# EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

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

Murnyák Balázs

## Témavezető: Dr. Hortobágyi Tibor



Debreceni Egyetem Idegtudományi Doktori Iskola Debrecen, 2017

## Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke	4
2. Bevezetés és irodalmi áttekintés	6
2.1 A diffúz gliomák jellemzői	6
2.1.1 Asztrocitóma	7
2.1.2 Oligodendroglioma	. 10
2.1.3 Oligoasztrocitóma	. 10
2.1.4 Glioblasztóma (GBM)	. 11
2.1.5 A glioblasztóma (GBM) molekuláris patológiája	. 13
2.1.6 A glioblasztóma (GBM) molekuláris alosztályai	. 14
2.1.7 Az IDH1, ATRX és p53 markerek a rutin neuropatológiai diagnosztikában	. 15
2.2 A TP53 gén és mutációi	. 17
2.3 DNS hibajavítás, mint terápiás lehetőség glioblasztómában	. 19
2.3.1 A poli(ADP-ribóz)polimeráz 1 (PARP1)	. 20
3. Célkitűzések	. 24
4. Anyagok és módszerek	. 25
4.1 PARP1 genomikai analízise GBM-ben	. 25
4.1.1 The Cancer Genome Atlas (TCGA) adathalmazok	. 25
4.2 A vizsgálatok beteganyagai	. 27
4.2.1 A diffúz gliomák gyakorisága a DE KK Patológiai Intézetében	. 27
4.2.2 A PARP1 IHC korreláció beteganyaga	. 27
4.3 Immunhisztokémiai vizsgálatok	. 28
4.4 TP53 mutációk IHC mintázatának vizsgálata	. 29
4.4.1 A szomatikus TP53 mutációk immunhisztokémiai tulajdonságai	. 29
4.4.2 TP53 mutációk klinikopatológiai jellemzése	. 30
4.4.3 A TP53 mutációk csoportosítása a gyakoriságuk és az IHC mintázatuk alapján	. 30
4.5 Statisztikai és bioinformatikai analízis	. 30
5. Eredmények	. 32
5.1 A Debreceni Egyetem Patológiai Intézetében szövettanilag diagnosztizált diffúz gliomák jellemzése	. 32

5.2 A PARP1 genomikai jellemzői glioblasztómában
5.2.1 PARP1 expresszió az asztrocitómák malignus transzformációja során
5.2.2 A PARP1 expresszió és a glioma markerek mutációs státusza közötti kapcsolat 37
5.2.3 A PARP1 immunhisztokémiai expressziója és az IDH1, ATRX és a p53 markerek
közötti összefüggések
5.2.4 PARP1 mRNS expresszió a GBM molekuláris alosztályaiban
5.2.5 A magas PARP1 expresszió prognosztikus értéke a GBM alcsoportokban
5.2.6 PARP1 expresszió és a p53 útvonal kapcsolata glioblasztómában
5.3 A mutáns p53 IHC expressziója az IARC adatbázis alapján47
5.3.1 Az individuális TP53 mutációk IHC expressziós jellemzői
5.3.2 A TP53 IHC csoportok klinikopatológiai jellemzői
5.4 A szomatikus TP53 mutációk IHC jellemzői gliomákban54
6. Diszkusszió
6.1 A gliomák előfordulása a Debreceni Egyetem Pathologiai Intézetében
6.2 A PARP1 bioinformatikai és immunhisztokémiai vizsgálata gliomákban60
6.3 TP53 mutációk IHC karakterizálás agydaganatokban és más tumortípusokban
7. Összefoglalás
8. Summary
9. Új tudományos eredmények71
10. Tárgyszavak
11. Irodalomjegyzék73
12. Köszönetnyilvánítás
13. Támogatások
14. Publikációs lista
15. Az értekezés témájában elhangzott előadások és poszterek

## 1. Rövidítések jegyzéke

- ATRX Alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked gén
- **BRCA1/2** Breast Cancer 1/2 gén
- *CDK4* Ciklin dependens kináz 4
- *CDKN1A* Ciklin dependens kináz inhibitor 1A (a p21 fehérjét kódoló gén)
- *CDKN2A* Ciklin dependens kináz inhibitor 2A (a  $p14^{ARF}$  és a  $p16^{INK4a}$  fehérjéket kódoló gén)
- CIC Homolog of Drosophila capicua
- **CIMP** CpG sziget metilátor fenotípus, CpG island methylator phenotype
- CNAs Kópiaszám-változások, Copy number alterations
- DE KK Debreceni Egyetem, Klinikai Központ
- *EGFR* Epidermalis növekedési faktor receptorgén
- FFPE Formalin-fixált, paraffinba ágyazott, Formalin-fixed, paraffin- embedded
- FISH Fluoreszcens *in situ* hibridizáció
- FUBP1 Far-Upstream Binding Protein gén
- **GBM** Glioblasztóma
- GISTIC Genomic Identification of Significant Targets in Cancer
- HGVS Human Genome Variation Society
- HMG High-Mobility Group
- *HNF1A* Hepatocyte nuclear factor 1-alpha gén
- IARC Nemzetközi Rákkutató Intézet, International Agency for Research on Cancer
- *IDH1* Izocitrát-dehidrogenáz 1 gén
- IHC Immunhisztokémia, Immunohistochemistry
- **KPS** Karnofsky-érték, Karnofsky Performance Scale

LOH	<ul> <li>Heterozigótaság elvesztése, Loss of Heterozygosity</li> </ul>
<i>MDM2/4</i>	– Mouse Double Minute 2 és 4
MGMT	– O6-metilguanin-DNS-metiltranszferáz gén
MLH1	– MutL homolog 1 gén
MSH2	– MutS protein homolog 2
NDBL	– nem DNS-kötő hurok, non-DNA-binding loop
NES	– Sejtmagi export szekvencia, Nuclear export Sequence
NF2	– Neurofibromatosis type II gén
NLS	- Sejtmagi lokalizációs szekvencia, Nuclear Localization Sequence
NOS	– Külön megnevezés nélkül (k.m.n.), Not Otherwise Specified
0GG1	– 8-Oxoguanin- DNS glikoziláz; 8-Oxoguanine DNA Glycosylase
PARP1	– Poli(ADP-ribóz) polimeráz 1 gén
PCR	– Polimeráz-láncreakció, Polymerase Chain Reaction
PDGF	- Vérlemezke eredetû növekedési faktor receptor, Platelet Derived Growth Factor
PTEN	- Foszfatáz- és tenzinhomológ gén, Phosphatase and tensin homolog
RB1	– Retinoblastoma tumor-suppressor gén
RTK	– Receptor Tirozin Kináz
SH3	– Sarc homológia 3 domén
TCGA	– The Cancer Genome Atlas
TMZ	– Temozolomide
<i>TP53</i>	– Tumor Suppressor P53 (a p53 fehérjét kódoló gén)
TP53BP1	– TP53-binding protein 1 gén
WHO	- Egészségügyi Világszervezet, World Health Organization

## 2. Bevezetés és irodalmi áttekintés

## 2.1 A diffúz gliomák jellemzői

A központi idegrendszer leggyakoribb primer daganatait a neuroepiteális szövet neopláziái közé tartozó gliomák képviselik [1]. A gliomák az agyat beszűrő infiltratív daganatok, melyek az agy támasztó szöveti sejtjeiből, az asztrocitákból vagy a fehérállományban a rostokat körülvevő myelinhüvelyt képző oligodendroglia sejtekből indulnak ki [2].

A daganatok klinikailag, szövettanilag és molekulárisan is különböző tumortípusokat foglalnak magukba. A hisztológiai grádus meghatározásakor az Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization, WHO) kritériumai szerint a mitózisok számát, nukleáris atípiát, mikrovaszkuláris proliferációt és a nekrózisok jelenlétét is fontos figyelembe venni [3, 4] (*1. táblázat*). Alapvetően 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 [5]. 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 [6, 7].

tumorok között elkülöníthetünk alacsony (II. grádusú asztrocitóma, А oligodendroglioma és oligoasztrocitóma) és magas grádusú (III. grádusú anaplasztikus asztrocitóma, oligodendroglioma és oligoasztrocitóma; IV. grádusú glioblasztóma) daganatokat (1. táblázat). A fiatalabb (35-44 év) életkorban jelentkező II. grádusú tumorok teszik ki az összes glioma közel 25%-át [8, 9]. Leggyakoribb formája a diffúz asztrocitóma, míg az oligodendroglioma és oligoasztrocitóma ritkábban, közel hasonló gyakorisággal fordul elő [10]. A WHO III. grádusú anaplasztikus gliomák a magas grádusú tumorok 10-15%-át alkotják [11]. Ezek a daganatok rossz prognózissal rendelkeznek, a medián túlélés a szövettantól függően 2-5 év között van [12, 13]. A WHO IV. grádusába az asztrocita eredetű glioblasztóma tartozik, mely forma ismertetésével részletesen a 2.1.4 fejezetben foglalkozunk.

Glioma altípus		WHO grádus	Inci- dencia*	Átlag- életkor (év)	5 éves túlélés (%)	Főbb jellemzők
Diffúz asztrocitóma	IDH vad típusú és IDH-mutáns	II.	0,11	35-44	47,6	hipercellularitás, mitózisok hiánya
Anaplasztikus asztrocitóma	IDH vad típusú és IDH mutáns	III.	0,41	45	27	fokozott mitotikus aktivitás, nekrózis és vaszkuláris proliferáció hiánya
Oligodendro- glioma	IDH mutáns és 1p19q kodeletált	II.	0,28	40-45	79,3	alacsony mitotikus aktivitás
Anaplasztikus oligodendro- glioma	IDH mutáns és 1p19q kodeletált	III.	0,12	45-50	48,4	fokozott mitotikus aktivitás, nekrózis és vaszkuláris proliferáció
Oligoasztro- citóma	-	II.	0,2	35-44	58,4	kevert gliális összetevők
Glioblasztóma	IDH vad típusú és IDH mutáns	IV.	3,2	60 vs. 40	4,7	magas mitotikus ráta, nekrózis, mikro- vaszkuláris proliferáció

1. táblázat: A felnőttkori asztrocita és oligodendrogliális tumorok WHO szerinti klasszifikációja [4].

\*1000 fő/év

#### 2.1.1 Asztrocitóma

A jelenlegi WHO klasszifikáció alapján a II. és III. grádusú asztrocitómákat az *IDH1/2* (izocitrát-dehidrogenáz gén 1 és 2) mutációs státusz alapján IDH mutáns, IDH vad típusú és külön megnevezés nélküli (k.m.n.), angolul *"not otherwise specified"* (NOS) kategóriákra oszthatjuk [4]. A WHO II. grádusú diffúz asztrocitóma az asztrocita eredetű daganatok közel 10-15%-át alkotja, rendszerint fiatalabb felnőtteknél (30-40 év) fordul elő. Magas fokú celluláris differenciációval és lassú növekedéssel jellemezhető [4], három szövettani altípusra különíthető el: fibrilláris, gemisztocitás és protoplazmatikus asztrocitóma. Lokalizációját tekintve leggyakrabban a homlok- és halántéklebenyben fejlődhet ki, de halántéklebenyben és az agytörzsben is előfordulhat [10]. Az alacsony grádusú – nem pilocitás asztrocitóma – képes magasabb grádusú gliomává vagy szekunder (IDH mutáns) glioblasztómává transzformálódni [14] (*1. ábra*).



1. ábra: A diffúz gliomák patogenezise. Az gliális daganatok progenitor sejtjeiben jellemzően először IDH1/2 mutációk jönnek létre, majd attól függően, hogy a TP53 és ATRX génekben alakulnak ki eltérések asztrocitómáról, ha pedig 1p19q kodeléció keletkezik oligodendrogliómáról beszélhetünk. A gliomák malignus transzformációja során felhalmozódó mutációk előmozdítják az alacsonyabb grádusú asztrocitómák glioblasztómává alakulását. A *de novo* (IDH vad típusú) glioblasztóma klinikai előzmény nélkül alakul ki, patogenezisükben a receptor tirozin kináz, p53 és a retinoblasztóma útvonal defektusa áll. Az MGMT gén promóterének metilációja grádustól és altípustól függetlenül valamennyi gliális daganatban előfordulhat.

A II. grádusú asztrocitómákban az *IDH1/2*, *TP53* és *ATRX* (alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked gén) mutációk a legjellemzőbb genetikai tényezők [15], emellett az *MGMT* gén (O<sup>6</sup>-metilguanin DNS-metiltranszferáz) promóter metilációja az esetek felében kimutatható [16]. A gliális daganatok genetikai eltéréseinek a rutin (neuro)patológiai diagnosztikában alkalmazott detektálási lehetőségeivel a *2.1.7 fejezetben* foglalkozunk részletesebben. A PDGF (vérlemezke eredetű növekedési faktor receptor) receptornak és ligandjának a PDGF $\alpha$ -nak az overexpressziója is előfordulhat. A hetes kromoszóma triszómiája, vagy rövid karjának amplifikációja az esetek felében detektálható [17]. Az *IDH1/2*, *ATRX* és a *TP53* mutációk mellett [3, 18, 19], az anaplasztikus daganatok közel egynegyede hordozhat *RB1* (retinoblasztóma 1) mutációkat is [17]. Progresszióhoz köthető eltérés a *CDKN2A* (ciklindependens kináz inhibitor 2A) tumorszuppresszor gén deléciója és metilációja. Előbbi a p53 útvonalban, utóbbi pedig a retinoblasztóma útvonalban érdekelt (*2. ábra*). Az

anaplasztikus asztrocitómában a p14<sup>ARF</sup> inaktivációja vad típusú *TP53* gént hordozó tumorsejtekben előfordulhat, és ilyenkor a p53 útvonal defektusával megegyező hatást eredményez. A III. grádusú asztrocitóma 10%-ában figyelhető meg sejtciklus szabályozásában érintett a *CDK4* gén amplifikációja. A *PTEN* (foszfatáz- és tenzinhomológ) gén (10q23.3) mutációi ritkák, jelenlétük rosszabb prognózist jelez. Citogenetikai sajátosságokat tekintve a hatos kromoszóma elvesztése, valamint a 9p, 10q, 11p, 19q és a 22q deléciók is előfordulhatnak [17].



2. *ábra:* A p53 útvonal. A celluláris stressz vagy DNS károsodást követően p53 protein aktiválódik, és a p21 génjének (*CDKN1B*) expresszióját eredményezi. A p14<sup>ARF</sup> az MDM2-höz kötődve gátolja az MDM2 közvetített p53 degradációt. A retinoblasztóma fehérje (pRb) szabályozza a sejtciklus G1-S fázis továbbhaladását. Az E2F transzkripciós faktorral komplexet alkotó pRb-t a CDK4-ciklin D komplex foszforilálja, aminek következtében az E2F szabaddá válik és a G1-S fázis tranzícióhoz szükséges gének átíródását regulálja. A CDK4-ciklin D komplex kialakulását a p16<sup>INK4a</sup> mellett a p15<sup>INK4b</sup> is gátolja, felfüggesztve a G1-S fázis tranzíciót [21, 28].

#### 2.1.2 Oligodendroglioma

A gliális daganatok a második leggyakoribb formáját az oligodendrogliális eredetű tumorok alkotják [22]. Az asztrocitómához hasonlóan az oligodendroglioma is diffúzan infiltrálhat az agy parenchimájába, viszont ezek a daganatok jobb prognózissal bírnak [16]. Lokalizációjukat tekintve a tumorok több, mint fele a homloklebenyben helyezkedik el, de kialakulhatnak a halántéklebenyben is [22]. Amíg a II. grádusú diffúz asztrocitómák malignusabb szövettani típussá is transzformálódhatnak, addig az oligodendroglioma a magas grádusú gliomák 10%-át alkotja [11]. Általában fiatalabb életkorban, 45 és 50 év között manifesztálódnak [23].

Az oligodendroglioma jellemző genetikai eltérése a 1p19q kodeléció. Ez a kiegyensúlyozatlan transzlokáció [t(1;19)(q10;p10)] az 1-es kromoszóma rövid (p) és a 19-es kromoszóma hosszú (q) karjának heterozigóta elvesztését jelenti [24, 25]. *Bettegowda és munkatársai* (2011) két tumorszuppresszor gén inaktiváló mutációját azonosították az oligodendrogliómákban: a *CIC* (homolog of *Drosophila capicua*) és a *FUBP1* (far-upstream binding protein). Mivel a *CIC* gén a 19q, a *FUBP1* gén pedig az 1p karon található, feltételezhetően az 1p19q elvesztés állhat az inaktiváló mechanizmus hátterében [26]. A CIC fehérje a receptor tirozin kináz útvonal egyik downstream transzkripciós represszora. A leggyakrabban az 5-ös exonban található ún. high-mobility group (HMG) domén érintett, ami a CIC fehérje DNS-hez való kötődéséért felelős [26, 27]. *IDH1* mutáció a daganatok 86%-ában megtalálható, viszont a *TP53*, valamint az *ATRX* mutációk ritkák [3], az *MGMT* gén metilációja szintén előfordulhat [17]. A *CDKN2A* homozigóta deléciója, vagy promóter metilációja az anaplasztikus oligodendrogliomák több, mint egyharmadában figyelhető meg [28]. A *PDGFRA*, *MDM4*, *MYC* és *MYCN* gének amplifikációja kevésbé gyakori [11, 17].

## 2.1.3 Oligoasztrocitóma

A gliális agydaganatok közül az oligoasztrocitóma hisztológiai elkülönítése okozza a legnagyobb nehézséget a neuropatológiai diagnózis során. A 2016-ban megjelent WHO klasszifikáció alapján az oligoasztrocitóma megnevezés kerülendő. Azok a tumorok, melyek szövettani képe asztrocita és oligodendroglioma komponenseket is mutat, a genetikai vizsgálatok alapján általában egyértelműen asztrocitómának, vagy oligodendrogliómának

diagnosztizálható. Ebből kifolyólag a II. és a III. grádusú oligoasztrocitóma diagnózis "külön megnevezés nélkül" kiegészítéssel csak abban az esetben alkalmazható, ha a pontos diagnózis felállításához szükséges molekuláris tesztek nem állnak a rendelkezésre [4].

