikus festődést mutató eseteket, valamint a fokális és a diffúz eseteket egymással összevontuk és két csoportot különítettünk el: alacsony és magas PARP1 csoport.

3.4 TP53 mutációk IHC mintázatának vizsgálata

A *TP53* mutációk karakterizálására és az IHC expressziós mintázatukkal való korrelációt az IARC által 2013-ban kiadott (R17) szomatikus *TP53* mutációs adathalmazt (<http://p53.iarc.fr/TP53SomaticMutations.aspx>) használtuk. A szomatikus *TP53* mutációk leírására során a P04637 Uniprot referencia szekvencián alapuló 'Human Genome Variation

Society' (HGVS) standardjait alkalmaztuk. Az ismert IHC karakterrel bíró *TP53* mutációkat különböző szempontok alapján vizsgáltuk: I) a mutáció génen belüli lokalizációja; II) a mutáció következménye; III) a mutáció típusa; IV) a p53 fehérjén belül érintett strukturális motívum. Az adatbázisban megtalálható individuális *TP53* mutációkat gyakoriságuk és IHC pozitivitásuk (az IHC pozitív esetek osztva az összes esettel) alapján három csoportba soroltuk: *A csoport* (IHC pozitív, hot-spot mutációk; a mutációk frekvenciája $\geq 0,013$ és az IHC pozitivitás $\geq 0,85$); *B csoport* (főleg IHC negatív nonszensze mutációk; a mutációk frekvenciája $\leq 0,011$ és az IHC pozitivitás $\leq 0,44$); *C csoport* (IHC pozitív, kevésbé gyakori misszensz mutációk; a mutációk frekvenciája $\leq 0,072$ és az IHC pozitivitás $\geq 0,74$). Vizsgálatunk csak azokat a *TP53* mutációkat foglalja magába, amely esetében 15, vagy több minta IHC jellemzője állt rendelkezésünkre.

3.5 Statisztikai és bioinformatikai analízis

A statisztikai kiértékeléseket az R (www.R-project.org) és a SPSS 19.0 (SPSS Inc., Chicago IL) statisztikai szoftverekkel végeztük. A kategorikus értékeket tartalmazó csoportok összehasonlítása során a Pearson Khi-négyzet (χ^2) tesztet alkalmaztuk. Az egyes csoportok életkora közötti asszociációkat a Mann–Whitney U teszt segítségével határoztuk meg. A különböző gének mRNS expressziója közötti összefüggéseket Kendall tau és Spearman korrelációs tesztekkel elemeztük. A csoportok közötti mRNS expresszió közötti különbségeket két-oldali Student t-teszt segítségével állapítottuk meg. Az egyes csoportba tartozó betegek teljes túlélése közötti kapcsolatok vizsgálatára Kaplan–Meier módszert és Log-Rank (Mantel-Cox) tesztet alkalmaztunk. Minden esetben két-oldalú statisztikai tesztet használtunk, szignifikánsnak $p < 0,05$ eseteket vettük. A p53 útvonal és *PARP1* közötti gén-gén interakciós hálózatot a Cytoscape 3.4.0 szoftver GeneMania applikációjával készítettük a vizsgált gének fizikai, ko-expressziós és gén-gén interakciós tulajdonságait figyelembe véve. A *TP53* mutációk tumortípusok közötti frekvencia különbségeinek hő térkép ábrázolására a Gene-E version 3.0.204 (<http://www.broadinstitute.org/cancer/software/GENE-E/index.html>) szoftvert használtuk.

4. Eredmények

4.1 A Debreceni Egyetem Patológiai Intézetében szövettanilag diagnosztizált diffúz gliómák jellemzése

Munkánk első szakaszában összesen 127 alacsony (II.) grádusú és 214 magas (III. és IV.) grádusú gliális agydaganatot vizsgáltunk a diagnózis éve, a tumor WHO grádusa, a betegek neme, életkora és a tumor anatómiai lokalizációja szerint. A diagnosztizált 127 II. grádusú gliális tumor közül 51 betegnél állapítottak meg (40%) diffúz asztrocitómát, 39 betegnél (31%) oligodendrogliomát és 37 betegnél (29%) oligoasztrocitómát. A betegek (62 férfi és 65 nő) átlagéletkora 39 év ($\pm 20,3$) volt. A diffúz asztrocitómával diagnosztizált betegek átlagéletkora 37,6 év, az oligodendrogliomával 34,8 év és az oligoasztrocitómával diagnosztizáltaknál 45,5 év volt. A férfi és női nemi arány diffúz asztrocitómában szenvedő betegek esetében 1:1,3, az oligodendrogliomában 2:1 és az oligoasztrocitómában pedig 1:1,6 volt.

A magas grádusú gliális daganatok 85%-a (182 eset) WHO IV. grádusú glioblasztóma, míg a maradék 15% (32 eset) III. grádusú anaplasztikus glioma volt. A 184 glioblasztómás eset közül 142 (78%) betegnél diagnosztizáltak primer glioblasztómát, 24 esetben (13,2%) állapítottak meg szekunder glioblasztómát, míg 8-8 esetben (4,4-4,4%) írtak le óriássejtes glioblasztómát és glioszarkómát. Az összesen 32 III. grádusú glioma közül 19 betegnél (59,4%) diagnosztizáltak anaplasztikus asztrocitómát, 8 betegnél (25%) anaplasztikus oligodendrogliomát és 5 betegnél (15,6%) anaplasztikus oligoasztrocitómát. A magas grádusú gliómában szenvedő betegek átlagéletkora 57 év volt ($\pm 16,4$). A nemek aránya 110 férfi és 104 nő. Glioblasztómát 88 férfi és 94 nő, míg anaplasztikus gliomát 22 férfi és 10 női betegnél állapítottak meg. A II. grádusú glioma anatómiai lokalizációjáról összesen 74 beteg esetén álltak rendelkezésünkre pontos információk. Az asztrocita eredetű daganatok ($n=24$) legfrekvenciáltabb helye a homloklebény volt (54%), 25%-ban a halántéklebény, 8%-ban az agytörzs, továbbá 4%-ban a fali és a nyakszirti lebenyekben és a kisagyban is fordult elő a daganat. Az oligodendroglia eredetű tumorok lokalizációja ($n=25$) a homlok- és halántéklebényben közel azonos volt (48 vs. 40%), az agytörzsben 8% és a nyakszirti lebenyben 2%-ban fordult elő. Az oligoasztrocitómák ($n=25$) 60%-át a homloklebényben, 24%-ukat a halántéklebényben, 12%-ukat pedig a nyakszirti lebenyben azonosították. A daganatok anatómiai lokalizációját illetően 91 glioblasztóma esetében állt rendelkezésünkre pontos adat. Az összes GBM-et tekintve a daganatok kialakulási helye a következő volt: a homloklebény ($n=51$), halántéklebény ($n=25$), fali lebeny ($n=11$), nyakszirti lebeny ($n=3$). A klasszikus

glioblasztóma (n=77) anatómiai lokalizációja az esetek több mint felében (53%) a homlok lebenyben volt, amit a halántéklebeny (28%), a fali lebeny (14%) és a nyakszirti lebeny (4%) követett. Egy esetben a daganat helye a kisagyban volt. Glioszarkóma (n=6) a homlok- és a halántéklebenyben fordult elő 3-3 esetben, míg a legtöbb óriássejtes GBM (n=7) a homloklebenyben lokalizálódott, egy betegnél fordult elő a halántéklebenyben.