Az oligoasztrocitómák szövettanilag kevert gliális neopláziák, oligodendroglia és asztrocita jellemzőkkel [19]. Az daganatok általában a 35. és 45. év között alakulhatnak ki [4], ritkán fiatalabb életkorban is előfordulhatnak [29]. A tumorokat két eltérő sejttípus alkotja, melyek szövettani megjelenésük alapján az oligodendrogliomákra és a diffúz asztrocitómákra is hasonlítanak [12]. A többi alacsony grádusú gliomához hasonlóan az oligoasztrocitómák is általában a homlok- és a halántéklebenyben alakulnak ki [5, 29].

Genetikai jellemzőik alapján heterogén csoportot alkotnak a gliomák között [3]. A daganatokban az *IDH1/2* mutációk kombinálódhatnak *TP53* és *ATRX* mutációkkal vagy az 1p19q kodelécióval. Az 1p19q kodeléció és a *TP53/ATRX* mutációk egymást kizáró események [30]. Az anaplasztikus oligoasztrocitómában előfordulhat még a *CDKN2A* metilációja vagy deléciója is, emellett a *CDKN2C* mutációja vagy deléciója és *PTEN* gén mutációja is megfigyelhető. Az *EGFR* (epidermalis növekedési faktor receptor) és a *PDGFR* amplifikációk viszont kevésbé jellemzők [17].

### 2.1.4 Glioblasztóma (GBM)

A WHO IV. grádusú glioblasztóma a magas grádusú gliomák közel 60-70%-át alkotja [11]. A GBM bármely életkorban manifesztálódhat, de leginkább a 45 és 65 éves korosztály között gyakori [4, 31]. A betegek várható élettartama kizárólagos sebészi rezekcióval 3-5 hónap, míg a radioterápiával kiegészített műtét 8-11 hónapos medián túlélést biztosít [32]. Továbbá a metilált *MGMT* gént hordozó glioblasztómában a temozolomid (TMZ) alkiláló szer alkalmazása növelheti a betegek túlélését. Ritkán előfordulhat három évnél hosszabb túlélés. Ilyen esetekben a jobb prognózissal feltehetően bizonyos klinikai, szövettani paraméterek lehetnek kapcsolatban, melyek közül a fiatal életkor, magas Karnofsky-érték (Karnofsky Performance Scale, KPS), totális reszekció, adjuváns terápia, óriás-sejtes altípus vagy az oligodendrogliális differenciáció emelhető ki [33].

A GBM klinikai és genetikai karakterétől függően két – szövettanilag egymástól elkülöníthetetlen – altípusáról beszélhetünk [16]. 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 [4].

A daganatok több, mint 90%-át a klinikai előzmény nélkül, *de novo* kialakuló IDH vad típusú GBM alkotja, melyet általában 55 évnél idősebb betegeknél diagnosztizálnak. Az altípus átfed a korábban primer GBM-nek nevezett daganatokkal. Az IDH mutáns glioblasztómában érintett betegek átlagéletkora 45 év, és a korábban szekunder GBM daganattal mutat hasonlóságot. Ez az altípus az alacsonyabb grádusú asztrocita eredetű gliális daganatok – II. grádusú diffúz asztrocitóma; III. grádusú anaplasztikus asztrocitóma - progressziójának utolsó stádiumát jelenti (*1. ábra*) [34, 35]. Irodalmi adatok szerint a II. grádusú asztrocitómák progressziója átlagosan 5,3 év, míg az anaplasztikus asztrocitóma esetében a malignus transzformáció 1,4 év alatt zajlik le [28]. A GBM neuropatológiai diagnózisa során – amennyiben nem állnak rendelkezésre adatok a tumor *IDH1/2* státuszáról – egy harmadik úgynevezett glioblasztóma (k.m.n.) kategória is elkülöníthető [4].

A különböző molekuláris útvonalon kialakuló IDH vad típusú és IDH mutáns GBM genetikailag két különböző entitást alkot [36], melyek hasonló szövettani jellemzőkön osztoznak és egyaránt rossz prognózist mutatnak. A közös vonásukat magyarázza, hogy az egyes altípusokra jellemző mutációk más-más génekben alakulnak ki, de azonos downstream útvonalakat érintenek, így hasonló funkcionális károsodásokat is okoznak a sejtekben [17].

A GBM ezen két formája genetikai profilja révén a hasonló morfológia ellenére mára egymástól elkülöníthetővé vált [37]. A gliomagenezis korai stádiumában bekövetkező genetikai események alapján a daganatok azonos kiindulási sejteken osztozhatnak (*1. ábra*) [39]. Egy, a primer és a kiújult gliomák genetikai hátterét érintő vizsgálat szerint az *IDH1/2* mutációk az egyik legkorábbi genetikai eseményeknek tekinthetők az asztrocita és az oligodendroglia eredetű tumorokban [40]. Ezidáig nem sikerült azonosítani olyan *IDH1/2* eltéréseket, melyek időben a már meglévő *TP53* mutáció vagy az 1p19q LOH után következtek volna be [16].

A neuropatológiai diagnózis során a p53, ATRX és az IDH1<sup>R132H</sup> mutáció-specifikus immunhisztokémiai detektálása megkönnyítheti a két GBM forma elkülönítését [27, 38]. A molekuláris patológiai jellemzőket figyelembe véve az *IDH1/2* mutációk a II. és III. grádusú asztrocitómák és az IDH mutáns (szekunder) GBM megbízható diagnosztikus markere, továbbá kedvezőbb kimenetelt jelez a betegek számára [13].

### 2.1.5 A glioblasztóma (GBM) molekuláris patológiája

A daganatképződés és progresszió hátterében összetett molekuláris defektusok állnak. Ilyenek lehetnek a génmutációk felhalmozódása, a jelátviteli útvonalak zavara, a növekedési faktorok abnormális expressziója és az epigenetikai szabályozás megváltozása is [41-43]. A keletkező, illetve akkumulálódó genetikai alterációk eredményeként a glioblasztómát nagyfokú morfológiai, celluláris és molekuláris heterogenitás jellemzi, amely megnehezíti a daganat diagnózisát, besorolását és a hatásos terápia megválasztását [41, 44, 45].

A TCGA (The Cancer Genome Atlas) projekt által végzett átfogó tanulmány 601, a daganattal kapcsolatos kandidáns gént szekvenált meg több mint 200 humán – főleg primer - GBM mintákban. A kutatás során DNS kópiaszám változásokat, metilációs státuszt és mRNS expressziót is vizsgált. A tanulmány több DNS szintű eltérés azonosítása mellett három jelentős molekuláris útvonal érintettségét igazolta a glioblasztómákban, melyek az alábbiak: a receptor tirozin kináz (RTK), a p53 és a retinoblasztóma (Rb) útvonal [46].

Az RTK útvonalban az *EGFR* gén amplifikációja a domináló eltérés, mely a primer glioblasztómák több mint 45%-ában mutatható ki [38]. Továbbá a receptor mutáns változata (EGFRVIII) ligand kötődése nélkül is folyamatosan aktivált állapotban van [37]. A mutáció az *EGFR* gén 2-7 exonjainak elvesztését eredményezi, aminek következtében a receptornak hiányzik az extracelluláris domén 6-273. aminosavat érintő része [17]. A *PTEN* gén mutációja 15-40%-ban fordulhat elő, viszont a *PIK3CA* mutációja ritka [15].

A p53 útvonal defektusát a *TP53* mutációk, a *MDM2*, *MDM4* (mouse double minute 2 és 4) gének amplifikációja, valamint a *CDKN2A* génről átíródó p14<sup>ARF</sup> eltérései okozhatják. A p53 útvonal hibás funkciója az IDH vad típusú glioblasztómák felében, míg az IDH mutáns glioblasztómák több, mint 70%-ában figyelhetők meg [28]. A *TP53* gén eltérései a daganatok közel 28%-ára jellemzőek, viszont az *MDM2* 14%-ban, az *MDM4* 7%-ban amplifikálódhat, de ilyenkor a *TP53* génben nincsenek mutációk [46]. A *CDKN2A* homozigóta deléciója vagy promóter metilációja miatt a primer glioblasztómák csaknem feléből hiányzik a p14<sup>ARF</sup> expresszió [28]. Az IDH mutáns GBM-re jellemző még az *RB1* promóterének hipermetilációja és a *PDGFRA* overexpresszió is. Az *EGFR* amplifikáció és az *MDM2* overexpresszió, valamint a *PTEN* mutációk főként a primer GBM-ben gyakoriak [17]. A glioblasztómák több, mint 70%-ában megfigyelhető továbbá az *MGMT* epigenetikai csendesítése promóterének metilációja által [3].

#### 2.1.6 A glioblasztóma (GBM) molekuláris alosztályai

A tumor-asszociált vizsgálatok nagy része jelenleg a patogenezisben és a malignus transzformációban érintett molekuláris útvonalakra, pontosabban a hibás szignalizációban közrejátszó mutáns génekre fókuszál [47]. A fejlődés főleg a nagy áteresztőképességű (high-throughput) módszerek és a bioinformatikai eszközök rohamos fejlődésének tudható be. A generálódó adathalmazok eredményeképpen körvonalazódik a daganatok pontos molekuláris háttere.

Annak ellenére, hogy a legtöbb GBM ugyanazon szövettani jellegzetességeken osztozik, molekulárisan mégis egyediek, ami különbségeket eredményez a prognózisban, illetve a terápiára adott válaszban is [34, 44, 48]. Az elmúlt évtizedben számos nagy léptékű genomikai profilt feltérképező tanulmányt végeztek a GBM természetének feltárása érdekében [46]. A glioblasztómának több molekuláris altípusa került meghatározásra, ami a szintén kiemeli a tumorok szövettani, illetve molekuláris sokféleségét. A GBM teljes genomját lefedő mRNS expressziós vizsgálatok és kópiaszám eltérések alapján való csoportosítása olyan alosztályokat azonosíthat, melyeket a hagyományos morfológiai vizsgálatok nem tesznek lehetővé. Az esetszámtól és az alkalmazott módszertől függően a GBM eltérő számú alcsoportjairól számoltak be [20, 49].

Verhaak és munkatársai (2010) a primer GBM négy klinikailag releváns molekuláris alosztályát határozták meg a citogenetikai jellemzőik, kópiaszám-eltéréseik, pontmutációs státuszuk és génexpressziós profiljuk alapján: Klasszikus, Mesenchimális, Proneurális és Neurális [19, 30, 50, 51, 52] (**2. táblázat**). A Klasszikus csoportot EGFR amplifikáció, CDKN2A és PTEN deléciók, míg a Mesenchimális csoportot az NF1, TP53 és a CDKN2A deléció/metiláció jellemzi. A Proneurális csoportban a PDGFRA, CDK4, CDK6 és MET amplifikáció mellett, az IDH1/2, a PI3K és a TP53 gének mutációja is előfordulhat. Az IDH mutáns glioblasztómák többsége általában a Proneurális alcsoportba tartozik [19, 51, 52]. Fontos megemlíteni, hogy az IDH1/2 mutációt hordozó glioblasztómák egyedi metilációs státusszal CIMP (CpG sziget metilátor fenotípus) rendelkeznek. Érdekesség, hogy a CIMP pozitív tumorok szintén a Proneurális altípusba sorolhatók, de nem Proneurális GBM rendelkezik CIMP státusszal. A negyedik, Neurális alosztály egyfajta átmenetet képez a Proneurális és a Mesenchimális csoportok között. Tagjai a neurális differenciációhoz kapcsolható proteinek expresszióját mutatják. Genetikai jellemzői eltérnek az többi alcsoporttól, ennek ellenére egyedi genotípussal nem jellemezhető. A molekuláris csoportosítás prognosztikus értékkel is bírhat, a *Proneurális* alcsoportnál jobb, a *Mesenchimálisnál* általában rosszabb kimenetelre kell számítani [19, 51, 52].

GBM molekuláris alosztályok	Jellemzők
Klasszikus	A 7-es kromoszóma amplifikációja és a 10-es kromoszóma deléciója jellemzi. Gyakori <i>EGFR</i> amplifikáció, valamint <i>CDKN2A</i> és <i>PTEN</i> deléció is előfordulhat. <i>TP53</i> , <i>IDH1</i> , <i>NF1</i> és <i>PDGFRA</i> eltérések nem jellemzők az alcsoportra.
Neurális	Neurális proteinek expressziója figyelhető meg, de nincsenek jellemző genetikai eltérések.
Proneurális	Az alcsoport a fiatalabb életkorú betegekre jellemző. <i>IDH1</i> és <i>TP53</i> és <i>PI3K</i> mutációk, valamint a <i>PDGFRA</i> , <i>CDK4</i> , <i>CDK6</i> és <i>MET</i> amplifikáció is jellemzi.
Mesenchimális	Az NF1, TP53 mutációk és a CDKN2A deléció/metiláció

2. táblázat: A glioblasztóma négy klinikailag releváns molekuláris alosztályának jellemzői [50].

*Mercier és munkatársai* (2012) immunhisztokémiai módszeren alapuló megközelítéssel próbálták elkülöníteni GBM molekuláris alosztályait. Az egyes alcsoportok jellemző eltéréseinek (EGFR, PDGFR és p53) az immunhisztokémiai vizsgálatát száz GBM mintán végezték el. A specifikus antitestek segítségével sikeresen elkülönítették a *Klasszikus* és *Proneurális* alcsoportot. Előbbi alcsoportra EGFR pozitív, valamint PDGFRA és p53 negatív festődés, míg utóbbira pozitív p53 és PDGFRA festődés volt jellemző [52].

#### 2.1.7 Az IDH1, ATRX és p53 markerek a rutin neuropatológiai diagnosztikában

A rutin neuropatológia legfőbb módszere a legtöbb patológiai laborban megtalálható immunhisztokémia (IHC), ami a daganatos sejtek molekuláris jellemzőiről szolgáltat információt [53]. Az IHC bizonyos szöveti antigének specifikus immunológiai módszerrel történő *in situ* detektálása. A diagnosztikában elsősorban a tumorok szöveti, sejttípus eredetének meghatározását, differenciáltsági fokának megállapítását teszi lehetővé, de alkalmas még bizonyos kórokozók jelenlétének kimutatására is [53, 54]. Az immunhisztokémia mellett a neuropatológiai diagnosztikai technikák közé a fluoreszcens *in situ* hibridizáció (FISH), a különböző PCR és blot technikák és a DNS szekvenálás tartozik [54].

A diffúz gliális daganatok altípusainak elkülönítésére – néhány molekuláris jellemző mellett – az *IDH1/2* mutációk, az 1p/19q kodeléció, az *ATRX* mutációk jelenléte szolgál.

Az *IDH1* gén (2q34) mutációjának azonosítása a neuro-onkológia áttörését jelentette 2008-ban, átalakítva a gliális daganatok patogenezisével kapcsolatos eddigi ismereteket [24, 39, 55]. Az *IDH1* gén az izocitrát-dehidrogenáz-1 fehérjét kódolja, ami a citromsavciklusban az izocitrát alfa-ketoglutaráttá alakulását katalizálja. A génben bekövetkező mutációk lehetnek funkció nyeréses és vesztéses mutációk is. Az *IDH1* génben keletkezett mutáció következménye egyrészt a fehérje funkciójának elvesztését okozza, ami az alfa-ketoglutarátt lecsökkent szintjét eredményezi a citoplazmában. Ennek következtében megnő a citoplazmában a HIF-1 szintje és a sejtmagba transzportálódik és az angiogenezisben, a sejt motilitásban, invázióban és az energia metabolizmusban szerepet játszó géneket átíródását indukálja. Másrészről pedig az *IDH1* az izocitrátot nem alfa-ketoglutaráttá, hanem 1-hidroxiglutaráttá konvertálja, aminek az akkumulálódása tumorképződéshez vezethet [39, 55]

A gén mutációja a diffúz asztrocitómák 59-90%-ában, az oligodendrogliomák 68-85%ában és az oligoasztrocitómák 50-83%-ában lehet jelen [8]. A II. grádusú asztrocitómákban az IDH mutációk mellett az esetek 65%-ában fordulhat elő valamilyen TP53 mutáció [13]. Ahogy azt korábban is említettük, a 2016-os WHO központi idegrendszeri tumor klasszifikáció alapján a GBM esetek feloszthatók vad és mutáns IDH típusúakra [4]. Az IDH1 gén mutációi általában a protein 132. arginin (R) kodonját érintik és 90%-ban a kodon második guanin nukleotidjának adeninre történő tranzícióját (c.395G>A) eredményezik. A mutáció következtében a fehérjeláncban az arginin hisztidinre (H) cserélődik (R132H) [24]. A mutáció detektálása ma már specifikus monoklonális antitest segítségével immunhisztokémiailag is lehetséges [56]. Sipayya és munkatársai (2012) összesen 184 glioma eset formalin fixált, paraffinba ágyazott mintáját vizsgálta az IDH1<sup>R132H</sup> mutációra specifikus IHC antitesttel [38]. Eredményeik alapján az IDH1<sup>R132H</sup> hasznos immunhisztokémiai marker a reaktív gliózis és az alacsony grádusú gliomák, illetve az IDH vad és az IDH mutáns glioblasztómák elkülönítésében [57]. Az IDH1/2 mutációt hordozó tumorok gyakran asszociálhatnak ATRX mutációkkal is. Az ATRX gén (Xq21.1) misszensz és nonszensz mutációi a fehérjetermék teljes hiányát idézik elő a gliális daganatokban. A gén mutációi a II. és III. grádusú gliomák 37,5%-ában, míg a glioblasztómák 7%-ában (többnyire IDH mutáns GBM) fordulnak elő [19].

A felsorolt markerek közül az IDH1<sup>R132H</sup> mutáció és az *ATRX* mutációs státusza is pontosan kimutatható IHC festéssel, míg az 1p/19q kodeléció detektálása általában FISH-sel történik [30]. Irodalmi adatok alapján az *ATRX* mutáció következtében lecsökkent fehérje

expresszió, valamint a *TP53* mutációk miatt jelentkező p53 IHC overexpresszió és az 1p/19q kodelécióval egymást kizáró események a gliális tumorokban. Ezen adatok alapján feltételezhető, hogy az *ATRX*, valamint a *TP53* gének – akár immunhisztokémiai úton megállapított – a mutációs státusza tükrözheti az 1p/19q kodeléció jelenlétét vagy hiányát a tumorban [19, 30].

## 2.2 A TP53 gén és mutációi

A genom őrzőjének is nevezett p53 fehérjét a *TP53* gén (17p13) kódolja (*3. ábra*). A p53 egy sejtmagi transzkripciós faktor, amely olyan stresszhatásokra adott válaszreakciókban aktiválódik, mint a DNS károsodás, hősokk, hipoxia vagy onkogén túltermelődés [58]. Az aktivált p53 képes fenntartani a genom integritását és stabilitását azáltal, hogy felfüggeszti a sejtciklust, illetve indukálja a DNS hibajavító mechanizmusát és az apoptózist [58].



*3. ábra:* A 17. koromoszóma rövid karján elhelyezkedő *TP53* gén által kódolt p53 fehérje fő strukturális elemei.

A 393 aminosavból álló fehérje öt fő doménből épül fel, melyek az alábbiak: Nterminális résznél található transzaktivációs domén (1-42 oldallánc), prolinban gazdag rész, SH3 (sarc homológia 3) domén (40-92 oldallánc), szekvencia specifikus DNS-kötő domén (103-306 oldallánc), tetramerizációs domén (307-355), valamint a C-terminusán egy szabályozó domén (356-393) [59]. A DNS domén kötő három fontos régiót foglal magába: az L2 hurok (163-195 kodon) felelős a protein foldingért és a fehérje stabilitásáért, míg az L3 hurok (236-251 kodon) és a hurok-redő-hélix (L1/S/H2) motívum (273-286) kapcsolódhat a DNS-hez a két-két utolsó oldallánc segítségével (241, 248 illetve 273, 280) [59].

A legtöbb tumorszuppresszor mutációja következtében inaktív, csonka fehérje keletkezik, de előfordulhat, hogy a mutáció a fehérje teljes hiányát idézi elő [60]. 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* mutáció következményeinek feltárása jelenleg is intenzíven kutatott téma, mivel a prognózisban, a terápiás válaszban és a daganat diagnosztikában is fontos szerepük van. A *TP53* mutációk prognosztikus jelentőségét végbél-, tüdő- és prosztatadaganatokban, krónikus limfocitás leukémiában és emlő karcinómákban is leírták [61-64].

A *TP53* mutációk gyors és megbízható azonosítása döntő fontosságú a pontos diagnosztikai döntésekhez és a célzott terápiához [65]. 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 [66]. 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 [67]. A meghatározás alapja, hogy a p53 fehérje overexpressziója a *TP53* mutációkra utal (*4. ábra*). 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 [68].



*4. ábra:* A mutáns p53 fehérje immunhisztokémiai detektálásának alapja. A vad típusú p53 instabil molekula, mely az immunhisztokémiai detektáláshoz túl rövid fél-életidővel rendelkezik (20-30 perc) (A). Viszont a mutáns fehérje féléletideje a kialakult konformáció változásnak köszönhetően 6-12 óra, így a p53 felhalmozódhat a tumorsejtekben, amely már stabil célpontot biztosít az immunhisztokémiai vizsgálatokhoz (B).

## 2.3 DNS hibajavítás, mint terápiás lehetőség glioblasztómában

A humán sejtek legalább öt ismert DNS hibajavító útvonallal rendelkeznek (I. mismatch hibajavítás; II. bázis excíziós hibajavítás; III. nukleotid excíziós hibajavítás; IV. direkt hibajavítás; V. rekombinációs hibajavítás), amelyek megóvják a genomot a DNS károsodástól és gondoskodnak az esetlegesen keletkező hibák javításáról [69]. A hibajavító útvonalakban közreműködő bizonyos fehérjék túlzott expresszióját is kimutatták daganatokban [70]. 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 [71].

Mivel a tumorgenezis egyik alapja a sejt számára nem letális DNS károsodások kialakulása, így a DNS hibajavító útvonalak és szignalizációjukban résztvevő fehérjék génjeinek eltérései is érdekeltek a tumorok patogenezisében: *BRCA1/2*, *MSH2*, *MLH1*, *OGG1*, valamint a jelen dolgozat egyik fő témáját nyújtó *PARP1* is [72].

A legtöbb tumorellenes szer vagy közvetlenül, vagy a DNS replikációját követően DNS károsodást indukál [71]. Az aktiválódó hibajavító útvonalak egyfajta rezisztencia mechanizmust biztosíthatnak ellenük, előidézve a daganatsejtek túlélését. Az alkalmazott terápiás szerek hatékonyságát nagyban befolyásolja a sejt DNS hibajavító kapacitása [73]. A DNS hibajavítás gátlása megnöveli a DNS károsító kemoterápiás szerek hatékonyságát. Kis molekulaméretű gátlószerek a konvencionális kemoterápiás szerekkel kiegészítve már eljutottak a klinikai kipróbálás fázisáig. A tumorképződés kapcsolatba hozható a DNS károsodásra adott hibás válaszokkal, illetve a hibásan működő DNS hibajavító mechanizmusokkal is. Ennek következtében csökkent hibajavító képessége, illetve nő a sejtek genetikai instabilitása is [71, 72].

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 [73].

#### 2.3.1 A poli(ADP-ribóz)polimeráz 1 (PARP1)

A tumorok rezisztenciájának biológiai alapját számos tényező, köztük a molekuláris heterogenitás és a károsodott DNS javító mechanizmusok alkotják. Az utóbbi időben a PARP inhibitorok a tumorterápia vonatkozásában is előtérbe kerültek, és több esetben klinikai gyógyszerkipróbálási vizsgálatok is történtek [74]. A PARP aktiválódása szerepet játszik az iszkémia-reprefúziós károsodásban, gyulladásokban az NF-κB ko-aktiváció révén és az öregedésben. Gátlásának neuroprotekcióban lehet szerepe. A PARP inhibitorok kedvező hatását leírták agyi traumában [75], illetve a PARP rendszer jelentőségét vizsgálták agyi iszkémiában [76], különböző gyulladásokban [77, 78] és daganatokban is [79].

A PARP egy olyan eukariótákban és prokariótákban is megtalálható enzimcsalád, mely tagjai más fehérjék poli-ADP "ribozilálását" végzik. Emberben eddig 17 különböző PARP fehérje expresszióját azonosították, melyek további négy alcsaládra oszthatók: I) DNS-függő PARP-ok; II) tankirázok; III) a CCCH cink-ujj domént tartalmazó PARP-ok; IV) ADP-ribóz kötő makro doménnel rendelkező PARP-ok [80].

A PARP1 egy sejtmagi fehérje, amely normál körülmények között részt vesz a DNS javításában és a genom stabilitásának fenntartásában [80]. A DNS törött szálához kötődik és

poli(ADP-ribóz) láncot készít NAD+ szubsztrátból, amely egyfajta szignálként funkcionál a sejt számára a DNS hibajavítás elindításához (*5. ábra*) [81].



5. ábra: A PARP1 enzim DNS hibajavító mechanizmusa

(forrás: http://canceres.info/?farmaco=inhibidores-proteina-parp)

A PARP1 megnövekedett szintje fokozhatja a tumorok antiapoptotikus sajátságát és rezisztenciát eredményez az egyes DNS károsító terápiás szerekkel szemben [82]. 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 (*6. ábra*) [80].



6. ábra: A PARP inhibitorok jelentősége (forrás: http://www.parp-inhibitors.com/)

Jelenleg több PARP inhibitorok is forgalomban van, melyek leggyakoribb típusai: 3aminobenzamid (3-AB), a Benzimidazolok (ABT-888), a Pthalazinonok (AZD2281 vagy Olaparib), az Ideno-izoqiunolinonok (INO-1001), a Triciklikus indolok (AG-014699) és a Pyrrolokarbazol (CEP-9722). A PARP inhibitorok alkalmazása számos daganattípusban (emlő, petefészek, hasnyálmirigy, vastagbél és hematológiai malignómák) esetén is meggyőző eredményeket mutatott [83].

Az agytumorok közül glioblasztóma vonatkozásában állnak rendelkezésre korai eredmények [83]. Újabb klinikai vizsgálatok alapján a PARP1 DNS javító fehérjét célzó terápia új és ígéretes megközelítést jelenthet glioblasztómában is [84, 85]. A ClinicalTrials (https://clinicaltrials.gov) adatbázis alapján három, jelenleg is futó PARP1 inhibícióval kapcsolatos klinikai vizsgálat ismert, melyek eredményei azonban egyelőre nem publikusak.

Az overexpresszált PARP1 következtében kialakult nem megfelelő DNS hibajavító aktivitás serkenti a tumorsejtek antiapoptotikus tulajdonságait, ami kemoterápia rezisztenciához vezethet [74]. Bár a PARP1 legfontosabb szerepe az egyszálú DNS törések javítása, feltételezhetően hozzájárulhat a tumorprogresszió indukálásához is. A nagy mennyiségben kifejeződő PARP1 kapcsolatban lehet az előrehaladott klinikai jellemzőkkel és a rövidebb túléléssel is a humán daganatokban [86].

DNS-t ért károsodásokat követően PARP1 – a p53-hoz hasonlóan – az egyik legkorábban expresszálódó protein [87]. Emellett mindkét protein közreműködik a genom integritásának megőrzésében, ami egyfajta funkcionális kapcsolatot jelez a DNS hibajavításban

[88]. A hibás DNS-sel rendelkező sejtben a p53 különböző poszttranszlációs modifikációkon megy keresztül, melyek között a PARP1 általi poli(ADP-ribozil)áció is szerepel. Az is bizonyított, hogy az endogén PARP1 gátolja a p53 transzaktiváló funkcióját, így a PARP1 szabályozza a DNS károsodásokra adott p53 válaszokat is. Továbbá, az ADP-ribóz polimerek fontos szerepet töltenek be a p53 DNS kötő képességében is [87].

## 3. 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

## 4. Anyagok és módszerek

## 4.1 PARP1 genomikai analízise GBM-ben

4.1.1 The Cancer Genome Atlas (TCGA) adathalmazok

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 (*3. táblázat*):

- Glioblastoma Multiforme (TCGA, Provisional)
- 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. Az adathalmazok a 'Provisional' megjelölést viselik, amelyeket havonta frissítenek a legújabb TCGA eredmények alapján [89]. 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.tcga-data.nci.nih.gov) töltöttünk le.

A vizsgálatba bevont minták kiválasztása során az alábbi kritériumokat vettük figyelembe:

- Jelen kutatás során a gyermekkori glioblasztómák egyedi genetikai profilja miatt [90, 91], csak a 18 éven felüli betegek genomikai adatait használtuk fel
- A gliális daganatok közül csak az asztrocita eredetű tumorokat értékeltük (oligodendroglioma és oligoasztrocitómákat kizártuk a vizsgálatokból)

A cBioPortal az mRNS expresszió z-score értékeket az alábbiak szerint határozta meg [89, 92]:

$$\mathbf{z} - \mathbf{score} = \frac{\begin{pmatrix} az \ adott \ gén \ relatív \ expressziója \\ a \ tumor \ mintában \end{pmatrix} - \begin{pmatrix} az \ átlag \ expresszió \\ a \ normál \ minták \ ban \end{pmatrix}}{\begin{pmatrix} a \ diploid \ minták \ expressziójának \\ a \ standard \ deviációja \end{pmatrix}}$$

A cBioPortal adataiban a kópiaszám-eltéréséket a GISTIC (Genomic Identification of Significant Targets in Cancer) algoritmus alapján vizsgáltuk, amely a kópiaszám-eltéréseket az alábbi módon osztályozza [89, 92]: 2 = amplifikáció; 1 = alacsony mértékű nyerés; 0 = nincs kópiaszám-változás; -1 = heterozigóta deléció; -2 = homozigóta deléció.

	Brain Lower Grade Glioma (TCGA, Provisional) (n=97)	Glioblastoma multiforme (TCGA, Provisional) (n=135)				
Betegek átlagéletkora (év)						
	$42,31 \pm 13,14$	60,59±13,48				
	(tartomány: 20-74)	(tartomány: 21-89)				
Túlélési idő (hónap)						
	$24,76 \pm 22,17$	$13,33 \pm 12,64$				
Betegek nem						
Férfi	42 (43%)	45 (33%)				
Nő	55 (57%)	90 (67%)				
WHO grádus*						
Π	29 (30%)	-				
III	67 (70%)	-				
IV	-	135 (100%)				
ATRX státusz						
Mutáns	45 (46%)	7 (5%)				
Vad típus	52 (54%)	128 (95%)				
IDH1/2 státusz						
Mutáns	66 (68%)	8 (6%)				
Vad típus	31 (32%)	127 (94%)				
TP53 státusz						
Misszensz mutáció	51 (53%)	33 (24%)				
Nonszensz mutáció	14 (14%)	10 (8%)				
Vad típus	32 (33%%)	92 (68%)				

3. táblázat: A vizsgált TCGA minták kliniko-patológiai jellemzői

\*WHO grádus egy minta esetében ismeretlen volt

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, melyek klinikai jellemzői és a mutációs státuszukat a *3. táblázatban* foglaltuk össze. A 135 GBM mintából molekuláris altípus 119 esetben volt elérhető, melyek megoszlása a következő volt: 57 *Mesenchimális*, 43 *Klasszikus*, 16 *Proneurális* és 5 *Neurális*.

A 135 glioblasztómát a *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.

## 4.2 A vizsgálatok beteganyagai

## 4.2.1 A diffúz gliomák gyakorisága a DE KK Patológiai Intézetében

Retrospektív vizsgálataink során a Debreceni Egyetem Klinikai Központ Pathologiai 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, e*MedSolution* adatbázisban meglévő adatok alapján történtek. Munkánk során a daganatokat az alábbi szempontok alapján vizsgáltuk és csoportosítottuk: WHO grádus, a betegek neme és életkora, illetve a daganatok anatómiai elhelyezkedése.

## 4.2.2 A PARP1 IHC korreláció beteganyaga

A bioinformatikai eredmények validálása érdekében egy szintén retrospektív vizsgálat során 60 (30 nő és 30 férfi) a Debreceni Egyetem Klinikai Központ Pathologiai 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 [4].

## 4.3 Immunhisztokémiai vizsgálatok

Az immunhisztokémiai vizsgálatokat 4 μm-es FFPE metszetekből automatizált és standardizált körülmények között végeztük a *Leica Bond Max*<sup>™</sup> immunhisztokémiai automatán (Leica Biosystems, Wetzlar, Németország) a *Bond*<sup>™</sup> *Polymer Refine Detection* kittel. Az immunhisztokémiai reakciók minden esetben a gyártók protokollja alapján történt az anti-p53, anti-ATRX, anti-IDH1<sup>R132H</sup>, és anti-PARP1 primer antitestek alkalmazásával. Az antitestek specifikációit a *4. táblázatban* foglaltuk össze. Vizualizációra a *Bond*<sup>™</sup> *Polymer Refine Detection* kittet használtuk, emellett hematoxylin festést is alkalmaztunk. A reakciókhoz a gyártók által javasolt pozitív kontrollokat alkalmaztunk, emellett negatív kontrolként minden esetben a primer antitestet kihagytuk a reakcióelegyből.

Antitestek	Katalógus szám	Gyártó	Hígítás
anti-ATRX HPA001906		Sigma-Aldrich	1:1000
anti-IDH1 <sup>R132H</sup>	DIA-H09	Dianova	1:50
anti-p53	DO-7	Dako	1:700
anti-PARP1	ab6079	Abcam	1:500

4. táblázat: Az immunhisztokémiai jelöléshez használt primer antitestek specifikációi.

Az immunhisztokémiai festések kiértékelése szemi-kvantitatív módon két független megfigyelő által történt. A kiértékelés során azokat a mintákat tekintettük IDH1<sup>R132H</sup> és p53 pozitívnak, ahol a tumorsejtek több mint 10%-a pozitív festődést [30]. Az ATRX jelölés esetében szintén a 10%-os cut-off értéket alkalmaztunk a nukleáris pozitivitás megállapítására [93]. 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.

## 4.4 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.

## 4.4.1 A szomatikus TP53 mutációk immunhisztokémiai tulajdonságai

Az ismert IHC karakterrel bíró TP53 mutációkat különböző szempontok alapján vizsgáltuk:

- <u>a mutáció génen belüli lokalizációja:</u> exon vagy intron; CpG sziget vagy splicing hely
- <u>a mutáció következménye:</u> frameshift, introni mutáció, nagy deléció, misszensz, nonszensz, néma, splicing mutáció, egyéb
- <u>a mutáció típusa:</u> pontmutáció, duplikáció, komplex, deléció, inszerció
- <u>a p53 fehérjén belül érintett strukturális motívum:</u>
  - C-terminális domén
  - C-terminális domén/sejtmagi export szekvencia (NLS)
  - C-terminális domén/tetramerizációs domén
  - L1/S/H2, L2/L3 hurkok
  - N-terminális domén/transzaktivációs domén
  - N-terminális domén/transzaktivációs domén/sejtmagi export szekvencia (NLS), nem DNS-kötő hurok (NDBL, non-DNA-binding loop)/β-lemezek
  - SH3-like/Prolin-gazdag domén
  - N-terminális domén

#### 4.4.2 TP53 mutációk klinikopatológiai jellemzése

Immunhisztokémiai jellemzők összesen 7124 minta esetében volt ismert. A betegek neme 4894 minta esetében volt elérhető: 2797 férfi (57,2%) és 2097 nő (42,9%), az átlagéletkor a diagnózis idején 56,90  $\pm$  16,23 év volt (3072 beteg adata alapján). A p53 IHC expressziós jellemzőit 60 különböző tumortípusban vizsgáltuk. A minták eredete a következő eloszlást mutatta: sebészi úton eltávolított daganatrészlet (83,3%), biopszia (13,5%), sejttenyészet (2,7%), vér (0,3%), csontvelő (0,1%), pleurális folyadék (0,03%), nyál (0,01%) és egyéb minta (0,1%). Továbbá a vizsgált minták eredete 5211 mutáció esetében volt ismert: 4977 (95,5%) primer tumor, 106 (2%) metasztázis, 84 (1,6%), kiújult és 44 (0,8%) szekunder tumor.