4.2 A *PARP1* genomikai jellemzői glioblasztómában

Első lépésben a cBioPortal (<http://www.cbioportal.org/public-portal/>) felületen keresztül letöltött TCGA GBM mintákban *PARP1* mutációkat és kópiaszám-változásokat vizsgáltuk. A mutációkat tekintve a 135 mintából mindösszesen két *PARP1* mutációt találtunk (V948I és A709T) IV. grádusú glioblasztómában. Kópiaszám-változás összesen 562 GBM mintában volt elérhető. A *PARP1* gén nyeres vagy heterozigóta deléciója a vizsgált esetek több, mint 14% és 6%-ában volt megfigyelhető. Ezzel ellentétben a *PARP1* amplifikációja csak ritkán fordult elő (0,35%), míg homozigóta deléció nem volt megfigyelhető egy esetben sem. Következő lépésben a *PARP1* mRNS expresszió mértékét vizsgáltuk meg. Összesen 135 esetet vontuk be az analízisbe, melyeknél az mRNS expressziós adatok mellett mind a DNS szekvenálás, mind a kópiaszám-változás adatok is rendelkezésünkre álltak. A kópiaszám-változás és mRNS expresszió korrelációját vizsgálva statisztikailag szignifikáns különbségeket találtunk a heterozigóta deléció és diploid ($p=0,005$), nyeres és diploid ($p<0,001$), és a heterozigóta deléció és nyeres státuszok között ($p<0,001$). Ezen eredmények azt sugallják, hogy a kópiaszám-eltérések (jelen esetben a *PARP1* nyeres, illetve a heterozigóta deléció) az mRNS expresszió változások mögött álló egyik lehetséges mechanizmus lehet glioblasztómában.

Ahhoz, hogy összehasonlítsuk a *PARP1* jelentőségét a gliomák malignus transzformációjában a cBioPortal-ról letöltött *Brain Lower Grade Glioma (TCGA, Provisional)* genomikai adatait is vizsgáltuk. Kópiaszám-változás az 562 GBM (IV. grádus) mellett összesen 55 II. grádusú, illetve 114 III. grádusú asztrocitómában volt elérhető. Kópiaszám-változások gyakorisága a vizsgált grádusok közül a II. grádusú tumorokban (3,6%) volt a legalacsonyabb, ez az érték a III. grádus esetében (16,7%), míg a IV. grádusban (21,5%) volt. *PARP1* kópiaszám-változások szignifikáns különbséget mutattak az egyes WHO grádusok között ($p<0,001$). A *PARP1* gén nyeres a IV. grádusú glioblasztómában, mind a III. grádusú asztrocitómában is gyakori, hasonlóan a heterozigóta deléciót eredményező kópiaszám-változásokkal. A *PARP1* gén homozigóta deléciója kifejezetten ritkának mondható, mivel csak a II. grádusú daganatok 0,1%-ban fordult elő. *PARP1* gén amplifikációja pedig csak a IV.

grádusú daganatok 0,3%-ban volt megfigyelhető. *PARP1* mRNS expresszió 29 II. grádusú és 67 III. grádusú asztrocitóma mintában volt elérhető. A glioma grádusokat összehasonlítva, a magas grádusú gliomák – azaz a III. és IV. grádus tagjai – emelkedett *PARP1* mRNS szinteket mutattak a II. grádusú asztrocitómához képest (II. grádus vs. III. grádus $p=0,003$, és II. grádus vs. IV. grádus, $p<0,001$). Bár a *PARP1* expresszió magasabb volt a IV. grádusban, szignifikáns eltérés nem volt kimutatható a IV. és a III. grádus között.

Munkánk során vizsgáltuk a *PARP1* expressziós mintázatát a GBM molekuláris heterogenitásával összefüggésben. A *PARP1* mRNS expresszió mértékét *IDH1*, *ATRX* és a *TP53* gének mutációs státuszának függvényében is vizsgáltuk. A mutáns *ATRX* ($p=0,006$) és *TP53* ($p=0,015$) géneket hordozó mintákban szignifikánsan magasabb *PARP1* expresszió volt megfigyelhető, viszont az *IDH1* gén státusza nem mutatott kapcsolatot. A TCGA adatbázis tartalmazza a minták *IDH1/2* és *ATRX* státuszát. Mivel munkánk egyik célja a *PARP1* expresszió és *TP53* mutációk közötti összefüggés tisztázása volt, így meghatároztuk az egyes GBM minták *TP53* mutációs státuszát is. A vizsgált mintákban a vad típusú *TP53* gén 92 esetben, míg mutáns 43 mintában volt megfigyelhető. A mutáns *TP53* gént hordozó mintákat a mutáció típusa szerint tovább csoportosítottuk misszensz ($n=33$) *TP53* és nonszensz *TP53* ($n=10$) mutációkra. A *PARP1* mRNS expressziója magasabb volt azokban a tumorokban, ahol a *TP53* mutáns volt ($p=0,015$) szemben a vad típusú gént hordozókkal. Fontos kiemelnünk, hogy a misszensz és a nonszensz mutációk és a *PARP1* expresszió között nem találtunk szignifikáns különbséget.

Az bioinformatikai analízis eredményeiből kifolyólag – ahol a *PARP1* mRNS expresszió szignifikáns összefüggést mutatott a *TP53* és az *ATRX* mutációs státuszaival – a markereket immunhisztokémiai módszerrel is megvizsgáltuk. Korábbi, meningeoma agydaganatokban végzett vizsgálatokkal megegyezően, a *PARP1* a glioblasztómában is sejtmagi festődést mutatott. Az esetek 90%-a (54/60) mutatott *PARP1* pozitív festődést, míg 10%-a (6/60) negatív volt. A *PARP1* IHC expressziója a vizsgált klinikai kohortban szignifikáns összefüggést mutatott a p53 ($p=0,0281$) és *ATRX* ($p=0,002$) expressziókkal. Ellenben az *IDH1*^{R132H} expresszióval nem figyeltünk meg hasonló összefüggéseket.

A *PARP1* genetikai/genomikai jellegzetességeit vizsgálva a különböző GBM altípusokban megállapítottuk, hogy a *Proneurális* és a *Klasszikus* GBM altípusok megnövekedett *PARP1* expressziót mutatnak. Részletesebben, a *Proneurális* (átlag z-score érték: 0,801) és a *Klasszikus* (átlag z-score érték: 0,375) altípusokban szignifikánsan magasabb *PARP1* mRNS szint volt megfigyelhető a *Mesenchimális* (átlag z-score érték: -0,121) és a *Neurális* (átlag z-score érték: -1,049) altípusokhoz képest. Ezzel párhuzamosan a *PARP1*

kópiaszám-változásokat szintén megvizsgáltuk a GBM altípusokban. *PARP1* gén kópiaszám információja 475 olyan esetben volt leírva, ahol a transzkripció alosztály is ismert. A *Proneurális* altípus mutatta a legnagyobb arányú kópiaszám-változást (0,275), amit sorrendben a *Mesenchimális* (0,226), *Neurális* (0,224), és a *Klasszikus* (0,129) altípus követett. *PARP1* kópiaszám nyereség az összes alcsoportban hasonló gyakorisággal előfordult: *Mesenchimális* (4,4%), *Proneurális* (4,4%), *Klasszikus* (2,9%) és *Neurális* (2,3%). A *PARP1* gén heterozigóta deléciója a *Mesenchimális* GBM-ek 3,4%-ában volt megfigyelhető. *PARP1* amplifikáció csak a *Klasszikus* és *Mesenchimális* alcsoportokban figyeltük meg (0,2-0,2%).