# 4.4.3 A TP53 mutációk csoportosítása a gyakoriságuk és az IHC mintázatuk alapján

Az adatbázisban megtalálható 1139 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 ≥ 0,013 és az IHC pozitivitás ≥ 0,85
- *B csoport:* főleg IHC negatív nonszensze mutációk; a mutációk frekvenciája ≤ 0,011 és az IHC pozitivitás ≤ 0,44
- C csoport: IHC pozitív, kevésbé gyakori misszensz mutációk; a mutációk frekvenciája ≤ 0,072 és az IHC pozitivitás ≥ 0,74

Vizsgálatunk csak azokat a *TP53* mutációkat foglalja magába, amely esetében 15, vagy több minta IHC jellemzője állt rendelkezésünkre.

#### 4.5 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. Az adatbázisokból letöltött adathalmazokat a Microsoft Excel 2013-as verziójába (Microsoft Corp., Redmond, Washington, USA), illetve az R statisztikai szoftverbe importáltuk. A kategorikus értékeket tartalmazó csoportok összehasonlítása során a Pearson Khi-négyzet ( $\chi$ 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 Spearmann korrelációs tesztekkel elemeztük. Az egyes 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 [94]. A *TP53* mutációk tumortípusok közötti frekvencia különbségeinek hőtérkép ábrázolására a Gene-E version 3.0.204 (http://www.broadinstitute.org/cancer/software/GENE-E/index.html) szoftvert használtuk.

## 5. Eredmények

# 5.1 A Debreceni Egyetem Patológiai Intézetében szövettanilag diagnosztizált diffúz gliomák 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 (*5. táblázat*).

Tumortípus	Esetszám	Átlagéletkor (szórás)	Férfi / Nő arány
II. grádus (n=127)			
Diffúz asztrocitóma	51 (40%)	37,6 (± 21,9)	22/29
Oligodendroglioma	39 (31%)	34,8 (± 19,4)	26/13
Oligoasztrocitóma	37 (29%)	45,5 (± 17,7)	14/23
III. grádus (n=32)			
Anaplasztikus asztrocitóma	19 (59%)	55,0 (± 14,3)	12/7
Anaplasztikus			
oligodendroglioma	8 (25%)	45,8 (± 18,5)	5/3
Anaplasztikus oligoasztrocitóma	5 (16%)	51,3 (± 13,7)	5/0
IV. grádus, glioblasztóma (n=182)			
Primer glioblasztóma	142 (78%)	58,6 (± 15,9)	66/76
Szekunder glioblasztóma	24 (14%)	55,6 (± 16,3)	15/9
Óriás sejtes glioblasztóma	8 (4%)	57,9 (± 17,6)	3/5
Glioszarkóma	8 (4%)	52,4 (± 18,3)	4/4

# 5. *táblázat.* A 2007 és 2011 között szövettanilag diagnosztizált diffúz gliomák előfordulása, a betegek átlagéletkora és nemek aránya alapján

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 (±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 gliális tumor 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 gliális daganat közül 19 betegnél (59,4%) diagnosztizáltak anaplasztikus asztrocitómát, 8 betegnél (25%) anaplasztikus oligodendrogliomát és 5 betegnél (15,6%) anaplasztikus oligoasztrocitómát. A magas grádusú gliomában szenvedő betegek átlagéletkora 57 év volt (±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 gliális daganatok anatómiai lokalizációjáról összesen 74 beteg esetén álltak rendelkezésünkre pontos információk. A daganatok 41 betegnél a homloklebenyben fordultak elő, 22 esetben a halántéklebenyben, míg a nyakszirti lebenyben 5, az agytörzsben 4, a kisagyban 2 és a fali lebenyben 1 betegnél diagnosztizáltak daganatot (*7. ábra*). Az asztrocita eredetű daganatok (n=24) legfrekventáltabb helye a homloklebeny volt (54%), 25%-ban a halántéklebeny, 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 halántéklebenyben közel azonos volt (48 vs. 40%), az agytörzsben 8% és a nyakszirti lebenyben 2%-ban fordult elő. Az oligoasztrocitómák (n=25) 60%-át a homloklebenyben, 24%-ukat a halántéklebenyben, 12%-ukat pedig a nyakszirti lebenyben azonosították. Egy esetben a kisagyban fordult elő a daganat.



7. *ábra:* A Debreceni Egyetem KK Pathologiai Intézetében diagnosztizált II. grádusú gliomák százalékos megoszlása az agy különböző területeiben

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 homloklebeny (n=51), halántéklebeny (n=25), fali lebeny (n=11), nyakszirti lebeny (n=3). A glioblasztóma és variánsainak lokalizációját a *8. ábra* mutatja be. 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.



8. *ábra:* A DE KK Pathologiai Intézetében diagnosztizált glioblasztóma és variánsainak százalékos megoszlása az agy különböző területeiben

## 5.2 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 nyerés 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 (*6. táblázat*).

Glioma markerek	NI	Átlag z-score értékek	$\pm$ SE <sup>1</sup>	p-érték	95% CI <sup>2</sup>	
	IN				Alsó	Felső
ATRX státusz						
Vad típus	128 (95%)	0,130	0,103	0.007	-2,124	-0,367
Mutáns	7 (5%)	1,375	0,271	0,006		
<i>IDH1/2</i> státusz						
Vad típus	127 (94%)	0,158	0,104	0.151	-1,457	0,228
Mutáns	8 (6%)	0,772	0,369	0,151		
TP53 státusz						
Vad típus	92 (68%)	0,028	0,118	0.015	-0,943	-0,101
Mutáns	43 (32%)	0,550	0,182	0,015		

*6. táblázat:* A *PARP1* mRNS expresszió és a vizsgált glioma markerek mutációs státusza közötti korreláció.

(A szignifikáns értékek *vastagon* szedettek)

A kópiaszám-változás és mRNS expresszió korrelációját vizsgálva statisztikailag szignifikáns különbségeket találtunk a heterozigóta deléció és diploid (p=0,005), nyerés és diploid (p<0,001), és a heterozigóta deléció és nyerés státuszok között (p<0,001). Ezen eredmények azt sugallják, hogy a kópiaszám-eltérések (jelen esetben a *PARP1* nyerés, illetve a heterozigóta deléció) az mRNS expresszió változások mögött álló egyik lehetséges mechanizmus lehet glioblasztómában.

#### 5.2.1 PARP1 expresszió az asztrocitómák malignus transzformációja során

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 összesen 55 II. grádusú, illetve 114 III. grádusú asztrocitómában volt elérhető az 562 IV. grádusú GBM mellett. 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 nyerés 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 (**9.** *ábra*).



9. ábra: A PARP1 kópiaszám-változások (CNAs) gyakorisága a glioma
WHO grádusok között (p<0,001; Khi-négyzet próba függetlenségvizsgálatra</li>
Yates-korrekcióval)
*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 (*10. ábra*).



*10. ábra:* A *PARP1* mRNS expresszió szintek a GBM molekuláris alosztályok között. *PARP1* mRNS expresszió értékek (z-score) szignifikánsan magasabbak voltak a III. és IV. grádusú asztrocitómákban.

5.2.2 A PARP1 expresszió és a glioma markerek mutációs státusza közötti kapcsolat

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 (*8. táblázat*).

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 (*11/A. ábra; 6. táblázat*). 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 (*11/B. ábra*).



11. ábra: A TP53 mutációs státusza és a PARP1 mRNS expresszió kapcsolata glioblasztómában. A PARP1 mRNS expresszió magasabb volt a TP53 mutáns glioblasztómában (A).
A mutációk hatását tekintve a PARP1 expresszió mértéke csak a misszensz mutációk esetében mutatott szignifikáns különbséget a vad típusú TP53-hoz képest (B).

# 5.2.3 A PARP1 immunhisztokémiai expressziója és az IDH1, ATRX és a p53 markerek közötti összefüggések

A 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 (*12. ábra*) [95]. Az esetek 90%-a (54/60) mutatott PARP1 pozitív festődést, míg 10%-a (6/60) negatív volt.



*12. ábra:* A vizsgált molekuláris markerek immunhisztokémiai festődése a vizsgált klinikai glioblasztóma kohortban. (Nagyítás: x200, Scale bar: 100 μm.)

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<sup>R132H</sup> expresszióval nem figyeltünk meg hasonló összefüggéseket (**9. táblázat**).

	PARP1 IH	p-érték				
	Negatív	Pozitív	-			
Betegek neme						
Férfi	2	28	0.3804			
Nő	4	26	0,3894			
<u>Életkor</u>						
Átlag ± SD*	61,69 ± 6,45	58,52 ± 9,18	0,415			
p53 expresszió						
Negatív	4	13	0 0281			
Pozitív	2	41	0,0281			
IDH1 <sup>R132H</sup> expresszió						
Negatív	6	52	0.6316			
Pozitív	0	2	0,0310			
ATRX expresszió						
Negatív	3	4	0.0020			
Pozitív	3	50	0,0020			

9. táblázat: A PARP1 immunhisztokémiai expressziója és kapcsolata a klinikopatológiai paraméterekkel, illetve a glioma molekuláris markereivel.

\*Standard deviáció (A szignifikáns értékek vastagon szedettek)

#### 5.2.4 PARP1 mRNS expresszió a GBM molekuláris alosztályaiban

A *PARP1* genetikai/genomikai jellegzetességeit vizsgálva a különböző GBM altípusokban megállapítottuk, hogy a *Proneurális* és a *Klasszikus* GBM altípusok megnövekedett *PARP1* expressziót mutatnak (*13. ábra*). 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.



*13. ábra:* A *PARP1* mRNS expresszió szintek a különböző WHO grádusok között. A *Proneurális* és a *Klasszikus* GBM alcsoportok emelkedett PARP1 expressziót mutattak a többi csoporthoz viszonyítva.

Ezzel párhuzamosan a *PARP1* kópiaszám-változásokat szintén megvizsgáltuk a GBM altípusokban. *PARP1* gén kópiaszám információja 475 olyan esetben volt leírva, ahol a transzkripciós 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 nyerés 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%) (**14. ábra**).



14. *ábra:* A *PARP1* kópiaszám-változások (CNAs) gyakorisága a GBM molekuláris altípusai között

#### 5.2.5 A magas PARP1 expresszió prognosztikus értéke a GBM alcsoportokban

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 glioblasztóma 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 betegei átlagosan hosszabb túlélést mutatnak, azonban nem találtunk statisztikailag szignifikáns különbséget a két csoport között (*15/A. ábra*).

A betegek átlag túlélése a különböző GBM alosztályok között a következő volt: *Klasszikus*=12,7; *Proneurális*=19,8; *Mesenchimális*=11,7, és *Neurális*=7,7 hónap. Az elvégzett Kaplan-Meier túlélés analízis alapján a *Klasszikus* GBM altípusban az alacsony-PARP1 csoport betegeinek szignifikánsan rövidebb teljes túlélést mutattak a magas-PARP expressziós csoport betegeivel szemben (p=0,031) (*15/B. ábra*).



15. ábra: A magas-, illetve alacsony-PARP1 mRNS expresszióval rendelkező esetek teljes túlélése (OS, overall survival) Kaplan–Meier görbén ábrázolva GBM-ban (A) és annak *Klasszikus* alcsoportjában (B).

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 alapján:

- *TP53<sup>mut</sup>*/magas-PARP1 (n=29)
- *TP53<sup>mut</sup>*/alacsony-PARP1 (n=14)
- $TP53^{WT}$ /magas-PARP1 (n=39)
- *TP53*<sup>WT</sup>/alacsony-PARP1 (n=53)

Eredményeink alapján a vad típusú *TP53* génnel és magas-PARP1 expresszióval rendelkező betegek rövidebb túlélést mutatnak (p=0,039) (*16. ábra*).



16. ábra: A különböző PARP1 mRNS expresszióval és TP53 mutációs státusszal rendelkező GBM esetek teljes túlélése (OS, overall survival) Kaplan–Meier görbén ábrázolva glioblasztómában.

#### 5.2.6 PARP1 expresszió és a p53 útvonal kapcsolata glioblasztómában

Korábbi eredményeink alapján, a *TP53* mutációkon túl, részletesen megvizsgáltuk a PARP1 expresszió és a teljes p53 útvonal (*CDKN1A* (p21), *MDM2*, *MDM4*, *CDKN2A* (p14<sup>ARF</sup>), and *TP53BP1*) közötti kapcsolatot is. Az mRNS expressziót tekintve, a *PARP1* szignifikáns korrelációt mutatott a *TP53*, *CDKN1A*, és a *TP53BP1* génekkel (*10. táblázat*, *16. ábra*).



*16. ábra:* A *PARP1* és a p53 útvonal közötti kapcsolat glioblasztómában. A gén-gén interakción alapuló hálózat a PARP1 és a p53 útvonal elemeinek mRNS expressziója közötti korrelációkat ábrázolja.

	Kendall t	au b	Spearman rho		
Gének	Korrelációs koefficiens p-érték		Korrelációs koefficiens.	p-érték	
CDKN1A	-0,187	0,001	-0,272	0,001	
CDKN2A	0,028	0,629	0,047	0,587	
MDM2	-0,111	0,057	-0,168	0,051	
MDM4	-0,003	0,953	-0,004	0,961	
<i>TP53</i>	0,169	0,004	0,246	0,004	
TP53BP1	0,162	0,005	0,230	0,007	

10. táblázat: A PARP1 és a p53 útvonal tagjainak mRNS expressziója közötti kapcsolatok glioblasztómában

(A statisztikailag szignifikáns értékek vastagon szedettek)

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* nyerést mutató eseteket emelkedett *PARP1* expresszió (0,026) jellemezte (*17. ábra*).



17. *ábra:* A *PARP1* mRNS expresszió és a *CDKN2A*, valamint az *MDM4* kópiaszám-változások közötti kapcsolat glioblasztómában

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 (*11. táblázat, 18. ábra*).

Gének	PARP1 expresszió <sup>1</sup>		(()-	$+ \mathbf{CE}^2$	95% CI <sup>3</sup>	
	alacsony	magas	p-ertek	± 2F-	Alsó	Felső
CDKN1A	0,075	-0,227	0,009	0,113	0,077	0,526
CDKN2A	-1,117	-1,029	0,560	0,151	-0,387	0,210
MDM2	2,363	5,240	0,310	2,819	-8,472	2,717
MDM4	0,614	2,366	0,310	1,718	-5,151	1,647
<i>TP53</i>	-0,278	0,225	0,003	0,164	-0,828	-0,178
TP53 <i>BP1</i>	-0,520	-0,052	0,004	0,161	-0,787	-0,150

11. táblázat: A p53 útvonal és a PARP1 közötti összefüggések glioblasztómában

<sup>1</sup>Átlag mRNS z-score értékek; <sup>2</sup>Standard hiba; <sup>3</sup>Elfogadási tartomány (A statisztikailag szignifikáns értékek *vastagon* szedettek)



*18. ábra:* A p53 útvonal génjeinek expressziója az alacsony-, illetve magas-PARP1 csoportokban. A *TP53* és a *TP53BP1* gének mRNS expressziója emelkedett, míg a *CDKN1A* (p21) expressziója csökkent volt a magas-PARP1 csoportban. A szignifikancia szinteket az alábbiak szerint jelöltük: \* (p < 0,05), \*\* (p < 0,01), és \*\*\* (p < 0,001).

#### 5.3 A mutáns p53 IHC expressziója az IARC adatbázis alapján

Vizsgálatunk egyik célja közé tartozott a *TP53* gént érintő mutációk IHC jellemzőinek karakterizálása. 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 úgynevezett 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. Az adatbázis alapján megállapított leggyakoribb *TP53* mutációkat, illetve IHC jellemzőit az **12. táblázat** foglalja össze.