Annak érdekében, hogy megállapítsuk a *PARP1* klinikai relevanciáját, megvizsgáltuk a *PARP1* mRNS expresszió és a betegek teljes túlélése (Overall Survival; OS) közötti kapcsolatot a TCGA adatbázis glioblastóma mintáiban. Az TCGA adatbázisban található GBM betegek átlagos teljes túlélése 13,3 hónap volt. A *PARP1* mRNS expresszió alapján a rendelkezésünkre álló mintákat magas-PARP1 (n=68) és alacsony-PARP1 (n=67) csoportokra bontottuk. Az alacsony-PARP1 csoport betegek átlagosan hosszabb túlélést mutatnak, azonban nem találtunk statisztikailag szignifikáns különbséget a két csoport között. A betegek átlagos túlélése a különböző GBM alosztályok között a következő volt: *Klasszikus*=12,7; *Proneurális*=19,8; *Mesenchimális*=11,7, és *Neurális*=7, hónap. Az elvégzett Kaplan-Meier túlélés analízis alapján a *Klasszikus* GBM altípusban az alacsony-PARP1 csoport betegeinek szignifikánsan rövidebb teljes túlélést mutattak a magas-PARP1 expressziós csoport betegeivel szemben (p=0,031). A p53 és a PARP1 együttes szerepét a GBM betegek túlélésével kapcsolatban is megvizsgáltuk. Ennek céljából a TCGA mintákat tovább csoportosítottuk a PARP1 mRNS expresszió és a TP53 mutációs státuszuk szerint: *TP53^{mut}/magas-PARP1* (n=29); *TP53^{mut}/alacsony-PARP1* (n=14); *TP53^{WT}/magas-PARP1* (n=39); *TP53^{WT}/alacsony-PARP1* (n=53). Eredményeink alapján a vad típusú TP53 génnel és magas-PARP1 expresszióval rendelkező betegek rövidebb túlélést mutatnak (p=0,039).

Korábbi eredményeink alapján, a TP53 mutációkon túl, részletesen megvizsgáltuk a PARP1 expresszió és a teljes p53 útvonal (*CDKN1A* (p21), *MDM2*, *MDM4*, *CDKN2A* (p14), and *TP53BP1*) közötti kapcsolatot is. Az mRNS expressziót tekintve, a *PARP1* szignifikáns korrelációt mutatott a *TP53*, *CDKN1A*, és a *TP53BP1* génekkel. A *PARP1* expresszió szintén szignifikáns kapcsolatot mutatott a *CDKN2A* és *MDM4* gének kópiaszám-változásaival. A diploid esetekhez viszonyítva a homozigóta deletált *CDKN2A* gént hordozó eseteket csökkent (p=0,013), míg az az *MDM4* nyereséget mutató eseteket emelkedett *PARP1* expresszió (0,026) jellemezte. Ezek alapján a magas-PARP1 csoportban a szignifikánsan magasabb TP53

($p=0,003$), és *TP53BP1* ($p=0,004$) expresszió volt megfigyelhető, míg a *CDKN1A* ($p=0,009$) expresszió az alacsony-PARP1 csoportban volt szignifikánsan magasabb.

4.3 A mutáns p53 IHC expressziója az IARC adatbázis alapján

Vizsgálatunk egyik célja a *TP53* gént érintő mutációk IHC jellemzőinek karakterizálása volt. Munkánk során összesen 7878 mutáció p53 IHC expressziós mintázatát vizsgáltuk. Az IHC festődés 6025 mutációnál volt pozitív, ami az összes vizsgált mutációnak a 76,5%-a, míg 1852 (23,5%) mutáció negatív IHC jelölődést mutatott ($p<0,001$). A létrejövő mutációk típusát tekintve, a pontmutációk (74,9% - 84,6%) mellett a duplikáció (93,8%) és a komplex *TP53* mutációk egyaránt IHC pozitívnak bizonyultak. A deléciók (57%) és inszerciók (59,7%) viszont főként IHC negatívak voltak az IARC *TP53* adatbázisban elérhető esetekben. A várakozásnak megfelelően a misszensz mutációk 88%-ka IHC pozitív, míg a nonszensz mutációk 71,2%-ka IHC negatív volt ($p<0,001$). A *TP53* gén kódoló régióit tekintve (2-11 exonok) a mutációk 77,3% IHC pozitív, míg a nem kódoló szakaszokban bekövetkező mutációk több, mint fele (56,5%) IHC negatív ($p=0,001$) volt. A mutációk IHC pozitívnak bizonyultak a gén promóterében található CpG szigetekben (83,3%) és azokon kívül is (73,3%) ($p<0,001$). *TP53* mutációk szintén IHC jelölődést mutattak a *TP53* gén ún. nem splicing (77%), valamint az alternatív (83,1%) és a kriptikus (74,2%) splicing helyekben, viszont a konszenzus splicing helyeken bekövetkező mutációk 64,3% IHC negatívnak mutatkoztak. Az adatbázisban található 29711 szomatikus *TP53* mutációból IHC jellemző összesen 7878 (1139 egyedi) mutáció esetében volt elérhető. Ezek közül 6026 eset p53 IHC pozitív, míg 1852 mutáció negatív volt. A leírt mutációk többsége (91,9%) az 5-ös, 6-os, 7-es vagy a 8-as exonokban lokalizálódott. A mutációk több, mint kétharmada (68,2%) CpG szigeteket nem tartalmazó génrégiókban következett be, és mindössze 3,1%-uk keletkezett intron kivágódási (splicing) helyen. A mutációk típusát tekintve, 6860 (87,1%) egy nukleotidot érintő pontmutáció, 667 (8,5%) deléció, 196 (2,5%) inszerció, 97 (1,2%) duplikáció és 48 (0,6%) komplex mutáció. A mutáció típusa 10 minta esetében nem volt elérhető. A mutációk következményét tekintve leggyakrabban (74,8%) misszensz, frameshift (8,6%), nonszensz (7%), néma (4,7%), splicing (1,7%), introni mutáció (0,7%) és nagy deléciók voltak (0,03%). Az eltérések 2,3% egyéb következménnyel járt, míg 0,4%-ban nem ismert az adott mutáció hatása. A p53 fehérje strukturális motívumaiban keletkezett mutációk között is eltérő p53 IHC jelölődés volt megfigyelhető. Egyöntetű pozitív jelölődés volt megfigyelhető a következő motívumok között: L1/S/H2 (86,2%), L2/L3 hurkok (84,3%), és a NDBL/béta-lemezek (70,1%). Emellett a fehérje

C-terminális (55,6%), C-terminális/NLS (58,1%), és N-terminális/Transzaktivációs/NES (60%) motívumai is többnyire pozitívak voltak. Másrészt, az N-terminális (76,5%), N-terminális/ Transzaktivációs (60,6%), és a SH3-like/Prolin-gazdag (59,4%) motívumokban kialakult mutációk általában IHC negatívak voltak. Az IARC adatbázisban 224 mutáció esetében a strukturális motívum nem volt elérhető.

Vizsgálatunk során meghatároztuk az egyes *TP53* mutációk IHC expressziós profilját és összehasonlítottuk a klinikopatológiai jellemzőkkel. Első lépésben meghatároztuk az IARC adatbázisban megtalálható *TP53* mutációk gyakoriságát, majd az egyes mutációkhoz hozzárendeltük az adott p53 IHC pozitivitását (az IHC pozitív esetek / összes eset). A p53 fehérje mutációs forrópontjaihoz tartozó kodonok pozitívak voltak: 175. (89,7%), 245. (90,7%), 248. (93,3%), 249. (88,0%), 273. (92,6%) és a 282. (90,9%). Ezzel szemben a mutációk negatívnak bizonyultak a 213. (57,7%), 196. (65,2%), 306. (60,9%), 146. (63,6%) és a 298. (60,7%) kodonokban. A hot spot kodonokban található összes mutáció (R175H, G245S/D, R248Q/W/L, R249S, R273H/C/L és a R282W) IHC pozitívnak bizonyult 87,2% és 100% között. Ellenben az egyes gyakori nonszensz mutációk (R213*, R196*, R306*, W146*, és E298*) többnyire IHC negatívnak bizonyultak (63,4-75,6%). Vizsgálatunk csak azokat a szomatikus *TP53* mutációkat foglalta magába, amelyek esetében tizenöt, vagy annál több IHC adat áll rendelkezésre (n=78). A mutációkat az adatbázisban előforduló gyakoriságuk és IHC pozitivitásuk alapján három csoportba soroltuk: *A*, *B* és *C csoport*. Az *A* és a *C csoport* összes tagja misszensz, míg a *B csoport* tagjai nonszensz mutációk voltak ($p < 0,001$). A csoportosított mutációk 11,5%-a az *A csoport*ba tartozott, ezek az ún. "hot-spot" és IHC pozitív mutációk, a *B csoport*ba a gyakori és IHC negatív mutációk (7/78; 9%), míg a *C csoport*ba a kevésbé gyakori, IHC pozitív mutációk tartoztak (62/78; 79,5%).