<i>TP53</i> mutáció <sup>1</sup>	N	Elérhető p53 IHC eredmények	A mutációk frekvenciája <sup>1</sup>	IHC pozitivitás <sup>2</sup>
R175H	1215	336	0,020	0,914
R248Q	949	231	0,016	0,931
R248W	765	226	0,013	0,960
R273H	856	222	0,014	0,923
R273C	717	208	0,012	0,957
R282W	613	174	0,010	0,931
G245S	457	139	0,008	0,906
Y220C	396	120	0,007	0,850
R249S	442	109	0,007	0,872
R213*	330	90	0,006	0,244
C176F	206	83	0,003	0,819
V157F	213	58	0,004	0,828
M237I	198	58	0,003	0,914
R196*	252	56	0,004	0,268
Y163C	168	55	0,003	0,945

12. táblázat: A gliomákban előforduló 15 leggyakoribb szomatikus TP53 mutáció frekvenciája és IHC pozitivitása

<sup>1</sup>individuális TP53 mutáció/összes TP53 mutáció; <sup>2</sup>p53 pozitív IHC/összes IHC

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 (**13. táblázat**).

	p53 immunhisztokémia				_	
Mutáció jellemzők	Összesen	Negatív (%)		Pozitív (%)		p-érték
	(n=7878)	(n=	=1852)	( <b>n</b> =	6026)	
Exonok/intronok						
exon	7690	1745	(22,69)	5945	(77,31)	0.001
intron	186	105	(56,45)	2086	(43,55)	0,001
nem ismert	2	2	(100)	0	(0,00)	
CpG hely	5050	1 4 2 2		20.40	(72.22)	0.0001
Igen	53/3	1433	(26,67)	3940	(73,33)	<0,0001
nem	2505	419	(16,73)	2086	(83,27)	<0,0001
Splicing hely						
alternatív	71	12	(16,90)	59	(83,10)	0,1872
konszenzus	112	72	(64,29)	40	(35,71)	<0,0001
kriptikus	62	16	(25,81)	46	(74,19)	0,6684
nincs	7633	1752	(22,95)	5881	(77,05)	<0,0001
Mutáció típusa						
pontmutációk	6860	1324	(19,30)	5536	(80,70)	<0,0001
duplikáció	97	6	(6,19)	91	(93,81)	5,16E-05
komplex	48	18	(37,50)	30	(72,50)	0,0219
deléció	667	380	(56,97)	287	(43,03)	<0,0001
inszerció	196	117	(59,69)	79	(40,31)	<0,0001
nem ismert	10	7	(70,00)	3	(30,00)	0,000522
Mutáció következménye						
kereteltolódás (frameshift)	677	451	(66,62)	226	(33,38)	<0,0001
introni	53	25	(47,17)	28	(52,83)	4,58E-05
nagy deléció	2	2	(100)	0	(0,00)	0,0107
misszensz	5889	707	(12,01)	5182	(87,99)	<0,0001
nonszensze	552	393	(71,20)	159	(28,80)	<0,0001
néma (silent)	367	136	(37,06)	231	(62,94)	3,64E-10
splicing	131	86	(65,65)	45	(34,35)	<0,0001
egyéb	177	44	(24,86)	133	(75,14)	0,6683
nem ismert	30	8	(26,67)	22	(73,33)	0,6828
Strukturális motívum alapján						
C-terminális	234	104	(44,44)	130	(55,56)	<0,0001
C-terminális/NLS	31	13	(41,94)	18	(58,06)	0,0153
C-terminális/tetramerizációs	101	39	(38,61)	62	(61,39)	3,15E-04
L1/S/H2	1693	234	(13,82)	1459	(86,18)	<0.0001
L2/L3	2765	434	(15.70)	2331	(84.30)	<0.0001
N-terminális	34	26	(76,47)	8	(23,53)	<0.0001
N-terminális/Transzaktivációs	33	20	(60.61)	13	(39,39)	<0.0001
N-terminális/Transzaktivációs/NFS	5	20	(40.00)	3	(60.00)	0 3844
NDRI /R-lamazak	2657	795	(29.92)	1867	(70.08)	< <u>0,5011</u>
SH3-szerű/Prolin-gozdog	101	60	(29, 92)	/1	(40,50)	<0,0001
nem ismert	224	125	(55,80)	41 99	(44,20)	<0,0001

### 13. táblázat: A szomatikus TP53 mutációk immunhisztokémiai mintázata

A p53 fehérje strukturális motívumaiban keletkezett mutációk között is eltérő p53 IHC jelölődés volt megfigyelhető (*19. ábra*). 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. Másrészről, 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 (*13. táblázat*).



*19. ábra.* Az egyes IHC csoportok *TP53* mutációinak lokalizációja a p53 fehérjében. A különböző színek a p53 strukturális elemeit jelölik: kék = C-terminális régió; zöld=C-terminális/tetramerizációs domén; piros = L1/S/H2; lila = L2/L3; sárga = NDBL/béta-lemezek).

#### 5.3.1 Az individuális TP53 mutációk IHC expressziós jellemzői

Vizsgálatunk során meghatároztuk az egyes *TP53* mutációk IHC expressziós profilját és összehasonlítottuk a kliniko-patológiai 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 nonszensze mutációk (R213\*, R196\*, R306\*, W146\*, and 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 csoportba* a gyakori és IHC negatív mutációk (7/78; 9%), míg a *C csoportba* a kevésbé gyakori, IHC pozitív mutációk tartoztak (62/78; 79,5%) (**20. ábra**).



20. ábra: A szomatikus TP53 mutációk csoportosítása gyakoriságuk és IHC pozitivitásuk alapján. A TP53 mutációkat három csoportba soroltuk: az A csoportba tartoznak a gyakori 'hot spot' mutációk (kék háromszög) (mutáció frekvencia  $\geq 0,013$ ; IHC pozitivitás  $\geq 0,85$ ). A zöld körrel jelölt B csoportba sorolt TP53 mutációk gyakori nonszensz mutációk (mutáció frekvencia  $\leq 0,011$ ; IHC pozitivitás  $\leq 0,44$ ). A sárga négyzettel ábrázolt C csoport mutációi kevésbé gyakori, IHC pozitív mutációk (mutáció frekvencia  $\leq 0,072$ ; IHC pozitivitás  $\geq 0,74$ ).

#### 5.3.2 A TP53 IHC csoportok klinikopatológiai jellemzői

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 kliniko-patológiai paramétereket megvizsgáltuk a három p53 IHC mutációs csoportban is. Annak ellenére, hogy az agydaganatok esetében nem tapasztaltunk különbségeket, öt másik tumortípus esetén (mell, hólyag, hematopoietikus rendszer, máj, fejnyak) szignifikáns eltéréseket figyeltünk meg az egyes csoportok átlagéletkora között. A mellrákban érintett nonszensz *TP53* mutációkat hordozó betegek (*B csoport*) átlagéletkora fiatalabb volt (48,83±13,69 év) másik két csoporthoz képest (*A csoport*: 55,06±13,99 év és *C csoport*: 55,97±14,07 év). Hasonló különbségek mutatkoztak a hólyagrákos betegeknél a *B* (59,52±14,20 év) és az *A csoport* (64,44±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 csoportbat* 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 az ilyen 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 (*21. ábra*).



21. ábra: A gyakori nonszensz *TP53* mutációk különböző gyakorisága különböző tumortípusokban. A hőtérképen 'heat map' ábrázolt hét *TP53* mutáció előfordulási gyakorisága az adott tumortípusokban a gyakoriságukhoz viszonyítva. A skála a *TP53* mutációk átlag előfordulásától való eltérését jelöli különböző tumortípusokban. A szignifikancia szinteket az alábbiak szerint jelöltük: \* (p<0,05), \*\* (p<0,01), és \*\*\* (p<0,001).

#### 5.4 A szomatikus TP53 mutációk IHC jellemzői gliomákban

A *TP53* szomatikus mutációinak IHC jellemzőit a rendelkezésre álló 353 gliális agydaganatban részletesen vizsgáltuk (*14. táblázat*).

Tumor	Esetszám	p53 IHC		IHC
(n=353)		negatív	pozitív	pozitivitás
Glioblasztóma, NOS	164	21	143	87,20%
Asztrocitóma, NOS	71	16	55	77,46%
Anaplasztikus	33	6	27	81,82%
asztrocitóma				
Malignus glioma, NOS	28	1	27	96,43%
Oligodendroglioma,	18	7	11	61,11%
NOS				
Óriássejtes GBM	14	2	12	85,71%
Kevert glioma	13	0	13	100,00%
Glioszarkóma	10	1	9	90,00%
Pilocitás asztrocitóma	2	1	1	50,00%

*14. táblázat:* Az IARC *TP53* adatbázisban elérhető glioma esetek p53 IHC státusza

A gliomákban leírt mutációk 84%-a bizonyult IHC pozitívnak (**22/A. ábra**). A *TP53* mutációk IHC pozitivitása mindössze az I. grádusú pilocitás asztrocitómában (50%) és az oligodendrogliomákban (61,11%) nem haladta meg a 75%-ot.



22. ábra: A gliális tumorokban előforduló TP53 mutációk IHC mintázata az IARC TP53 adatbázis alapján (A), illetve a TP53 mutációk mRNS expressziója asztrocitómákban a The Cancer Genome Atlas (TCGA) adatbázis adatai alapján (B).

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 szomatikus *TP53* mutáció a vizsgált esetek 46,6%-ában volt megfigyelhető. 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 (*22/B. ábra*) alapján a *TP53* esetében 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. A gliomákban előforduló leggyakoribb *TP53* mutációk között nem szerepel ilyen mutáció (*15. táblázat*).

<i>TP53</i> mutációk	Ν	p53 IHC pozitivitás*
R273C	47	95,7%
R175H	27	100%
R248Q	15	73,3%
<b>R248W</b>	13	92,3%
R273H	13	92,3%
<b>R282W</b>	8	100%
A161T	5	100%
M237I	5	100%
P152L	5	100%
R158H	5	100%
Y163C	5	100%
S241F	4	100%
<b>T211I</b>	4	75%
Y234C	4	75%
C141Y	3	66,7%

15. táblázat: A gliális agydaganatok 15 leggyakoribb TP53 mutációjának IHC státusza

\*(Összes IHC eset/pozitív IHC) x100

#### 6. Diszkusszió

#### 6.1 A gliomák előfordulása a Debreceni Egyetem Pathologiai Intézetében

Bár több hazai közlemény is foglalkozik a gliális tumorokkal [25, 96, 97], a magas grádusú gliomák magyarországi előfordulásáról nem állnak rendelkezésre részletes információk. Munkánk egyik célja ezen hiányosság pótlása volt, így a DE KK Pathológiai Intézetében 2007 és 2011 között szövettanilag diagnosztizált magas grádusú gliomákat tekintettük át. A vizsgálat összesen 214 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 II. grádusú gliális daganatok (diffúz asztrocitóma, oligodendroglioma és oligoasztrocitóma) általában a 35 és a 44 éves korosztályra jellemzők és gyakrabban diagnosztizálják őket férfiaknál, mint nőknél [12]. Az intézetünkben diagnosztizált II. grádusú gliomában szenvedő betegek átlagéletkora (39 év) is ezen intervallumba esik, de a nemi arányok kiegyenlítettek voltak 1:1,05. A gliális tumorok előfordulásának helye korrelált az irodalmi adatokkal, tehát a homlok- és halántéklebenyben fordultak elő leggyakrabban a daganatok [19]. A diffúz asztrocitóma általában fiatalabb felnőtteknél alakul ki, magas fokú celluláris differenciációval és lassú növekedéssel jellemezhető [4]. Az intézetünkben diagnosztizált II. grádusú daganatok 40%-át az asztrocitómák képezték, ami nem meglepő, hiszen a gliális eredetű tumorok legnagyobb részét szintén az asztrocita eredetű daganatok alkotják [18]. A II. grádusú diffúz asztrocitómák felnőtteknél gyakoriak az intézetünkben az asztrocitómával diagnosztizált betegek 37,6 év átlagéletkora az irodalmi adatoknak megfelelően a 30-40 év intervallumok közé esett. Az 1:1,3-as férfi és női arány közel kiegyenlített volt enyhe női túlsúllyal, bár egyes közlemények 1,18:1-es férfi dominanciáról számolnak be [20]. A tumorok leggyakrabban a homlok- és halántéklebenyben fordulnak elő, a szövettanilag diagnosztizált asztrocitómák lokalizációja is ezt a tendenciát követte, ugyanis a daganatok több, mint fele a homloklebeny, negyedük pedig a halántéklebenyben lokalizálódott. Ezenkívül az agytörzsben is előfordulhatnak a daganatok, viszont a kisagyban kevésbé gyakoriak [21].

A diagnosztizált daganatok valamivel több, mint egyharmadát az oligodendrogliális tumorok alkották. Az alacsony grádusú oligodendrogliomák fiatalabb pácienseknél fordulnak elő, a diagnosztizált betegek átlagéletkora is viszonylag fiatal, 34,8 év volt [21, 28]. Férfiak esetében kétszer gyakoribb a daganat, amit a feldolgozott esetekben megfigyelt nemi arány is jól szemléltet [29]. A daganatok több mint 50%-a a homloklebenyben lokalizálódik, amit a halántéklebeny követ, ezzel szemben a fali és a nyakszirti lebenyben ritkábban fordulnak elő [29, 30]. A diagnosztizált daganatok esetében is ez a megoszlás volt megfigyelhető.

Az oligoasztrocitómák esetében tapasztalt 45,5 éves átlagéletkor megfelel az irodalomban leírt a 35. és 45. év közötti intervallumnak [4]. Az oligoasztrocitóma ritkán előfordulhat fiatal életkorban is [29]. Az áttekintett esetekben az oligoasztrocitómák 8%-át tíz év alatti gyermekeknél diagnosztizálták. A nemi arányok egyes publikációk szerint közel kiegyenlítettek, viszont a megvizsgált 37 oligoasztrocitómák között 1:1,6 női dominancia volt megfigyelhető [37]. Az oligoasztrocitómák is leggyakrabban a homlok- és a halántéklebenyben alakulnak ki, az Intézetünkben is ez az arány mutatkozott [2, 29]. A daganatok nyakszirti lebenyben való előfordulását is leírták [38], munkánk során három beteg esetében tapasztaltuk ezt a lokalizációt. Az egy betegnél a kisagyban diagnosztizált daganat viszont igen ritkának mondható [14].

Anaplasztikus asztrocitómáknál az átlagéletkor 45 év körüli, de egyes közlemények – a Debrecenben diagnosztizált esetekhez hasonlóan – valamennyivel magasabb átlagéletkorról számolnak be. A férfi/nő arány 1,6:1, ami közel azonos a tapasztalt 1,7:1-es aránnyal [3]. Anaplasztikus oligodendrogliomák a magas grádusú gliomák kevesebb, mint 10%-át alkotják, így az intézetben tapasztalt kb. 4%-os előfordulása átlagosnak számít [1]. Általában fiatalabb életkorban, 45 és 50 év között manifesztálódnak [29]. A vizsgált páciensek átlagéletkora (45,8 év) ezen értékek közé esnek. A megállapított 1,6:1-es férfi túlsúly némiképp eltér az irodalmi adatoktól, ami feltételezhetően a mindössze nyolc esetnek tudható be. Vizsgálatunk során is mindössze öt esetben tapasztaltunk anaplasztikus oligoasztrocitómát, ami a III. grádusú gliomák 16%-át, és az összes magas grádusú glioma 2,3%-át teszi ki. Az irodalmi adatok alapján a betegek átlagéletkora körülbelül 44 év, míg a Debrecenben leírt esetekben ez 49,5 év volt. Az eltérés feltehetően a kevés esetszámnak és a daganatok nehéz diagnózisának köszönhető. Nem tudtuk összehasonlítani a nemi arányokat más adatokkal, mivel mind az öt esetben férfi betegnél diagnosztizálták a tumort.

A magas grádusú gliomák 60-70%-át IV. grádusú glioblasztóma alkotja, ami az áttekintett magas grádusú daganatok közel 85%-át teszi ki. A betegek átlagéletkora 58 év. A fiatalabb életkorú betegek hosszabb túlélésre számíthatnak, sőt egy tanulmány szerint a 16 év alatti glioblasztómás betegek még jobb prognózissal rendelkeznek [32]. A közel kiegyenlített férfi és nő arány viszont némileg ellentmond az irodalmi adatoknak, amely alapján a GBM 40%-kal gyakoribb férfiakban [1]. A GBM bármely életkorban manifesztálódhat, viszont

leginkább a 45 és a 70-75 éves korosztály között gyakori [3, 33]. Eredményünk összhangban áll ezekkel az adatokkal, de még a 75, és a 80 éves korosztály között is viszonylag nagy számban fordult elő a tumor.

A GBM klinikai és genetikai karakterétől függően két – szövettanilag egymástól elkülöníthetetlen – altípusáról az IDH vad típusú és IDH mutáns glioblasztómáról beszélhetünk. A tumorok jelentős részét (86%) az IDH vad típusú, 14%-át pedig az IDH mutáns glioblasztómák alkották. A betegek átlagéletkora némileg fiatalabb volt összehasonlítva más tanulmányokban leírt adatokkal [98], de a diagnosztizált IDH mutáns GBM betegek átlag három évvel fiatalabbak voltak (59 év) az IDH vad típusú GBM betegekkel (62,7 év) szemben. Az összesen 77 GBM eset több mint felében a homlok lebenyben volt érintett, amit a halántéklebeny, a fali lebeny és a nyakszirti lebeny követett, egy esetben pedig a kisagyban írták le a tumort. Simpson és munkatársai (1993) 645 GBM eset tanulmányozása során is hasonló eloszlásokat tapasztaltak [99]. A kisagyi glioblasztóma kevésbé gyakori felnőtteknél, az összes GBM eset mindössze 0,24 – 1%-át alkotja, ritka előfordulása miatt a patogenezise és prognózisa kevésbé tisztázott. Egy 2012-ben publikált, 27 éves kisagyi glioblasztómával diagnosztizált női beteg esetismertetése alapján, az ilyen lokalizációjú GBM-nél jobb prognózisra lehet számítani, mivel a páciensnél három évvel a műtét után sincs nyoma a tumor kiújulásának [33]. A primer és szekunder GBM, valamint ritka variánsainak az agy különböző területeiben való megoszlását az 8. ábra mutatja be.

A glioszarkóma bifázisos szöveti megjelenését váltakozó gliális és mesenchimális differenciáció jellemzi. Irodalmi adatok szerint az összes GBM 2-8%-át alkotják [100], így a megfigyelt 4,4%-os eloszlás is ezen értékek közé esik. A betegek életkorát tekintve egy tanulmány 52,1 éves átlagéletkorról számol be, ami közel azonos a tapasztalt 52,4 átlagéletkorral. A glioszarkóma ritkán fiatalabb életkorban is manifesztálódhat [100], az intézetben diagnosztizált legfiatalabb páciens 13 éves volt. A nemi arányok kiegyenlítettek, de egyes publikációk 1,8:1 férfi dominanciáról számolnak be [101]. A glioszarkóma mind a négy agylebenyben előfordulhat, de a homloklebenyben a leggyakoribb, amit a halántéklebeny követ. A rendelkezésre álló adatok szerint fele-fele arányban a homlok- és a halántéklebenyben fordult elő a tumor. A glioblasztómához képest szövettani és genetikai különbségeket mutató óriás sejtes glioblasztóma a GBM esetek 5%-át kitevő variáns [102, 103], ami közel azonos arányt mutat a tapasztalt 4,4%-os megoszlással. A nemi arányok közel azonosak. A tapasztalt 57,9 éves átlagéletkor viszonylag magasnak mondható, az eltérés a rendelkezésre álló kevés eset miatt lehetséges (8 eset). Az Intézetünkben óriás sejtes glioblasztómával diagnosztizált

legfiatalabb páciens 30,2 éves volt. A tumorok anatómiai lokalizációját tekintve eltérő adatokat találtunk az irodalomban. A leggyakoribb lokalizáció a homlok- és a halántéklebeny (7 és 1 eset), míg a többi lebenyben nem fordult elő tumor. Több publikáció is leírta már a daganatokat a fali és nyakszirti lebenyben is, viszonylag arányosan oszlottak el a különböző agylebenyek között [104].