Összesen 4897 *TP53* mutációhoz volt hozzárendelhető a beteg neme, melyek eloszlása a következő volt: 2797 nő (57,2%) és 2097 férfi (42,9%). A *TP53* mutációk mindkét nemben IHC pozitívak voltak (75,8% vs. 76,4%). Az IHC negatív esetekben a nők átlagéletkora szignifikánsan fiatalabb volt ($55,90 \pm 15,39$ év vs. $58,57 \pm 15,06$ év, $p=0,0182$) a szintén IHC negatív, mutációt hordozó férfiakéval szemben. A pozitív IHC mutációkat tekintve nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget az átlagéletkor és a betegek neme között ($56,44 \pm 16,86$ vs. $57,22 \pm 15,77$ év, $p=0,204$). A fenti klinikopatológiai paramétereket megvizsgáltuk a három p53 IHC mutációs csoportban is. Annak ellenére, hogy az agydaganatok esetében nem tapasztaltunk különbségeket, öt másik tumortípus esetén (mell, hólyag, hemopoetikus rendszer, máj, fej-nyak) szignifikáns eltéréseket figyeltünk meg az egyes csoportok átlagéletkora között. A mellrákban érintett nonszensz *TP53* mutációkat hordozó betegek (*B csoport*) átlagéletkora

fiatalabb volt ($48,83 \pm 13,69$ év) másik két csoporthoz képest (*A csoport*: $55,06 \pm 13,99$ év és *C csoport*: $55,97 \pm 14,07$ év). Hasonló különbségek mutatkoztak a hólyagrákos betegeknél a *B* ($59,52 \pm 14,20$ év) és az *A csoport* ($64,44 \pm 12,57$ év) között. A májrákban szenvedő betegeknél pedig az *A csoport* idősebb volt a *C csoport* betegeihez képest. A misszensz mutációkat tartalmazó *A* és *C csoportokat* összevetve megfigyeltük, hogy a hemapoetikus rendszer daganataiban érintett *A csoportba* tartozó betegek átlagosan fiatalabbak voltak, míg a fej-nyaki daganatokban a *C csoport* betegei voltak fiatalabbak. A nonszensz *TP53* mutációk (*B csoport*) esetén rosszabb prognózissal, és rövidebb túléléssel kell számolni. Eredményeink alapján ezen mutációk többsége IHC negatívnak bizonyult, így munkánk során ezt a csoportot részletesen is elemeztük. A mutációk előfordulási gyakoriságát tekintve jelentős eltéréseket figyeltünk meg a különböző tumortípusok között.

A *TP53* szomatikus mutációinak IHC jellemzőit a rendelkezésre álló 353 gliális agydaganatban részletesen vizsgáltuk. Mivel a vad típusú *TP53* gén IHC profilja nem elérhető az IARC *TP53* adatbázisában, így az álpozitív IHC jelölődés tesztelését nem tudtuk elvégezni. Vizsgálatainkat kiegészítettük az TCGA adatbázisban elérhető 232 asztrocitóma (II., III., és IV. grádus) *TP53* mutációs státuszával és összevetettük azok mRNS expressziójával. A mutációk tulajdonságait tekintve a tapasztalt 108 mutáció 22,2%-a volt nonszensz mutáció, melyek többsége exonon kívül, az intronokban keletkezett. Az mRNS – mutációs státusz korreláció alapján a *TP53* státuszának az átlag mRNS expresszió (z-score) értékei a következők voltak: vad típus ($-0,004$); misszensz mutációk ($0,08$); nonszensz mutációk ($-0,46$). A vizsgált tumortípusokhoz viszonyítva, az agydaganatokban kevésbé gyakoriak az IHC negatív jelölődést mutató, *B csoportba* tartozó nonszensz *TP53* mutációk.

5. Diskusszió

Bár több hazai közlemény is foglalkozik a gliális tumorokkal, a magas grádusú gliomák magyarországi előfordulásáról nem állnak rendelkezésre részletes információk. Munkánk egyik célja ezen hiányosság pótlása volt, így az Intézetünkben 2007 és 2011 között szövettanilag diagnosztizált magas grádusú gliomákat tekintettük át. A vizsgálat összesen 341 gliális daganatot foglalt magába. A tumorokat a diagnózis éve, a tumor WHO grádusa, a betegek neme, életkora és a tumor anatómiai lokalizációja szerint is elemeztük.

A fejlődő kezelési eljárások ellenére a malignus gliomákban szenvedő betegek továbbra is rossz prognózissal rendelkeznek, így a tumortípus molekuláris hátterének megismerése,

illetve célzott hatóanyagokkal szemben kialakult rezisztencia kivédése a daganatkutatás egyik legsürgetőbb területét képviseli. Annak ellenére, hogy a PARP1 fehérje jelentősége már ismert, genomikai tulajdonságai, prognosztikus értéke a különböző GBM molekuláris altípusokban, illetve a kapcsolata a heterogenitással egyelőre nem tisztázott. A *PARP1* szerepét különböző idegrendszeri megbetegedésekben is leírták, illetve overexpressziója több daganat típusban is gyakori, beleértve a glioblasztómát. A megnövekedett *PARP1* expressziót leírták már gyermekkori magas grádusú asztrocitómákban, medulloblasztómában és ependimómában. GBM őssejtekben a PARP inhibitorok és a temozolomid (TMZ) kombinációja értékes stratégiát képviselhet az őssejtek kemo-rezisztenciájának visszafordításában. A PARP inhibitor és TMZ egyidejű alkalmazása egymást erősítő, antitumor hatású tízből nyolc glioblasztóma őssejtvonalban. Mi több, a TMZ dózis csökkentésére minden sejtvonal reagált PARP inhibitor iránti érzékenységének megváltozásával. A TCGA genomi adatai alapján elvégzett bioinformatikai analízisünk rámutatott arra, hogy a *PARP1* expressziója csökkent mértékű a magasabb grádusú tumorokban, ami háttérben részben kópiaszám eltérések is állhatnak. Eredményeink megerősítik, hogy emelkedett *PARP1* expresszió megfigyelhető a magasabb grádusú asztrocitómákban, feltehetően azért, mert a magasabb *PARP1* expresszió elősegíti a károsodott DNS javítását, ezáltal megakadályozza a genetikai instabilitás kialakulását a tumorsejtekben.

A GBM komplex, heterogén természete miatt lényeges a *PARP1* asszociációkat vizsgálni kulcs molekuláris markerekkel. Az *ATRX*, *IDH1* és *TP53* mutációk fontossága az asztrocitás glióma korai fejlődésében és progressziójában jól ismert. Ezeknek a markereknek szintén terápiás és prognosztikai jelentőségük van, emellett mutációs státuszuk alapján elkülöníthetők az asztrocitómák az oligodendrogliómáktól, illetve a szekunder glioblasztóma a primertől. Vizsgálataink során megállapítottuk, hogy *PARP1* expresszió megfigyelhető IDH szerinti vad típusú és mutált GBM-ben egyaránt. Habár nincs statisztikailag bizonyított kapcsolat a *PARP1* expresszió és az *IDH1/2* mutációk között, egy újabb tanulmány szerint mutált IDH által termelt 2-hidroxiglutarát előidéz a betegből származó primer glióma sejtek és genetikailag összeillő tumor xenograftok PARP inhibitor érzékenységét.

Az *IDH1/2* mutációkkal ellentétben a magasabb *PARP1* expressziós szint szoros összefüggésben áll az *ATRX* és *TP53* mutációkkal. *ATRX* alterációk előfordulhatnak az alacsony grádusú asztrocitómákban és az *IDH1* mutált (szekunder) glioblasztómák többségében is. Szomatikus mutációk a *TP53*-ban fontos szerepet játszanak a gliómákban, különösen az alacsony grádusú asztrocitómák és *IDH1* mutált GBM tumorgenezisében. Figyelembe véve a PARP1 enzim gátlásának dózis függését, eredményeink azt jelzik, hogy a PARP inhibitorok

hatékonyabbak lehetnek *ATRX* és *TP53* mutált tumorokban, ahol a *PARP1* szint rendszerint megnövekedett.

Bár a nagy áteresztőképességű technológiák diagnosztikai célú alkalmazása egyre nagyobb teret nyer, az immunhisztokémia még mindig a legelterjedtebb módszer a tumorok szövettani diagnózisának megállapítására. Ennek tudatában igény mutatkozik az immunhisztokémián alapuló glioblasztóma klasszifikáció finomítására és a molekuláris adatokkal való egyesítésre. A *PARP1* IHC expresszióját korábban megfigyelték glioblasztómában, de *PARP1* kapcsolatát a molekuláris markerekkel ezidáig nem vizsgálták. A munkánk során a *PARP1* expresszió kapcsolatát három – (*p53*, *ATRX* és *IDH1*) a jelenlegi neuropatológiai diagnózis részét képező – molekuláris markerrel is megvizsgáltuk. Az *IDH1* mutációk megállapítására a gliómában leggyakoribb (>85%) *IDH1*^{R132H} mutáció-specifikus antitestet használnak. Az *ATRX* gén a normál agyban kifejeződik, de a bekövetkező mutációk egy csonka, immunhisztokémiával nem detektálható terméket eredményeznek. A *TP53* mutációs státuszának IHC predikciója jóval összetettebb, aminek tárgyalásával a dolgozat is részletesen foglalkozik. Eredményeink alapján a *PARP1* és az *ATRX* IHC expressziója között fordított, a *p53* overexpresszióval pedig pozitív korrelációt mutat. Ezen megfigyelések azt sugallják, hogy a *PARP1* IHC expressziója a *p53* túltermelődésével (ami mutáns *TP53* gén jelez) és az *ATRX* elvesztésével (ami szintén mutáns *ATRX* gént jelez), ígéretes prediktív marker lehet a *PARP* gátlásnak GBM-ben.

Eredményeink alapján a *PARP1* expresszió jelenléte vagy hiánya elkülönítheti a *Proneurális* és a *Klasszikus* glioblasztómákat a másik két altípustól. Emellett, a magas *PARP1* szint kapcsolatban áll a rövidebb túléléssel a *Klasszikus* csoportban. Korábban már leírták, a *Klasszikus* glioblasztóma *EGFR* amplifikáció mellett vad típusú *TP53* génnel jellemezhető, míg a *Proneurális* altípust *IDH1* és *TP53* mutációk, illetve *PDGFRA* amplifikáció is jellemzi. Ezekből az összefüggésekből kiindulva azt feltételezzük, hogy a *PARP1* és *p53* potenciális markerek lehetnek a *Proneurális* és a *Klasszikus* altípusok egymástól való elkülönítésére, valamint prognosztikai értéket is képviselnek a GBM-ben.

A *p53* immunpozitivitása összefügg a *TP53* mutációs státuszával, kivéve egyes nonszensz mutációkat (*B csoport*), melyek gyakorisága a gliális daganatokban elenyésző. GBM-ben azt találtuk, hogy a *PARP1* IHC expressziója korrelál a *p53* pozitív esetekkel, melyek feltehetően mutáns *TP53* gént hordoznak. Továbbá, a *PARP1* mRNS szintje magasabb volt a *TP53* mutációt hordozó mintákban. Fontos megjegyezni, a *TP53* nonszensz mutációk IHC általi detektálása nem pontos a részleges fehérjék miatt. A *TP53* mutált esetekben a *PARP1*

megnövekedett szintje mellett nem volt statisztikai különbség a misszensz és nonszensz mutációs minták között.

A PARP1 és a p53 kapcsolatát már korábban megállapították. Mindkét fehérje fontos szerepet játszik a genomi integritás fenntartásában. Több tanulmány is azt mutatja, hogy a genom instabilitás általában összefügg a rossz prognózissal. Korábban már leírták, hogy a magas PARP1 expresszió gyakran áll kapcsolatban a rövidebb túléléssel a daganatokban. Ennek ellenére megfigyelhető egy tendencia a rövidebb túlélési időt tekintve a magas PARP1 szinttel rendelkező betegekben, az alacsony PARP1-es esetekhez viszonyítva, szignifikáns különbséget nem tapasztaltunk. Érdekes módon, a magas *PARP1* szinttel rendelkező betegek túlélése szignifikánsan rövidebb, ha vad típusú a *TP53* génnel rendelkeznek. Ezt a megfigyelést magyarázhatja, hogy a *TP53* mutációk mellett, hibás p53 útvonal is elősegítheti a tumor progresszióját. A p53 jelátviteli út több celluláris folyamatot mediál, köztük a növekedés leállítását, angiogenezist, apoptózist és a DNS javítását.

A GBM progressziója és kiújulása a p53 útvonal abnormalitásaihoz köthető a primer GBM-ek 87%-ában. A p53 útvonal és a PARP1 közti interakciók vizsgálatakor azt találtuk, hogy a PARP1 összefüggést mutat a *CDKN2A* deléciókkal és az *MDM4* nyeréssel is, mely eltérések főként vad típusú *TP53* génnel rendelkező esetekben fordulnak elő, de a tumorsejtek abnormalis p53 szignalizációját eredményezik. Ezen túlmenően, a *PARP1* negatív korrelációt mutatott a *CDKN1A*-val, amely a p53 kaszkád egyik downstream tagja, magában foglalja a p53 által mediált G1 leállítását. Ez a megfigyelés azt sugallja, hogy az alulszabályozott *CDKN1A* képtelen gátolni a ciklin E-CDK2 komplexet magas PARP1 szint mellett GBM-ben. Következésképpen, fokozott sejtciklus aktivitás és az apoptózis elmaradása lesz az eredmény. Egy újabb lehetséges marker, az 53BP1 alacsony szintje megjósolhatja a PARP inhibitorokkal szembeni rezisztenciát, mert génjének a *TP53BP1*-nek a deléciója csökkenti a PARP gátlók citotoxicitását.

Számos tanulmány ellenére a *TP53* mutációk és a p53 sejtmagi akkumulálódása közötti kapcsolat máig nem tisztázott. Bár a rutin diagnosztikai feldolgozás során az immunhisztokémia egy gyakran használt technika a *TP53* mutációs analíziséhez, a megbízhatósága vitatható az álpozitív és negatív esetek miatt. Tanulmányunk célja az volt, hogy felmérjük a *TP53* szomatikus mutációinak immunhisztokémiai expressziós mintázatát különböző tumortípusokban és összefüggést találjunk a klinikopatológiai sajátosságaikkal. Ezért átfogó elemzést végeztünk az R17 adatszettről az IARC *TP53* adatbázisában. A nyilvánosan elérhető tumor profilozó és adat szekvenáló adatbázisok sokkal komplexebb kutatást tesznek lehetővé, beleértve a molekuláris epidemiológiát, a klinikai felméréseket és a

szerkezeti analízist. Az IARC TP53 Mutációs Adatbázisa (<http://p53.iarc.fr/>) több mint 28000, humán daganatokban előforduló szomatikus mutáció prevalenciájáról és mintázataról, tumor fenotípus annotációkról, páciensek jellemzéséről, szerkezeti és funkcionális behatásokról és a mutációk immunfestődéséről is tartalmaz adatokat. Az adatbázis magába foglalja az összes leírt *TP53* mutációt, melyek szekvenálással megerősítettek, szakmailag lektorált folyóiratokban voltak publikálva vagy mutációs adattárakban szerkesztették. Normál körülmények között a p53 szintézise és degradációja szigorúan szabályozott, expressziós szintje nagyon alacsony. Az aberráns p53 hosszabb féléletideje egy túltermelő fehérjét eredményez, amely immunhisztokémiaiilag detektálható. Tanulmányunk megerősíti, hogy a *TP53* mutációk több mint 75%-a egységesen mutat IHC által detektálható p53 felhalmozódást. Ez a teljes pozitivitás megfigyelhető volt minden tumor helyen. Ellentétben áll más tumor-szuppresszor génekkel, ahol többnyire deléciók és nonszensz mutációk következtében a fehérje expressziója csökkent vagy hiányzik.