#### 6.2 A PARP1 bioinformatikai és immunhisztokémiai vizsgálata gliomákban

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. A PARP1 DNS hibajavító fehérje inhibíciója új és ígéretes terápiás célpontot képvisel a glioblasztómában. Annak ellenére, hogy a 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 [75, 76, 78], illetve overexpressziója több daganat típusban is gyakori [79, 105], beleértve a glioblasztómát [106]. A megnövekedett PARP1 expressziót leírták már gyermekkori magas grádusú asztrocitómákban, medulloblasztómában és ependimómában [83, 105]. GBM őssejtekben a PARP inhibitorok és TMZ kombinációja értékes stratégiát képviselhet az őssejtek kemo-rezisztenciájának visszafordításában. Tentori és munkatársai (2014) azt találták, hogy a PARP inhibitor és TMZ egyidejű alkalmazása egymást erősítő, antitumor hatású tízből nyolc glioblasztóma őssejtvonalban [107]. 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 hátterében 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 [74, 108].

A GBM komplex, heterogén természete miatt lényeges a *PARP1* asszociációkat vizsgálni kulcs molekuláris markerekkel [19, 30, 109, 110]. Az *ATRX, IDH1* és *TP53* mutációk fontossága az asztrocitás glióma korai fejlődésében és progressziójában jól ismert [110].

Ezeknek a markereknek szintén terápiás és prognosztikai jelentőségük van, emellett mutációs státuszuk alapján elkülöníthetők az asztrocitómák az oligodenrogliómáktól, illetve a szekunder glioblasztóma a primertől [30]. 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 előidézi a betegből származó primer glióma sejtek és genetikailag összeillő tumor xenograftok PARP inhibitor érzékenységét [111].

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 [19]. A *TP53* mutációk fontos szerepet játszanak a gliómákban, különösen az alacsony grádusú asztrocitómák és *IDH1* mutált GBM tumorgenezisében. Figyelembe véve a PARP1 enzim gátlásának dózis függését [112], 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 [52, 113]. Galia és munkatársai (2012) leírták, hogy a PARP1 IHC expresszió megfigyelhető volt az általuk vizsgált 27 GBM minta többségében, összehasonlítva nem tumoros agyterületekkel [106], viszont a PARP1 kapcsolatát a molekuláris markerekkel ezidáig nem vizsgálták. A munkánk során a PARP1 expresszió kapcsolatát három - (p53, ATRX és IDH1<sup>R132H</sup>) a jelenlegi neuropatológiai diagnózis részét képező – molekuláris markerrel is megvizsgáltuk [4]. Az IDH1 mutációk megállapítására a gliomában leggyakoribb (>85%) IDH1<sup>R132H</sup> mutáció-specifikus antitestet használnak [114, 115]. Az ATRX gén a normál agyban kifejeződik, de a bekövetkező mutációk egy csonka, immunhisztokémiával nem detektálható terméket eredményeznek [93]. A TP53 mutációs státuszának IHC predikciója jóval összetettebb [116], 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 [50]. Ezekből az összefüggésekből kiindulva azt gondoljuk, 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 [116]. 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 [116]. 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 [117, 118]. Több tanulmány is azt mutatja, hogy a genom instabilitás általában összefügg a rossz prognózissal [119, 120]. Korábban már leírták, hogy a magas PARP1 expresszió gyakran áll kapcsolatban a rövidebb túléléssel a daganatokban [82]. 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 [121]. A p53 jelátviteli út több celluláris folyamatot mediál, köztük a növekedés leállítását, angiogenezist, apoptózist és a DNS javítását [120].

Egyes vélemények szerint, a GBM progressziója és kiújulása a p53 útvonal abnormalitásaihoz köthető a primer GBM-ek 87%-ában [46]. 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 abnormális p53 szignalizációját eredményezik [46].

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 [44, 122, 123]. 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 [124].

# 6.3 TP53 mutációk IHC karakterizálás agydaganatokban és más tumortípusokban

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 álnegatív 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 [58, 125].

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 mintázatáról, 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 [58, 125].

Normál körülmények között a p53 szintézise és degradációja szigorúan szabályozott, expressziós szintje nagyon alacsony [126]. Az aberráns p53 hosszabb féléletideje egy túltermelődő fehérjét eredményez, amely immunhisztokémiailag detektálható [127]. 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

63

helyen. Ellentétben áll más tumor-szuppresszor génekkel, ahol többnyire deléciók és nonszensz mutációk következtében a fehérje expressziója csökkent vagy hiányzik [60].

A legtöbb *TP53* mutáció túlnyomóan a DNS kötő doménben (94-292 oldallánc) alakul ki [58], 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 [128, 129]. Ahogyan azt a *13. táblázat* mutatja 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 [66], melyek IHC pozitivitást mutatnak. A *TP53* intronjaiban kialakuló pontmutációk megszüntethetik a p53 funkcióit [130]. Megfigyeléseink megerősítik a korábbi közleményeket, 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 [58] 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. Az átíródó fehérje elég stabil és nem degradálódott [131]. 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 a p53 IHC jelölődése a nonszensze *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 [43, 47, 132, 133]. Az IHC negatív *TP53* mutációval rendelkező nők (a képződött csonka p53 következményeként) fiatalabbak voltak. A *TP53* mutációk osztályozása szerinti *B csoportban* korban korábban diagnosztizálták a mell és húgyhólyag

tumorokat, és érdekes módon a hematopoietikus rendszer daganatait csak idősebb korban diagnosztizálták az A és C csoporthoz képest. Az R213\* és a Q192\* gyakorisága szintén növekedett a melldaganatokban, csak úgy, mint az R306\* és a Q192\* mutációk a húgyhólyag daganat esetében. A *TP53* R213\* mutációja sokkal gyakoribb a mellrák bazális altípusban [128]. Vastagbélrákban az R196\*, R213\* és az R306\* mutációk voltak elterjedtek. 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 [129, 134, 135]. Nadkarni és munkatársai (2013) leírták, hogy a TP53 hiány előreláthatólag kiújuló tumorokkal jár együtt. Munkájuk felveti, hogy a káros módosulatok fokozott és korábbi kiújulások kockázatát jelentik [136]. Azontúl, nonszensz mutációs tumorok (B csoport) nagyobb valószínűséggel képeznek áttéteket, összehasonlítva azokkal a daganatokkal, melyek misszensz mutációt hordoznak (A és C csoport), vagy vad típusú p53-at [137]. A nonszensz TP53 gént hordotó betegekben fokozott kockázattal alakulhatnak ki vaszkuláris daganatok [136]. A TP53 mutációk hatásai és jelentőségük Muller és Vousden (2013) összefoglaló tanulmányában megtalálhatók. A vártnak 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 (13. táblázat). 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 [138]. Floquet és munkatársai (2010) leírták, hogy 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 [139, 140].

Egyelőre nincs egyértelmű vélemény arról, hogy mely antitest a legmegfelelőbb a mutáns p53 kimutatására [134]. A rutin diagnosztikában leggyakrabban alkalmazott p53 antitestek (CM1, Pab1801, DO1 és DO7) például nem tesznek különbséget a mutáns és a vad típusú fehérjék között [59, 141]. 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) [36, 142, 143]. Fontos megemlíteni, hogy a DO7 antitest csak a 9-10 exonokban lévő megrövidült mutációkat tudja biztosan detektálni [134]. A p53 IHC további limitációja, hogy abnormális p53 expressziót nem csak a *TP53* mutáció, hanem a zavart szenvedett p53 útvonal is eredményezhet [53]. Az *MDM2* vagy az *MDM4* amplifikációja, vagy a p14<sup>ARF</sup> promóterük metilációja is okozhat a csökkent p53 kifejeződést, ami korlátozza az IHC kimutatás érzékenységét, és álnegatív eredményt okozhat [144, 145].

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. Nenutil és munkatársai (2005) nyolc antitestből álló panelt alkalmaztak, melyek a p53 stabilizálásával és transzkripciós aktivációjával álltak kapcsolatban: anti-p53 (DO1; Bp53-10 és Pab1801; Ser15; Ser392), anti-Ki67 (MIB1), anti-MDM2 (2A9) and anti-p21 (118) [146]. Megállapították, hogy I) overexpresszált p53 MDM2 expresszió nélkül a p53 fehérjét stabilizáló inaktiváló 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 [146]. Ennek ellenére sincsenek olyan új tanulmányok, melyek megerősíthetnék ezeket a megállapításokat. Wertz és munkatársai (1996) leírták, hogy a DO1 és DO7 antitestek koktélja 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 transzkripciós 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 [147]. Köbel és munkatársai (2016) DO7, DO1 és E26 p53 antitesteket használtak és a TP53-on jelölt amplikon újgenerációs szekvenálást végeztek magas grádusú súlyos petefészek karcinómákon és méhnyakrák karcinómákon [148]. Az 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 Cole

*és munkatársai* (2016) 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 [149].

Az elvégzett 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* mRNS expresszió közötti vizsgálattal (*25/A. ábra*). Eredményeink igazolják mRNS 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 deléció 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 hematopoietikus 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.

67

## 7. Összefoglalás

A kezelések fejlesztését célzó törekvések ellenére a gliomák még mindig nagyfokú rezisztenciát mutat a jelenleg alkalmazott terápiákkal szemben. A betegek kilátásának javítása érdekében új diagnosztikus megközelítés és effektív terápia kidolgozása szükségesek. 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, IDH1<sup>R132H</sup>, és p53 markerek immunhisztokémiai jelölését is elvégeztük. Eredményeink alapján a PARP1 kópiaszám nyerés és emelkedett mRNS expresszió jellemezte a magas grádusú asztrocitómákat, valamint a Proneurális ás Klasszikus GBM alcsoportokat is. Továbbá, magas PARP1 expressziót mutató betegeknél rövidebb teljes túlélést (p<0.006) figyeltünk meg a Klasszikus alcsoportban. Továbbá 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 expressziója 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). Következtetésképpen, 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, emellett prognosztikus és terápiás relevanciával bír. A p53 fehérje IHC kimutatását gyakran használják a mutációs státusz meghatározására, mivel a *TP53* gén eltérései a p53 fehérje akkummulációját idézik elő a tumorsejtekben. Annak ellenére, hogy ez a korreláció vitatott, a p53 overexpresszió immunhisztokémiai detektálása régóta helyettesíti

a mutáció analízt 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 hematopoietikus rendszerben és a fej-nyaki daganatokban. Az álnegatív IHC-t eredményező mutációk egyes tumortípusokban szintén gyakrabban fordultak elő.

#### 8. Summary

Despite extensive efforts to improve treatment, GBM is still resistant to current postoperative therapies making GBM a compelling field of cancer research. Improving the outcome requires novel diagnostic approaches and effective treatment strategies. In the early stage of the research, we analysed the histologically diagnosed glioma cases between 2007 and 2011 at our university. We investigated the characteristics of 341 gliomas including tumour grades, gender, age, and the anatomical localization.

Although PARP1 inhibition is a promising therapeutic target in this tumour, no comprehensive study has addressed *PARP1*'s expression characteristics and prognostic role regarding molecular heterogeneity in astrocytomas including GBM. Our aim was to evaluate *PARP1*'s associations with survival, WHO grade, lineage specific markers, and GBM transcriptomic subtypes. We collected genomic and clinical data from the latest glioma datasets of TCGA and performed PARP1, ATRX, IDH1<sup>R132H</sup>, and p53 IHC on GBM tissue samples. We demonstrated that *PARP1* gain and increased mRNA expression are characteristics of high-grade astrocytomas, particularly of *Proneural* and *Classical* GBM subtypes. Additionally, higher *PARP1* levels exhibited an inverse correlation with patient survival (p<0,006) in the *Classical* subgroup. *ATRX* (p=0,006), and *TP53* (p=0,015) mutations were associated with increased PARP1 expression and PARP1 protein level correlated with ATRX loss and p53 overexpression. Furthermore, higher *PARP1* expression together with wildtype *TP53* indicated shorter survival (p=0,039). Therefore, due to subtype specificity, *PARP1* expression level and *TP53* mutation status are reliable marker candidates to distinguish *Classical* and *Proneural* subtypes, with prognostic and therapeutic implications in GBM.

Identification of p53 mutations is important in the neuropathological diagnosis, together with ATRX it helps the discrimination of astrocytomas from oligodendrogliomas and has prognostic and therapeutic relevance. The IHC detection of p53 protein is often used for the prediction of its mutation status, because TP53 alterations can result in p53 accumulation in the nuclei of tumour cells. Despite controversy on the correlation between p53 accumulation and TP53 mutational status, immunohistochemical detection of overexpressed protein has long been used as a surrogate method for mutation analysis in the routine histopathological diagnostic practice. The aim of our work was to characterise the IHC expression features of TP53 somatic mutations and define their occurrence in human cancers. A large-scale database analysis was conducted in the IARC TP53 Database (R17). TP53 mutations were divided into three IHC (A, B & C) groups by the mutation frequency and IHC positivity. Among the IHC groups, significant correlations were observed with age at diagnosis in breast, bladder, liver, haematopoietic system and head & neck cancers. An increased likelihood of false negative IHC associated with rare nonsense mutations was observed in certain tumour sites. Our study demonstrates that p53 immunopositivity largely correlates with TP53 mutational status but that expression is absent in certain mutation types.

# 9. Új tudományos eredmények

- А fokozott PARP1 kifejeződés szerepet játszhat a tumorok malignus mRNS expressziója transzformációjában, emelkedett а 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.

# 10. Tárgyszavak

## Magyarul:

Glioma, Glioblasztóma, PARP1, TP53, DNS hibajavítás, Bioinformatika, Immunhisztokémia, TCGA, IARC

## Angolul:

Glioma, Glioblastoma, PARP1, TP53, DNS repair, Bioinformatics, Immunohistochemistry, TCGA, IARC
# 11. Irodalomjegyzék

- 1. Jiang Y, Uhrbom L. On the origin of glioma. Ups J Med Sci. 2012; 117: 113–21.
- Giese A, Westphal M. Glioma invasion in the central nervous system. Neurosurgery. 1996; 39: 235–52.
- 3. Masui K, Cloughesy T, Mischel P. Molecular pathology in adult high-grade gliomas: from molecular diagnostics to target therapies. Neuropathol Appl Neurobiol. 2012; 38: 271–91.
- Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ohgaki H, Wiestler OD, Kleihues P, Ellison DW. The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: A summary. Acta Neuropathol (Berl). 2016; 131: 803–20.
- 5. Cavaliere R, Lopes MBS, Schiff D. Low-grade gliomas: an update on pathology and therapy. Lancet Neurol. 2005; 4: 760–70.
- Stupp R, Mason WP, Van Den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. N Engl J Med. 2005; 352: 987–96.
- Murnyák B, Csonka T, Klekner Á, Hortobágyi T. Alacsony grádusú glialis daganatok előfordulása és molekuláris patológiája. Ideggyógy Szle. 2013; 66: 305–11.
- 8. Ricard D, Idbaih A, Ducray F, Lahutte M, Hoang-Xuan K, Delattre J-Y. Primary brain tumours in adults. The Lancet. 2012; 379: 1984–96.
- Pouratian N, Schiff D. Management of low-grade glioma. Curr Neurol Neurosci Rep. 2010; 10: 224–31.
- 10. Grier JT, Batchelor T. Low-grade gliomas in adults. The Oncologist. 2006; 11: 681–93.
- 11. Wen PY, Kesari S. Malignant gliomas in adults. N Engl J Med. 2008; 359: 492–507.
- Paleologos NA, Merrell RT. Anaplastic glioma. Curr Treat Options Neurol. 2012; 14: 381–90.
- 13. Olar A, Prabhu SS. Molecular classification of diffuse gliomas. Oncology. 2013; 27: 514.

- Maher EA, Furnari FB, Bachoo RM, Rowitch DH, Louis DN, Cavenee WK, DePinho RA. Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. Genes Dev. 2001; 15: 1311– 33.
- Nupponen NN, Joensuu H. Molecular pathology of gliomas. Curr Diagn Pathol. 2006; 12: 394–402.
- Ohgaki H, Kleihues P. Genetic profile of astrocytic and oligodendroglial gliomas. Brain Tumor Pathol. 2011; 28: 177–83.
- Riemenschneider MJ, Reifenberger G. Molecular neuropathology of gliomas. Int J Mol Sci. 2009; 10: 184–212.
- Suzuki K, Matsubara H. Recent advances in p53 research and cancer treatment. BioMed Res Int. 2011; 2011.
- Jiao Y, Killela PJ, Reitman ZJ, Rasheed BA, Heaphy CM, de Wilde RF, Rodriguez FJ, Rosemberg S, Obashinjo SM, Marie SKN. Frequent ATRX, CIC, FUBP1 and IDH1 mutations refine the classification of malignant gliomas. Oncotarget. 2012; 3: 709–22.
- Brennan C, Momota H, Hambardzumyan D, Ozawa T, Tandon A, Pedraza A, Holland E. Glioblastoma subclasses can be defined by activity among signal transduction pathways and associated genomic alterations. PloS One. 2009; 4: e7752.
- 21. Nakada M, Kita D, Watanabe T, Hayashi Y, Teng L, Pyko IV, Hamada J-I. Aberrant signaling pathways in glioma. Cancers. 2011; 3: 3242–78.
- 22. Walker DG, Kaye AH. Diagnosis and management of astrocytomas, oligodendrogliomas and mixed gliomas: a review. Australas Radiol. 2001; 45: 472–82.
- Sarkar C, Jain A, Suri V. Current concepts in the pathology and genetics of gliomas. Indian J Cancer. 2009; 46: 108.
- Ichimura K. Molecular pathogenesis of IDH mutations in gliomas. Brain Tumor Pathol. 2012; 29: 131–9.