A legtöbb *TP53* mutáció túlnyomóan a DNS kötő doménben (94-292 oldallánc) alakul ki, eredményeink alapján az IHC pozitív módosulatok több mint 94%-a is ebben a doménben található. Az ebben a doménben képződött *TP53* mutációk a legagresszívebb klinikai fenotípushoz vezethetnek, ami feltehetőleg csökkenti a fehérje biológiai aktivitását. A mutációk ezekben a kritikus motívumokban többnyire IHC pozitívak, tehát jól detektálhatók a diagnózis során. Magát a gén szerkezetét tekintve a mutációk többsége 5-8 exonokban következik be, a vizsgált mutációk több mint 95%-a is ezekben az exonokban jött létre, és IHC pozitivitást mutatnak. A *TP53* intronjaiban kialakuló pontmutációk megszüntethetik a p53 funkcióit. Megfigyeléseink megerősítik a korábbi közlemények eredményeit, mivel az IHC-val detektálható mutációk 87%-a egy bázispárt érintő szubsztitúciók voltak a kódoló régiókban. Ezek a misszensz mutációk általában teljes hosszúságú fehérjét eredményeznek és több mint 80%-uk volt IHC pozitív az IARC adatbázis szerint. A humán daganatokban ritkán előforduló duplikáció és komplex *TP53* mutációk szintén IHC pozitívnak bizonyultak. A *TP53* génben a splice mutációk szintén ritka eseményeknek számítanak. Ennek megfelelően, csak a mutációk 3%-a alakul ki a konzervált dinukleotidokban, köztük a splice helyeken, melyek eloszlása és IHC karakterisztikája változatos volt. A splice módosulatok az alternatív és a rejtett splice akceptor helyeken IHC pozitivitást mutatnak; ezzel szemben, a konszenzus splice helyeken negatívok voltak. Nem volt jelentős különbség a CpG szekvenciákon belüli vagy azokon kívül eső mutációk IHC expressziójában, mindkettő többnyire pozitív volt (83,3%, illetve 73,3%).

A szomatikus *TP53* mutációkat három csoportba rendeztük frekvenciájuk és IHC pozitivitásuk alapján. A 'hot-spot' mutációk (A csoport) és a gyakori nonszensz mutációk (B

csoport) különálló csoportot alkotnak, míg a ritka, erősen pozitív misszensz mutációk kerültek a *C csoportba*. A tanulmányunk során abból indultunk ki, hogy az immunhisztokémiai jelölődése a nonszensz *TP53* mutációk esetében (*B csoport*) a géntermék hiánya miatt nem lehetséges. A nonszensz mutációk az életkorral is összefüggést mutathatnak, az *NF2* és a *HNF1A* génekben leírt csonka génterméket eredményező mutációk például a fiatalabb korban megjelenő betegségekben gyakoriak. Az IHC negatív *TP53* mutációval rendelkező nők (a képződött csonka p53 következményeként) fiatalabbak voltak. A *TP53* mutációk osztályozása szerinti *B csoportban* korban korábban diagnosztizáltak a mell és húgyhólyag tumorokat, és érdekes módon a hematopoiitikus rendszer daganatait csak idősebb korban diagnosztizáltak az *A és C csoport*hoz képest. Az R213* és a Q192* gyakorisága szintén növekedett a melledaganatokban, csak úgy mint, az R306* és a Q192* mutációk a húgyhólyag daganat esetében. A *TP53* R213* mutációja sokkal gyakoribb a mellrák bazális altípusban. Vastagbélrákban az R196*, R213* és az R306* mutációk voltak elterjedtek. Továbbá az R213* mutáció gyakori volt a végbélben, valamint az R306 a végbél karcinómákban. Korábbi adatok alapján az R306 mutáció az allélek 15,27% és 39,5%-ában jelen volt primer tumorok, illetve metasztázisok esetében. A W146* mutáció kevésbé gyakori a bőr és száj rákokban, a vizsgálatunk szerint. Bár a nonszensz mutációk (*B csoport*) ritkák, összességében rosszabbak a túlélési esélyek, különösen, ha a p53 fehérje megrövidült. A *TP53* kiesése előreláthatólag a kiújuló tumorokkal jár együtt. Azontúl, nonszensz mutációt hordozó tumorok (*B csoport*) nagyobb valószínűséggel képeznek áttéteket, összehasonlítva azokkal a daganatokkal, melyek misszensz mutációt hordoznak (*A és C csoport*), vagy vad típusú p53-at. A nonszensz *TP53* betegekben fokozott kockázattal alakulhatnak ki vaszkuláris daganatok. A vártak megfelelően a módosulatok több, mint fele (56,5%) nem kódoló régiókban található és többnyire IHC negatívak. Bemutattuk, hogy az IHC negatív *TP53* mutációk leggyakrabban deléciók és inszerciók eredményeként alakulnak ki. Bizonyos szerek kiváltják a mutáció okozta korai stop kodon 'túlolvasását', ami ígéretes terápiás stratégiát jelenthet tumorszuppresszor gének nonszensz mutációkkal asszociált tumorokban. Aminoglikozid antibiotikumok, mint a gentamicin és a G418* elősegíthetik a korai terminációs kodon 'túlolvasását', amely egy részben helyreállított, teljes hosszúságú fehérjét eredményezhet. A Q192*, az R213* és az E298* *TP53* mutációk magas indukált 'túlolvasási' szintet mutatnak. Az aminoglikozid kezelés erősen és specifikusan stabilizálta a mutáns p53 mRNS-ét, amely egyébként degradálódott volna. Bár a korai stop kodon 'túlolvasásának' indukciója hatékony, toxicitásuk miatt ezen szerek klinikai felhasználása egyelőre korlátozott. Egyelőre nincs egyértelmű vélemény arról, hogy mely antitest a legmegfelelőbb a mutáns p53 kimutatására. A rutin diagnosztikában

leggyakrabban alkalmazott p53 antitestek (CM1, Pab1801, DO1 és DO7) például nem tesznek különbséget a mutáns és a vad típusú fehérjék között. A CM1 antitest a teljes hosszúságú fehérjét ismeri fel, addig a DO7, a DO1 és a Pab1801 csak a humán p53 N-terminusának epitópjait képesek felismerni (1-45, 11-25 és 32-79 aminosav oldalláncok). Fontos megemlíteni, hogy a DO7 antitest csak a 9-10 exonokban lévő megrövidült mutációkat tudja biztosan detektálni. A p53 IHC további limitációja, hogy abnormális p53 expressziót nem csak a *TP53* mutáció, hanem a zavart szenvedett p53 útvonal is eredményezhet. Az *MDM2* vagy az *MDM4* amplifikációja, vagy a p14^{ARF} promóterük metilációja is okozhat a csökkent p53 kifejeződést, ami korlátozza az IHC kimutatás érzékenységét, és álnegatív eredményt okozhat.

A p53 IHC megbízhatóságának növelése számtalan kutatás témáját adja. Antitestekkel kombinálva, különböző p53 epitópokat vagy p53-hoz kapcsolódó fehérjéket lehet megcélozni, valamint a kvantitatív kiértékelési metódus tűnik még értékelhető megközelítésnek a *TP53* mutációk predikciójához. Egy tanulmány során nyolc antitestből álló panelt állította össze, melyek a p53 stabilizálásával és transzkripció aktivációjával álltak kapcsolatban: anti-p53 (DO1; Bp53-10 és Pab1801; Ser15; Ser392), anti-Ki67 (MIB1), anti-MDM2 (2A9) and anti-p21 (118). Megállapították, hogy I) overexpresszált p53 MDM2 expresszió nélkül a p53 fehérjét stabilizáló inaktíváló mutációt jelez; II) p53 overexpresszált és emelkedett MDM2 expressziót mutató tumorokban általában nincs p53 mutáció; III) a foszforilált p53 expresszió összefügg a teljes p53 szinttel; IV) és nem alkalmas a *TP53* mutációs állapot meghatározására. Ennek ellenére sincsenek olyan tanulmányok, melyek megerősíthetnék ezeket a megállapításokat. A DO1 és DO7 antitestek koktélya azonosíthatja azon sejtvonalakat és azon prosztata adenokarcinómás betegminták 93%-át, melyek az 5-8 exon régiókban misszensz mutációt hordoznak. PLK-1 (Polo-like kináz-1) p21 és p53 kombinált IHC-ja némileg érzékenyebb a *TP53* státusz predikciójához és megkönnyítheti a misszensz és nonszensz mutációk elkülönítését. A p21 a p53 egy transzkripció célpontja, ezért az expresszióját a p53 IHC álpozitivitásának csökkentéséhez használják. A PLK1 IHC pozitivitása a p53 IHC negativitásával együtt utalhat nonszensz *TP53* mutációra és csökkentheti az álnegatív IHC lehetőségét, mert a mutáns p53 nem képes gátolni a PLK1 expresszióját. A *TP53* mutációs státusz meghatározásához egyértelműen a p53 immunhisztokémia és a kérdéses esetek DNS szekvenálásának kombinációja lenne a legpontosabb eljárás a *TP53* funkcionális állapotának megállapításához (a klinikai kutatásba is bevonva). A különböző p53-dependens fehérjéken kívül p53 immunhisztokémiai expressziójának intenzitása és a tumorsejtek jelölődésének a vizsgálata is növelheti a p53 IHC pontosságát. Egy újabb tanulmányban kombinálták a szekvenálást az IHC-val, hogy karakterizálják a *TP53* mutációkat és a p53 expressziót magas

grádusú súlyos petefészek rákban. Eredményeik alapján, a misszensz *TP53* mutációknak magas p53 expressziós szintjük volt, míg az alacsony kifejeződés nonszensz mutációkkal asszociált. Érdekesség, hogy a vad típusú *TP53* tumorok közepes p53 IHC expressziót mutatnak. Analízisünk egyik limitáló tényezője, hogy a p53 IHC általános és a tumorspecifikus szenzitivitását nem tudtuk megvizsgálni, mivel az IARC *TP53* adatbázis nem tartalmazza a tumorsejtek vad típusú p53 expressziós eredményeit. Következésképpen, álpozitív esetek analízise és kizárása nem lehetséges. Az IHC antitestek nincsenek felsorolva az adatbázisban, ezért specifitásuk és a szomatikus mutációkhoz való asszociációjuk nem vizsgálható. Ennek érdekében, vizsgálatainkat kiegészítettük a TCGA adatbázisban elérhető asztrocita eredetű agydaganatok *TP53* státusza és a *TP53* mRNA expresszió közötti vizsgálattal. Eredményeink igazolják mRNA szinten a korábban petefészek rákban tapasztalt összefüggéseket, ami alapján arra tudunk következtetni, hogy hasonló eljárás – a p53 IHC intenzitás alapú értékelése – eredményes lehet a gliális daganatokban is.

Összegzésképpen, a *TP53* mutációk többsége misszensz és IHC pozitív volt, míg a legtöbb nonszensz és kereteltolódásos mutáció és deléción IHC negatív. Szignifikáns összefüggést figyeltünk meg a diagnózis felállításában az életkor függvényében és a *TP53* mutációk immunhisztokémiai mintázatában mell, fej és nyak, húgyhólyag, máj és hematopoetikus daganatok esetén. Bizonyos tumortípusokban megnövekedett az álnegatív IHC valószínűsége, ami kapcsolatban áll a ritka nonszensz mutációkkal. A gyakoriságon, és immunpozitivitáson alapuló osztályozásunk hasznos a terápiában és prognosztikus implikációja is van.

6. Összefoglalás

A gliomák képviselik a leggyakoribb felnőttkori agydaganatot. A kezelések fejlesztését célzó törekvések ellenére a GBM még mindig nagyfokú rezisztenciát mutat a jelenleg alkalmazott terápiákkal szemben. A betegek kilátásának javítása érdekében új diagnosztikus megközelítés és effektív terápia kidolgozása szükségesek.

Jelenleg nem állnak rendelkezésre részletes adatok a gliomák magyarországi helyzetét tekintve. Figyelembe véve ezt a hiányosságot, munkánk kezdeti szakaszában az intézetünkben 2007 és 2011 között szövettanilag diagnosztizált gliális daganatokat tekintettük át. Vizsgáltuk során 341 gliális daganatot jellemeztünk és csoportosítottunk a gyakoriságuk, a betegek neme és életkora, valamint a daganatok anatómiai lokalizációja szerint.

Annak ellenére, hogy a korábbi tanulmányok szerint a PARP1 enzim gátlása ígéretes terápiás célpont gliomákban, olyan átfogó vizsgálat, amely a figyelembe veszi a GBM nagyfokú molekuláris heterogenitását a *PARP1* genomikai karakterizálása és prognosztikus szerepének meghatározásában ezidáig nem történt. Jelen dolgozat egyik célja tehát a *PARP1* kapcsolatának vizsgálata volt a betegek teljes túlélésével, az asztrocitómák WHO grádusaival, specifikus molekuláris markerekkel és a GBM transzkripciós alcsoportjaival. A bioinformatikai analízis során TCGA glioma genomi és klinikai adatait használtuk, illetve PARP1, ATRX, IDH^{R132H}, és p53 markerek immunhisztokémiai jelölését is elvégeztük. Eredményeink alapján a *PARP1* kópiaszám nyereség és emelkedett mRNA expresszió jellemezte a magas grádusú asztrocitómákat, valamint a *Proneurális* és *Klasszikus* GBM alcsoportokat is. Továbbá, magas *PARP1* expressziót mutató betegek rövidebb teljes túléléssel ($p < 0,006$) rendelkeztek a Klasszikus alcsoportban. A neuropatológiai diagnosztika során is alkalmazott molekuláris markereket tekintve az ATRX ($p = 0,006$), és a TP53 ($p = 0,015$) mutációk az emelkedett *PARP1* expresszióval mutattak összefüggést. Az IHC vizsgálat során pedig a PARP1 expresszióját ATRX hiányával (elmaradt expresszióval), valamint p53 overexpresszióval korrelált. Ezen túlmenően tumorok magasabb *PARP1* szintje a vad-típusú TP53 státusszal szintén prognosztikus értékkel bír, mégpedig rövidebb teljes túlélést jelez a betegek számára ($p = 0,039$). Következésképpen, a *PARP1* expresszió és a TP53 mutációs státusz megbízható marker a *Klasszikus* és a *Proneurális* GBM alcsoportok elkülönítésére, emellett prognosztikus és terápiás relevanciával is rendelkezik glioblasztómában.