- Klekner A, Fekete G, Rencsi M, Méhes G, Szabó P, Bognár L. The clinical relevance of 1p19q codeletion of oligodendrogliomas at the Department of Neurosurgery in Debrecen. Ideggyogyaszati Szle. 2012; 65: 17–24.
- Bettegowda C, Agrawal N, Jiao Y, Sausen M, Wood LD, Hruban RH, Rodriguez FJ, Cahill DP, McLendon R, Riggins G. Mutations in CIC and FUBP1 contribute to human oligodendroglioma. Science. 2011; 333: 1453–5.
- Sahm F, Koelsche C, Meyer J, Pusch S, Lindenberg K, Mueller W, Herold-Mende C, von Deimling A, Hartmann C. CIC and FUBP1 mutations in oligodendrogliomas, oligoastrocytomas and astrocytomas. Acta Neuropathol (Berl). 2012; 123: 853–60.
- Ohgaki H, Kleihues P. Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. Cancer Sci. 2009; 100: 2235–41.
- 29. Koeller KK, Rushing EJ. Oligodendroglioma and Its Variants: Radiologic-Pathologic Correlation 1. Radiographics. 2005; 25: 1669–88.
- 30. Takano S, Ishikawa E, Sakamoto N, Matsuda M, Akutsu H, Noguchi M, Kato Y, Yamamoto T, Matsumura A. Immunohistochemistry on IDH 1/2, ATRX, p53 and Ki-67 substitute molecular genetic testing and predict patient prognosis in grade III adult diffuse gliomas. Brain Tumor Pathol. 2016; 33: 107–16.
- 31. Martínez R. Beyond genetics in glioma pathways: the ever-increasing crosstalk between epigenomic and genomic events. J Signal Transduct. 2012; 2012.
- Lövey J, Fedorcsák I, Bajcsay A, Sipos L, Mangel L, Kásler M, Bagó A. Glioblastoma multiforme posztoperatív radio-kemoterápiájának eredményei. Magy Onkol. 2013; 57: 232–9.
- Burton EC, Lamborn KR, Feuerstein BG, Prados M, Scott J, Forsyth P, Passe S, Jenkins RB, Aldape KD. Genetic aberrations defined by comparative genomic hybridization distinguish long-term from typical survivors of glioblastoma. Cancer Res. 2002; 62: 6205–10.

- Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Di Patre P-L, Burkhard C, Schüler D, Probst-Hensch NM, Maiorka PC. Genetic pathways to glioblastoma A population-based study. Cancer Res. 2004; 64: 6892–9.
- 35. Gömöri É, Pál J, Kovács B, Dóczi T. Concurrent hypermethylation of DNMT1, MGMT and EGFR genes in progression of gliomas. Diagn Pathol. 2012; 7: 8.
- 36. Danks MK, Whipple DO, McPake CR, Lu D, Harris LC. Differences in epitope accessibility of p53 monoclonal antibodies suggest at least three conformations or states of protein binding of p53 protein in human tumor cell lines. Cell Death Differ. 1998; 5.
- Argyriou AA, Kalofonos HP. Molecularly targeted therapies for malignant gliomas. Mol Med. 2009; 15.
- 38. Sipayya V, Sharma I, Sharma K, Singh A. Immunohistochemical expression of IDH1 in gliomas: A tissue microarray-based approach. J Cancer Res Ther. 2012; 8: 598.
- 39. Brennan C. Genomic profiles of glioma. Curr Neurol Neurosci Rep. 2011; 11: 291-7.
- 40. Chen J, McKay RM, Parada LF. Malignant glioma: lessons from genomics, mouse models, and stem cells. Cell. 2012; 149: 36–47.
- 41. Murnyák B, Csonka T, Hegyi K, Méhes G, Klekner Á, Hortobágyi T. Magas grádusú gliomák előfordulása és molekuláris patológiája. Ideggyógy Szle. 2013; 66: 312–21.
- 42. Suvà ML, Louis DN. Next-generation molecular genetics of brain tumours. Curr Opin Neurol. 2013; 26: 681–7.
- 43. Murnyák B, Csonka T, Hortobágyi T. A meningeomák molekuláris patológiája. Ideggyógy Szle. 2015; 68: 292–300. doi: 10.18071/isz.68.0292.
- 44. Parker NR, Khong P, Parkinson JF, Howell VM, Wheeler HR. Molecular heterogeneity in glioblastoma: potential clinical implications. Front Oncol. 2015; 5: 55.
- Murnyák B, Bognár L, Klekner Á, Hortobágyi T. Epigenetics of Meningiomas. Biomed Res Int. 2015; 2015: 1–6. doi: 10.1155/2015/532451.

- McLendon R, Friedman A, Bigner D, Van Meir EG, Brat DJ, Mastrogianakis GM, Olson JJ, Mikkelsen T, Lehman N, Aldape K. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. Nature. 2008; 455: 1061–8.
- Murnyák B, Szepesi RA, Hortobágyi T. A központi idegrendszert érintő családi daganatszindrómák molekuláris háttere. Orv Hetil. 2015; 156: 171–7. doi: 10.1556/OH.2015.30092.
- 48. Osuka S, Van Meir EG. Overcoming therapeutic resistance in glioblastoma: the way forward. J Clin Invest. 2017; 127: 415–26.
- Vitucci M, Hayes D, Miller C. Gene expression profiling of gliomas: merging genomic and histopathological classification for personalised therapy. Br J Cancer. 2011; 104: 545– 53.
- 50. Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, Miller CR, Ding L, Golub T, Mesirov JP. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. Cancer Cell. 2010; 17: 98–110.
- 51. Wiestler B, Capper D, Holland-Letz T, Korshunov A, von Deimling A, Pfister SM, Platten M, Weller M, Wick W. ATRX loss refines the classification of anaplastic gliomas and identifies a subgroup of IDH mutant astrocytic tumors with better prognosis. Acta Neuropathol (Berl). 2013; 126: 443–51.
- 52. Le Mercier M, Hastir D, Lopez XM, De Neve N, Maris C, Trepant A-L, Rorive S, Decaestecker C, Salmon I. A simplified approach for the molecular classification of glioblastomas. PLoS One. 2012; 7: e45475.
- Tanboon J, Williams EA, Louis DN. The Diagnostic use of immunohistochemical surrogates for signature molecular genetic alterations in gliomas. J Neuropathol Exp Neurol. 2016; 75: 4–18.
- 54. Pollo B. Neuropathological diagnosis of brain tumours. Neurol Sci. 2011; 32: 209–11.
- Dang L, Jin S, Su SM. IDH mutations in glioma and acute myeloid leukemia. Trends Mol Med. 2010; 16: 387–97.

- Nikiforova MN, Hamilton RL. Molecular diagnostics of gliomas. Arch Pathol Lab Med. 2011; 135: 558–68.
- Plun-Favreau H, Lewis PA, Hardy J, Martins LM, Wood NW. Cancer and neurodegeneration: between the devil and the deep blue sea. PLoS Genet. 2010; 6: e1001257.
- Petitjean A, Achatz M, Borresen-Dale A, Hainaut P, Olivier M. TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. Oncogene. 2007; 26: 2157–65.
- 59. Tan E, Cheok C. Bringing p53 into the Clinic. J Cancer Sci Ther. 2014; 6: 363–9.
- Leroy B, Fournier JL, Ishioka C, Monti P, Inga A, Fronza G, Soussi T. The TP53 website: an integrative resource centre for the TP53 mutation database and TP53 mutant analysis. Nucleic Acids Res. 2013; 41: D962–9.
- Schlomm T, Iwers L, Kirstein P, Jessen B, Köllermann J, Minner S, Passow-Drolet A, Mirlacher M, Milde-Langosch K, Graefen M. Clinical significance of p53 alterations in surgically treated prostate cancers. Mod Pathol. 2008; 21: 1371–8.
- Fésüs V, Marosvári D, Kajtár B, Király PA, Demeter J, Gurbity Pálfi T, Egyed M, Plander M, Farkas P, Mátrai Z. A TP53-mutáció-analízis jelentősége krónikus lymphocytás leukaemiában. Orv Hetil. 2017; 158: 220–8.
- Dobes P, Podhorec J, Coufal O, Jureckova A, Petrakova K, Vojtesek B, Hrstka R. Influence of mutation type on prognostic and predictive values of TP53 status in primary breast cancer patients. Oncol Rep. 2014; 32: 1695–702.
- Robles AI, Harris CC. Clinical outcomes and correlates of TP53 mutations and cancer. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2010; 2: a001016.
- Boyd SD. Diagnostic applications of high-throughput DNA sequencing. Annu Rev Pathol Mech Dis. 2013; 8: 381–410.
- 66. Kang HJ, Chun S-M, Kim K-R, Sohn I, Sung CO. Clinical relevance of gain-of-function mutations of p53 in high-grade serous ovarian carcinoma. PloS One. 2013; 8: e72609.

- 67. Temam S, Flahault A, Périé S, Monceaux G, Coulet F, Callard P, Bernaudin J-F, St Guily JL, Fouret P. p53 gene status as a predictor of tumor response to induction chemotherapy of patients with locoregionally advanced squamous cell carcinomas of the head and neck. J Clin Oncol. 2000; 18: 385–385.
- 68. Yemelyanova A, Vang R, Kshirsagar M, Lu D, Marks MA, Shih IM, Kurman RJ. Immunohistochemical staining patterns of p53 can serve as a surrogate marker for TP53 mutations in ovarian carcinoma: an immunohistochemical and nucleotide sequencing analysis. Mod Pathol. 2011; 24: 1248–53.
- 69. Abbotts R, Thompson N, Madhusudan S. DNA repair in cancer: emerging targets for personalized therapy. Breast Cancer Targets Ther. 2014; 2014: 77–92.
- 70. Jeggo PA, Pearl LH, Carr AM. DNA repair, genome stability and cancer: a historical perspective. Nat Rev Cancer. 2015; .
- 71. Drew Y, Plummer R. PARP inhibitors in cancer therapy: two modes of attack on the cancer cell widening the clinical applications. Drug Resist Updat. 2009; 12: 153–6.
- 72. Guo G, Zhang F, Gao R, Delsite R, Feng Z, Powell SN. DNA repair and synthetic lethality. Int J Oral Sci. 2011; 3: 176.
- Erasimus H, Gobin M, Niclou S, Van Dyck E. DNA repair mechanisms and their clinical impact in glioblastoma. Mutat Res Mutat Res. 2016; 769: 19–35.
- 74. Malyuchenko N, Kotova EY, Kulaeva O, Kirpichnikov M, Studitskiy V. PARP1 Inhibitors: antitumor drug design. Acta Naturae. 2015; 7: 27.
- Lacza Z, Horváth EM, Komjáti K, Hortobágyi T, Szabó C, Busija DW. PARP inhibition improves the effectiveness of neural stem cell transplantation in experimental brain trauma. Int J Mol Med. 2003; 12: 153–9.
- 76. Sairanen T, Szepesi R, Karjalainen-Lindsberg M-L, Saksi J, Paetau A, Lindsberg PJ. Neuronal caspase-3 and PARP-1 correlate differentially with apoptosis and necrosis in ischemic human stroke. Acta Neuropathol (Berl). 2009; 118: 541–52.

- 77. Hagberg H, Wilson MA, Matsushita H, Zhu C, Lange M, Gustavsson M, Poitras MF, Dawson TM, Dawson VL, Northington F. PARP-1 gene disruption in mice preferentially protects males from perinatal brain injury. J Neurochem. 2004; 90: 1068–75.
- 78. Hortobágyi T, Görlach C, Benyo Z, Lacza Z, Hortobágyi S, Wahl M, Harkany T. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase-mediated activation of poly (ADP-ribose) polymerase in traumatic brain injury: neuroprotection by 3-aminobenzamide. Neuroscience. 2003; 121: 983–90.
- 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. 2016; 54: 114–26.
- 80. Ito S, Murphy CG, Doubrovina E, Jasin M, Moynahan ME. PARP Inhibitors in Clinical Use Induce Genomic Instability in Normal Human Cells. PloS One. 2016; 11: e0159341.
- Nile DL, Rae C, Hyndman IJ, Gaze MN, Mairs RJ. An evaluation in vitro of PARP-1 inhibitors, rucaparib and olaparib, as radiosensitisers for the treatment of neuroblastoma. BMC Cancer. 2016; 16: 621.
- 82. Domagala P, Huzarski T, Lubinski J, Gugala K, Domagala W. PARP-1 expression in breast cancer including BRCA1-associated, triple negative and basal-like tumors: possible implications for PARP-1 inhibitor therapy. Breast Cancer Res Treat. 2011; 127: 861–9.
- Van Vuurden DG, Hulleman E, Meijer OL, Wedekind LE, Kool M, Witt H, Vandertop WP, Würdinger T, Noske DP, Kaspers GJ. PARP inhibition sensitizes childhood high grade glioma, medulloblastoma and ependymoma to radiation. Oncotarget. 2011; 2: 984–96.
- 84. Venere M, Hamerlik P, Wu Q, Rasmussen R, Song L, Vasanji A, Tenley N, Flavahan W, Hjelmeland A, Bartek J. Therapeutic targeting of constitutive PARP activation compromises stem cell phenotype and survival of glioblastoma-initiating cells. Cell Death Differ. 2014; 21: 258–69.
- Kase M, Vardja M, Lipping A, Asser T, Jaal J. Impact of PARP-1 and DNA-PK expression on survival in patients with glioblastoma multiforme. Radiother Oncol. 2011; 101: 127–31.

- Beck C, Robert I, Reina-San-Martin B, Schreiber V, Dantzer F. Poly (ADP-ribose) polymerases in double-strand break repair: focus on PARP1, PARP2 and PARP3. Exp Cell Res. 2014; 329: 18–25.
- Muñoz-Gámez JA, Martín-Oliva D, Aguilar-Quesada R, Cañuelo A, Nuñez MI, Valenzuela MT, de Almodovar JR, de MURCIA G, Oliver FJ. PARP inhibition sensitizes p53-deficient breast cancer cells to doxorubicin-induced apoptosis. Biochem J. 2005; 386: 119–25.
- Conde C, Mark M, Oliver FJ, Huber A, de Murcia G, Ménissier-de Murcia J. Loss of poly (ADP-ribose) polymerase-1 causes increased tumour latency in p53-deficient mice. EMBO J. 2001; 20: 3535–43.
- Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, Jacobsen A, Byrne CJ, Heuer ML, Larsson E. The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. Cancer Discov. 2012; 2: 401–4.
- 90. Diaz AK, Baker SJ. The genetic signatures of pediatric high-grade glioma: no longer a one-act play. Elsevier; 2014. p. 240–7.
- Schwartzentruber J, Korshunov A, Liu X-Y, Jones DT, Pfaff E, Jacob K, Sturm D, Fontebasso AM, Quang D-AK, Tönjes M. Driver mutations in histone H3. 3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma. Nature. 2012; 482: 226–31.
- 92. Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, Sun Y, Jacobsen A, Sinha R, Larsson E. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. Sci Signal. 2013; 6: pl1.
- 93. Ebrahimi A, Skardelly M, Bonzheim I, Ott I, Mühleisen H, Eckert F, Tabatabai G, Schittenhelm J. ATRX immunostaining predicts IDH and H3F3A status in gliomas. Acta Neuropathol Commun. 2016; 4: 60.
- 94. Montojo J, Zuberi K, Rodriguez H, Bader GD, Morris Q. GeneMANIA: Fast gene network construction and function prediction for Cytoscape. F1000Research. 2014; 3.

- 95. 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. 2014; 52: 111–20.
- 96. Virga J, Bognár L, Hortobágyi T, Zahuczky G, Csősz É, Kalló G, Tóth J, Hutóczki G, Reményi-Puskár J, Steiner L. Tumor Grade versus Expression of Invasion-Related Molecules in Astrocytoma. Pathol Oncol Res. 2017; : 1–9.
- 97. Virga J, Bognár L, Hortobágyi T, Zahuczky G, Csősz É, Kalló G, Tóth J, Hutóczki G, Reményi-Puskár J, Steiner L. Prognostic Role of the Expression of Invasion-Related Molecules in Glioblastoma. J Neurol Surg Part Cent Eur Neurosurg. 2017; 78: 12–9.
- Ohgaki H, Kleihues P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. Am J Pathol. 2007; 170: 1445–53.
- 99. Simpson J, Horton J, Scott C, Curran W, Rubin P, Fischbach J, Isaacson S, Rotman M, Asbell S, Nelson J. Influence of location and extent of surgical resection on survival of patients with glioblastoma multiforme: results of three consecutive Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) clinical trials. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 1993; 26: 239–44.
- 100. Okami N, Kawamata T, Kubo O, Yamane F, Kawamura H, Hori T. Infantile gliosarcoma: a case and a review of the literature. Childs Nerv Syst. 2002; 18: 351–5.
- 101. Andaloussi-Saghir K, Oukabli M, El Marjany M, Sifat H, Hadadi K, Mansouri H. Secondary gliosarcoma after the treatment of primary glioblastoma multiforme. North Am J Med Sci. 2011; 3: 527.
- 102. Peraud A, Watanabe K, Schwechheimer K, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Genetic profile of the giant cell glioblastoma. Lab Investig J Tech Methods Pathol. 1999; 79: 123–9.
- 103. Kozak KR, Moody JS. Giant cell glioblastoma: a glioblastoma subtype with distinct epidemiology and superior prognosis. Neuro-Oncol. 2009; 11: 833–41.
- 104. Martinez R, Roggendorf W, Baretton G, Klein R, Toedt G, Lichter P, Schackert G, JoosS. Cytogenetic and molecular genetic analyses of giant cell glioblastoma multiforme

reveal distinct profiles in giant cell and non-giant cell subpopulations. Cancer Genet Cytogenet. 2007; 175: 26–34.