A TP53 mutációk detektálása az ATRX mutációk mellett kulcsfontosságú a neuropatológiai diagnózis során. A p53 fehérje IHC kimutatását gyakran használják a mutációs státusz meghatározására, mivel a TP53 gén eltérései a p53 fehérje akkumulációját idézik elő

a tumorsejtekben. Annak ellenére, hogy ez a korreláció vitatott, a p53 overexpresszió immunhisztokémiai detektálása régóta helyettesíti a mutáció analízist a rutin szövettani diagnosztikában. Munkánk további célja a p53 akkumuláció és a *TP53* mutációk közötti kapcsolat tisztázása volt, mely során meghatároztuk az egyes *TP53* mutáció gyakoriságát IHC expressziós tulajdonságait. Az analízis során az IARC TP53 adatbázis (R17) szomatikus mutációs adatait használtuk. A *TP53* mutációkat a frekvenciájuk és IHC pozitivitásuk alapján három (A, B és C) csoportra osztottuk. Az egyes tumortípusokban szignifikáns eltéréseket figyeltünk meg a betegek életkorában a különböző csoportok között: mell-, hólyag- és májrákban, valamint a hemapoetikus rendszerben és a fej-nyaki daganatokban. Az álnegatív IHC-t eredményező mutációk egyes tumortípusokban szintén gyakrabban fordultak elő.

7. Új tudományos eredmények

- A fokozott *PARP1* kifejeződés szerepet játszhat a tumorok malignus transzformációjában, emelkedett mRNS expressziója a magas grádusú asztrocitómákban figyelhető meg. Továbbá a *PARP1* kópiaszám-változások gyakorisága növekszik a magasabb WHO grádussal.
- A *PARP1* a tumorheterogenitással is kapcsolatban áll. A emelkedett expressziója összefüggést mutat a tumorok *ATRX* és *TP53* mutációs státuszával. A *PARP1* immunhisztokémiai expressziója szintén korrelál a fenti markerek mutációs státuszát tükröző IHC pozitív p53, valamint az *ATRX* negatív esetekkel.
- A klinikailag releváns glioblasztóma molekuláris alosztályok közül a *Klasszikus* és a *Proneurális* csoportok emelkedett *PARP1* mRNS expressziót mutatnak. Továbbá a magasabb *PARP1* expresszióval rendelkező betegek szignifikánsan rövidebb teljes túlélésre számíthatnak a *Klasszikus* alcsoportban.
- A *PARP1* expresszió meghatározása diagnosztikus értékű glioblasztómában. A korábban meghatározott alosztályok genetikai profilja alapján, feltételezzük, hogy a *PARP1* és *TP53* mutációs státusz szerint a *Klasszikus* és a *Proneurális* alcsoportok elkülöníthetők a másik két molekuláris alcsoport közül.

- A vizsgált szomatikus *TP53* mutációk többsége (>80%) pozitív immunjelölődést mutat a gliális daganatokban. A *TP53* mutációk gyakoriságuk és immunhisztokémiai tulajdonságaikat tekintve három csoportra oszthatók, melyek néhány tumortípus esetében összefüggést mutatnak a betegek életkorával.
- A vizsgált daganatokat tekintve az immunhisztokémiai módszerrel nem detektálható nonszensz *TP53* mutációk kifejezetten ritkák a gliális agydaganatokban. Néhány daganatban (mell- és tüdőrák, hólyag és végbél daganatok) viszont az ilyen eltérések az átlagtól nagyobb eséllyel fordulhatnak elő.

Támogatások

A kutatás az Emberi Erőforrások Minisztériuma Új Nemzeti Kiválóság Programjának (ÚNKP-16-3), a Nemzeti Agykutatási Program (KTIA_13_NAP-A-II/7.; KTIA_13_NAP-A-V/3.) támogatásával valósult meg.



Nyilvántartási szám: DEENK/277/2017.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Murnyák Balázs
Neptun kód: G7W1AZ
Doktori Iskola: Idegtudományi Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Murnyák, B.**, Kouhsari, M. C., Hershkovitch, R., Kálmán, B., Marko-Varga, G., Klekner, Á., Hortobágyi, T.: PARP1 expression and its correlation with survival is tumour molecular subtype dependent in glioblastoma.
Oncotarget. 8 (28), 46348-46362, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.18013>
IF: 5.168 (2016)
2. **Murnyák, B.**, Hortobágyi, T.: Immunohistochemical correlates of TP53 somatic mutations in cancer.
Oncotarget. 7 (40), 64910-64920, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.11912>
IF: 5.168





További közlemények

3. Bencze, J., Simon, V., Bereczki, E., Majer, R., Varkoly, G., **Murnyák, B.**, Kálmán, J., Hortobágyi, T.: A Lewy-tesztos demencia klinikai és neuropatológiai jellemzői.
Orvosi Hetilap. 158 (17), 643-652, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/650.2017.30735>
IF: 0.349 (2016)
4. Hortobágyi, T., Bencze, J., **Murnyák, B.**, Kouhsari, M. C., Bognár, L., Marko-Varga, G.:
Pathophysiology of meningioma growth in pregnancy.
Open Med. 12, 195-200, 2017.
IF: 0.294 (2016)
5. Hortobágyi, T., Szabó, R., **Murnyák, B.**: The Theragnostic Relevance of DNA Methylation Analysis in Cancer.
Clin. Oncol. 2 (1289), 1-2, 2017.
6. Csonka, T., **Murnyák, B.**, Szepesi, R., Bencze, J., Bognár, L., Klekner, Á., Hortobágyi, T.:
Assessment of candidate immunohistochemical prognostic markers of meningioma recurrence.
Folia Neuropathol. 54 (2), 114-126, 2016.
IF: 1.093
7. Szepesi, R., Csokonay, Á., **Murnyák, B.**, Kouhsari, M. C., Hofgárt, G., Csiba, L., Hortobágyi, T.:
Haemorrhagic transformation in ischaemic stroke is more frequent than clinically suspected: a neuropathological study.
J. Neurol. Sci. 368, 4-10, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jns.2016.06.055>
IF: 2.295
8. **Murnyák, B.**, Szepesi, R., Hortobágyi, T.: A központi idegrendszer érintő családi daganatszindrómák molekuláris háttere.
Orvosi Hetilap. 156 (5), 171-177, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/OH.2015.30092>
IF: 0.291
9. **Murnyák, B.**, Csonka, T., Hortobágyi, T.: A meningeomák molekuláris patológiája.
Ideggyogy. Szle. 68 (9-10), 292-300, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.18071/isz.68.0292>
IF: 0.376





10. **Murnyák, B.**, Bognár, L., Klekner, Á., Hortobágyi, T.: Epigenetics of Meningiomas.
Biomed Res. Int. 2015, 1-6, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/532451>
IF: 2.134
11. **Murnyák, B.**, Bodoki, L., Nagy-Vincze, M., Griger, Z., Csonka, T., Szepesi, R., Kurucz, A., Dankó, K., Hortobágyi, T.: Inclusion body myositis: pathomechanism and lessons from genetics.
Open Med. 10, 188-193, 2015.
12. Bodoki, L., Nagy-Vincze, M., Griger, Z., Csonka, T., **Murnyák, B.**, Kurucz, A., Dankó, K., Hortobágyi, T.: Inclusion body myositis - a case based clinicopathological update.
Cent. Eur. J. Med. 9 (1), 80-85, 2014.
IF: 0.153
13. Csonka, T., **Murnyák, B.**, Szepesi, R., Kurucz, A., Klekner, Á., Hortobágyi, T.: Poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP1) and p53 labelling index correlates with tumour grade in meningiomas.
Folia Neuropathol. 52 (2), 111-120, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.5114/fn.2014.43782>
IF: 1.568
14. **Murnyák, B.**, Csonka, T., Klekner, Á., Hortobágyi, T.: Alacsony grádusú gliális daganatok előfordulása és molekuláris patológiája.
Idégyogy. Szle. 66 (9-10), 305-311, 2013.
IF: 0.343
15. **Murnyák, B.**, Csonka, T., Hegyi, K., Méhes, G., Klekner, Á., Hortobágyi, T.: Magas grádusú gliomák előfordulása és molekuláris patológiája.
Idégyogy. Szle. 66 (9-10), 312-321, 2013.
IF: 0.343

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 19,575

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 10,336

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudománytermetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2017.09.07.