- 105. Barton VN, Donson AM, Kleinschmidt-DeMasters B, Gore L, Liu AK, Foreman NK. PARP1 expression in pediatric central nervous system tumors. Pediatr Blood Cancer. 2009; 53: 1227–30.
- 106. Galia A, Calogero A, Condorelli R, Fraggetta F, La Corte C, Ridolfo F, Bosco P, Castiglione R, Salemi M. PARP-1 protein expression in glioblastoma multiforme. Eur J Histochem EJH. 2012; 56.
- 107. Tentori L, Ricci-Vitiani L, Muzi A, Ciccarone F, Pelacchi F, Calabrese R, Runci D, Pallini R, Caiafa P, Graziani G. Pharmacological inhibition of poly (ADP-ribose) polymerase-1 modulates resistance of human glioblastoma stem cells to temozolomide. BMC Cancer. 2014; 14: 151.
- 108. Ghosh R, Roy S, Kamyab J, Dantzer F, Franco S. Common and unique genetic interactions of the poly (ADP-ribose) polymerases PARP1 and PARP2 with DNA double-strand break repair pathways. DNA Repair. 2016; 45: 56–62.
- Appin CL, Brat DJ. Biomarker-driven diagnosis of diffuse gliomas. Mol Aspects Med. 2015; 45: 87–96.
- 110. Liu X-Y, Gerges N, Korshunov A, Sabha N, Khuong-Quang D-A, Fontebasso AM, Fleming A, Hadjadj D, Schwartzentruber J, Majewski J. Frequent ATRX mutations and loss of expression in adult diffuse astrocytic tumors carrying IDH1/IDH2 and TP53 mutations. Acta Neuropathol (Berl). 2012; 124: 615–25.
- 111. Sulkowski PL, Corso CD, Robinson ND, Scanlon SE, Purshouse KR, Bai H, Liu Y, Sundaram RK, Hegan DC, Fons NR. 2-Hydroxyglutarate produced by neomorphic IDH mutations suppresses homologous recombination and induces PARP inhibitor sensitivity. Sci Transl Med. 2017; 9: eaal2463.
- 112. Haince J-F, McDonald D, Rodrigue A, Déry U, Masson J-Y, Hendzel MJ, Poirier GG. PARP1-dependent kinetics of recruitment of MRE11 and NBS1 proteins to multiple DNA damage sites. J Biol Chem. 2008; 283: 1197–208.

- 113. Ikemura M, Shibahara J, Mukasa A, Takayanagi S, Aihara K, Saito N, Aburatani H, Fukayama M. Utility of ATRX immunohistochemistry in diagnosis of adult diffuse gliomas. Histopathology. 2016
- 114. Kato Y, Jin G, Kuan C-T, McLendon RE, Yan H, Bigner DD. A monoclonal antibody IMab-1 specifically recognizes IDH1 R132H, the most common glioma-derived mutation. Biochem Biophys Res Commun. 2009; 390: 547–51.
- 115. Watanabe T, Vital A, Nobusawa S, Kleihues P, Ohgaki H. Selective acquisition of IDH1 R132C mutations in astrocytomas associated with Li-Fraumeni syndrome. Acta Neuropathol (Berl). 2009; 117: 653–6.
- 116. Murnyák B, Hortobágyi T. Immunohistochemical correlates of TP53 somatic mutations in cancer. Oncotarget. 2016; 7: 64910.
- 117. Valenzuela MT, Guerrero R, Nunez MI, de Almodovar JMR, Sarker M, de Murcia G, Oliver FJ. PARP-1 modifies the effectiveness of p53-mediated DNA damage response. Oncogene. 2002; 21: 1108.
- 118. Wesierska-Gadek J, Ranftler C, Schmid G. Physiological ageing: role of p53 and PARP-1 tumor suppressors in the regulation of terminal senescence. J Physiol Pharmacol. 2005; 56: 77.
- 119. Ichim G, Lopez J, Ahmed SU, Muthalagu N, Giampazolias E, Delgado ME, Haller M, Riley JS, Mason SM, Athineos D. Limited mitochondrial permeabilization causes DNA damage and genomic instability in the absence of cell death. Mol Cell. 2015; 57: 860–72.
- 120. Stracquadanio G, Wang X, Wallace MD, Grawenda AM, Zhang P, Hewitt J, Zeron-Medina J, Castro-Giner F, Tomlinson IP, Goding CR. The importance of p53 pathway genetics in inherited and somatic cancer genomes. Nat Rev Cancer. 2016; 16: 251–65.
- 121. Boersma BJ, Howe TM, Goodman JE, Yfantis HG, Lee DH, Chanock SJ, Ambs S. Association of breast cancer outcome with status of p53 and MDM2 SNP309. J Natl Cancer Inst. 2006; 98: 911–9.
- 122. Harris SL, Levine AJ. The p53 pathway: positive and negative feedback loops. Oncogene.2005; 24: 2899–908.

- 123. Denicolaï E, Tabouret E, Colin C, Metellus P, Nanni I, Boucard C, Tchoghandjian A, Meyronet D, Baeza-Kallee N, Chinot O. Molecular heterogeneity of glioblastomas: does location matter? Oncotarget. 2016; 7: 902.
- 124. Hong R, Ma F, Zhang W, Yu X, Li Q, Luo Y, Zhu C, Jiang W, Xu B. 53BP1 depletion causes PARP inhibitor resistance in ATM-deficient breast cancer cells. BMC Cancer. 2016; 16: 725.
- 125. Bouaoun L, Sonkin D, Ardin M, Hollstein M, Byrnes G, Zavadil J, Olivier M. TP53 Variations in Human Cancers: New Lessons from the IARC TP53 Database and Genomics Data. Hum Mutat. 2016; .
- 126. López I, Oliveira LP, Tucci P, Álvarez-Valín F, Coudry RA, Marín M. Different mutation profiles associated to P53 accumulation in colorectal cancer. Gene. 2012; 499: 81–7.
- 127. Bouchalova P, Nenutil R, Muller P, Hrstka R, Appleyard M, Murray K, Jordan LB, Purdie CA, Quinlan P, Thompson AM. Mutant p53 accumulation in human breast cancer is not an intrinsic property or dependent on structural or functional disruption but is regulated by exogenous stress and receptor status. J Pathol. 2014; 233: 238–46.
- 128. Silwal-Pandit L, Vollan HKM, Chin S-F, Rueda OM, McKinney S, Osako T, Quigley DA, Kristensen VN, Aparicio S, Børresen-Dale A-L. TP53 mutation spectrum in breast cancer is subtype specific and has distinct prognostic relevance. Clin Cancer Res. 2014; 20: 3569–80.
- 129. Vakiani E, Janakiraman M, Shen R, Sinha R, Zeng Z, Shia J, Cercek A, Kemeny N, D'Angelica M, Viale A. Comparative genomic analysis of primary versus metastatic colorectal carcinomas. J Clin Oncol. 2012; 30: 2956–62.
- 130. Bromidge T, Lowe C, Prentice A, Johnson S. p53 intronic point mutation, aberrant splicing and telomeric associations in a case of B-chronic lymphocytic leukaemia. Br J Haematol. 2000; 111: 223–9.
- 131. Holmila R, Fouquet C, Cadranel J, Zalcman G, Soussi T. Splice mutations in the p53 gene: case report and review of the literature. Hum Mutat. 2003; 21: 101–2.

- 132. Evans DGR. Neurofibromatosis 2 [Bilateral acoustic neurofibromatosis, central neurofibromatosis, NF2, neurofibromatosis type II]. Genet Med. 2009; 11: 599–610.
- 133. Bellanné-Chantelot C, Carette C, Riveline J-P, Valéro R, Gautier J-F, Larger E, Reznik Y, Ducluzeau P-H, Sola A, Hartemann-Heurtier A. The type and the position of HNF1A mutation modulate age at diagnosis of diabetes in patients with maturity-onset diabetes of the young (MODY)-3. Diabetes. 2008; 57: 503–8.
- 134. Shahin MS, Hughes JH, Sood AK, Buller RE. The prognostic significance of p53 tumor suppressor gene alterations in ovarian carcinoma. Cancer. 2000; 89: 2006–17.
- 135. Hashimoto T, Tokuchi Y, Hayashi M, Kobayashi Y, Nishida K, Hayashi S, Ishikawa Y, Tsuchiya S, Nakagawa K, Hayashi J. p53 null mutations undetected by immunohistochemical staining predict a poor outcome with early-stage non-small cell lung carcinomas. Cancer Res. 1999; 59: 5572–7.
- 136. Nadkarni NJ, De Geest K, Neff T, De Young B, Bender DP, Ahmed A, Smith BJ, Button A, Goodheart MJ. Microvessel density and p53 mutations in advanced-stage epithelial ovarian cancer. Cancer Lett. 2013; 331: 99–104.
- 137. Sood AK, Sorosky JI, Dolan M, Anderson B, Buller RE. Distant metastases in ovarian cancer: association with p53 mutations. Clin Cancer Res. 1999; 5: 2485–90.
- 138. Zomer-van Ommen D, Vijftigschild L, Kruisselbrink E, Vonk A, Dekkers J, Janssens H, de Winter-de Groot K, van der Ent C, Beekman J. Limited premature termination codon suppression by read-through agents in cystic fibrosis intestinal organoids. J Cyst Fibros. 2016; 15: 158–62.
- 139. Floquet C, Deforges J, Rousset J-P, Bidou L. Rescue of non-sense mutated p53 tumor suppressor gene by aminoglycosides. Nucleic Acids Res. 2011; 39: 3350–62.
- 140. Soussi T, Wiman K. TP53: an oncogene in disguise. Cell Death Differ. 2015; 22: 1239–49.
- 141. Lee SH, Kim H, Kim WY, Han HS, Lim SD, Kim WS, Kim S, Hwang TS. Genetic alteration and immunohistochemical staining patterns of ovarian high-grade serous

adenocarcinoma with special emphasis on p53 immnnostaining pattern. Pathol Int. 2013; 63: 252–9.

- 142. Phang BH, Othman R, Bougeard G, Chia RH, Frebourg T, Tang CL, Cheah PY, Sabapathy K. Amino-terminal p53 mutations lead to expression of apoptosis proficient p47 and prognosticate better survival, but predispose to tumorigenesis. Proc Natl Acad Sci. 2015; 112: E6349–58.
- 143. Christgen M, Noskowicz M, Heil C, Schipper E, Christgen H, Geffers R, Kreipe H, Lehmann U. IPH-926 lobular breast cancer cells harbor a p53 mutant with temperaturesensitive functional activity and allow for profiling of p53-responsive genes. Lab Invest. 2012; 92: 1635–47.
- 144. Manfredi JJ. The Mdm2–p53 relationship evolves: Mdm2 swings both ways as an oncogene and a tumor suppressor. Genes Dev. 2010; 24: 1580–9.
- 145. Theodorescu D. New and promising strategies in the management of bladder cancer. American Society of Clinical Oncology; 2015.
- 146. Nenutil R, Smardova J, Pavlova S, Hanzelkova Z, Muller P, Fabian P, Hrstka R, Janotova P, Radina M, Lane D. Discriminating functional and non-functional p53 in human tumours by p53 and MDM2 immunohistochemistry. J Pathol. 2005; 207: 251–9.
- 147. Wertz IE, Deitch AD, Gumerlock PH, Gandour-Edwards R, Chi S-G, de Vere White RW. Correlation of genetic and immunodetection of TP53 mutations in malignant and benign prostate tissues. Hum Pathol. 1996; 27: 573–80.
- 148. Köbel M, Maria Piskorz A, Lee S, Lui S, LePage C, Marass F, Rosenfeld N, Mes Masson A, Derek Brenton J. Optimized p53 immunohistochemistry is an accurate predictor of TP53 mutation in ovarian carcinoma. J Pathol Clin Res. 2016; .
- 149. Cole AJ, Dwight T, Gill AJ, Dickson K-A, Zhu Y, Clarkson A, Gard GB, Maidens J, Valmadre S, Clifton-Bligh R. Assessing mutant p53 in primary high-grade serous ovarian cancer using immunohistochemistry and massively parallel sequencing. Sci Rep. 2016; 6.

# 12. Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőmnek, **Dr. Hortobágyi Tibor** tanár úrnak, aki tanácsaival és útmutatásával segítette a szakmai fejlődésemet, továbbá munkámat minden körülmények között támogatta.

Hálás köszönet a Neuropathológiai laboratórium munkatársainak, Nagy Katalinnak, Kiss Henriettának és Deák-Pocsai Krisztinának, valamint a Pathologiai Intézet Immunhisztokémiai laborjának vezetőjének, Beke Líviának a kutatásomhoz, valamint jelen dolgozathoz fűzött hasznos tanácsaikat.

Köszönöm a munkámban közreműködő kollégák Kálmán Bernadette, Szepesi Rita, Rotem Hershkovitz, Csonka Tamás, Klekner Álmos, Markó-Varga György és Mahan Kouhsari segítségét is.

Végezetül a legnagyobb köszönettel páromnak, **Sziszkosz Nikolettnek**, fiamnak **Zsombornak**, **szüleimnek** és **testvéremnek** tartozom a lelki támogatásért és a türelmükért.

### 13. 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.

## 14. Publikációs lista

# DEBRECENI EGYETEM Egyetemi és Nemzeti Könyvtár



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

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

#### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

 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

Cím: 4032 Debrecen, Egyetem tér 1. ¤ Postacím: 4010 Debrecen, Pf. 39. ¤ Tel.: (52) 410-443 E-mail: <u>publikaciok@lib.unideb.hu</u> ¤ Honlap: <u>www.lib.unideb.hu</u>



# DEBRECENI EGYETEM Egyetemi és Nemzeti Könyvtár



#### További közlemények

<ol> <li>Bencze, J., Simon, V., Bereczki, E., Majer, R., Varkoly, G., Murnyák, B., Kálmán, J., Hortobágyi, T.: A Lewy-testes 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)</li> </ol>
<ol> <li>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)</li> </ol>
<ol> <li>Hortobágyi, T., Szabó, R., Murnyák, B.: The Theragnostic Relevance of DNA Methylation Analysis in Cancer. <i>Clin. Oncol.</i> 2 (1289), 1-2, 2017.</li> </ol>
<ol> <li>Csonka, T., Murnyák, B., Szepesi, R., Bencze, J., Bognár, L., Klekner, Á., Hortobágyi, T.: Assessment of candidate immunohistochemical prognostic markers of meningioma recurrence. <i>Folia Neuropathol.</i> 54 (2), 114-126, 2016. IF: 1.093</li> </ol>
<ul> <li>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. <i>J. Neurol. Sci. 368</i>, 4-10, 2016. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.jns.2016.06.055 IF: 2.295</li> </ul>
<ol> <li>Murnyák, B., Szepesi, R., Hortobágyi, T.: A központi idegrendszert 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</li> </ol>
<ul> <li>9. Murnyák, B., Csonka, T., Hortobágyi, T.: A meningeomák molekuláris patológiája. <i>Ideggyogy. Szle. 68</i> (9-10), 292-300, 2015. DOI: http://dx.doi.org/10.18071/isz.68.0292</li> <li>IF: 0.376</li> </ul>

Cím: 4032 Debrecen, Egyetem tér 1. ¤ Postacím: 4010 Debrecen, Pf. 39. ¤ Tel.: (52) 410-443 E-mail: <u>publikaciok@lib.unideb.hu</u> ¤ Honlap: <u>www.lib.unideb.hu</u>



### DEBRECENI EGYETEM Egyetemi és Nemzeti Könyvtár



 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

 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.

 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

 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

- Murnyák, B., Csonka, T., Klekner, Á., Hortobágyi, T.: Alacsony grádusú glialis daganatok előfordulása és molekuláris patológiája. *Ideggyogy. Szle.* 66 (9-10), 305-311, 2013. IF: 0.343
- Murnyák, B., Csonka, T., Hegyi, K., Méhes, G., Klekner, Á., Hortobágyi, T.: Magas grádusú gliomák előfordulása és molekuláris patológiája. *Ideggyogy. 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 tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2017.09.07.

Cím: 4032 Debrecen, Egyetem tér 1. ¤ Postacím: 4010 Debrecen, Pf. 39. ¤ Tel.: (52) 410-443 E-mail: <u>publikaciok@lib.unideb.hu</u> ¤ Honlap: <u>www.lib.unideb.hu</u>

# 15. Az értekezés témájában elhangzott előadások és poszterek

### Angol nyelvű előadások:

B. Murnyák, M. C. Kouhsari, R. Hershkovitch, Á. Klekner, T. Hortobágyi - Genomic signature of PARP1 in glioblastoma molecular subtypes – 2017. május 14. - 13<sup>th</sup> Warsaw International Medical Congress for Young Scientists, Varsó, Lengyelország

B. Murnyák és T. Hortobágyi – The Effect of TP53 Mutations on the p53 Immunohistochemical Expression in Glial Brain Tumours – 2014. szeptember 29 – 5<sup>th</sup> Congress of Serbian Genetic Society, Belgrád, Szerbia

B. Murnyák, T. Csonka, A. Klekner, T. Hortobágyi, *Molecular pathology of high grade gliomas* – 2013. május 9 – 2<sup>nd</sup> Spring Hungarian Austrian Neuropathology Conference, Budapest

### Magyar nyelvű előadások:

**Murnyák B.** *Gliomák molekuláris patológiája - diagnosztikai vonatkozások –* 2016. október 22. – **A Magyar Neurológiai Társaság Konferenciája**, Eger

Murnyák B. és Hortobágyi T. Szomatikus TP53 mutációk immunhisztokémiai korrelációja daganatokban - 2016. október 14. – Fiatal Patológusok Találkozója, Budapest

#### Angol nyelvű poszterek:

B. Murnyák, M. C. Kouhsari, R. Hershkovitch, T. Hortobágyi - *Genomic signature of PARP1* in glioblastoma molecular subtypes – 2017. június 12. - Translational Bioinformatics 2017 Conference, Hinxton, Egyesült Királyság

**B. Murnyák**, M. C. Kouhsari, R. Hershkovitch, J. Bencze, B. Kálmán, G. Marko-Varga, Á. Klekner, T. Hortobágyi. *Molecular subtype dependent expression of PARP1 in glioblastoma – a bioinformaticanalysis of the TCGA dataset –* 2017. április 21. – **49<sup>th</sup> International Danube Neurology Symposium – Budapest** 

B. Murnyák, J. Bencze, T. Hortobágyi. Immunohistochemical correlates of TP53 somatic mutations in brain tumours – 2017. április 21. – 49<sup>th</sup> International Danube Neurology
Symposium – Budapest

M. C. Kouhsari, **B. Murnyák**, J. Bencze, Á. Klekner, T. Hortobágyi. *Clinicopathological* correlates of PARP1 and p21 immunohistochemical patterns in glioblastoma – 2017. április 21. – **49<sup>th</sup> International Danube Neurology Symposium – Budapest** 

# Függelék