

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**A GLIOBLASZTÓMA JELENLEGI TERÁPIÁS
KORLÁTAINAK ÖSSZEFÜGGÉSEI AZ EXTRACELLULÁRIS
MÁTRIX ÖSSZETÉTELÉVEL**

Dr. Hutóczki Gábor

Témavezető: Prof. Dr. Bognár László



**DEBRECENI EGYETEM
IDEGTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA**

Debrecen, 2016

Tartalomjegyzék

1. BEVEZETÉS	5. oldal
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK	9. oldal
2.1. Az extracelluláris mátrix	10. oldal
2.1.1. Rostképző fehérjék	11. oldal
2.1.2. Glikoproteinek	12. oldal
2.1.3. Hyaluronsav	12. oldal
2.1.4. Proteoglikánok	13. oldal
2.1.3. Egyéb fontos alkotóelemek	16. oldal
2.2. Célkitűzések	19. oldal
3. METODIKÁK	20. oldal
3.1. mRNS analízis	24. oldal
3.2. Fehérje analízis	27. oldal
3.3. Statisztikai analízis	27. oldal
4. EREDMÉNYEK	28. oldal
4.1. mRNS expresszió	28. oldal
4.2. Fehérje szintek	32. oldal
5. MEGBESZÉLÉS	38. oldal
5.1. Glioblasztóma peritumorális zónája	39. oldal
5.1.1. Tenaszcinok és CD168	40. oldal
5.1.2. MMP-9	41. oldal
5.2. Metasztázis peritumorális zónája	42. oldal
5.2.1. Fibronektin	42. oldal
5.3. Onkoterápia okozta változások	43. oldal
6. ÖSSZEFOGLALÁS	45. oldal
7. SUMMARY	46. oldal
8. IRODALOMJEGYZÉK	47. oldal
9. TÁRGYSZAVAK	60. oldal
10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	60. oldal
11. FÜGGELÉK	60. oldal

Rövidítések jegyzéke

Rövidítés	Megfelelő
AUC	Görbe alatti terület
BBB	Vér-agy gát
cDNS	Complementary DNS
CI	Konfidencia intervallum
CNS	Központi idegrendszer
CRT	Konkuráló kemoirradiáció
CT	Computer tomográfia
CT	Cycle threshold
ECM	Extracelluláris mátrix
EDP	Elasztin degradációs produktumok
EGFR	Epidermális növekedési faktor receptor
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FGF	Fibroblaszt növekedési faktor
GAG	Glükózaminoglikán
GAPDH	Glicerinaldehid 3-foszfát dehidrogenáz
GBM	Glioblasztóma multiforme
HGG	Magas grádusú glióma
HSPG	Heparán szulfát proteoglikán
kDa	Kilodalton
LGG	Alacsony grádusú glióma
MIP	Major intrinsic protein
MMP	Mátrix metalloproteináz
MMPI	Mátrix metalloproteináz inhibitor
MR	Mágneses rezonancia
mRNS	Messenger RNS
NGC	Neuroglikán-C
Norm	Nem tumoros agyszövet
NSC	Idegi őssejt

PCR	Polimeráz lánreakció
peri-GBM	Glioblasztóma peritumorális zónája
peri-Met	Tüdő adenokarcinóma intracerebrális metasztázisának peritumorális zónája
PG	Proteoglikán
FBRT	Fokális agyi sugárkezelés
RT	Reverz transzkripció
RT-qPCR	Real-time quantitative PCR
SRM	Selected reaction monitoring
TMZ	Temozolomid monoterápia
TGF β	Transforming growth factor beta
TLDA	TaqMan Low Density Array
TNC	Tenaszcin-C
TNR	Tenaszcin-R
TSP	Thrombospondin
TUKEB	Tudományos és Kutatásetikai Bizottság
VEGF	Vaszkuláris endothelialis növekedési faktor
WHO	Egészségügyi Világszervezet

1. Bevezetés

A központi idegrendszeri (CNS) daganat a 20 és 39 év közötti férfiaknál a leukémia után a második leggyakoribb tumorról kapcsolatos halálok, a 0-19 éves gyermekek esetén pedig a leggyakoribb tumor típus. Az egészségügyi világszervezet (WHO) a CNS daganatokat az alábbi csoportokra osztja [1]:

I. Elsődleges daganatok

- Diffúz asztrociter és oligodendrogliális daganatok
- Egyéb asztrociter daganatok
- Ependimális daganatok
- Egyéb gliómák
- Koroid pleexus daganatok
- Neuronális és kevert neuronális-gliális daganatok
- Pineális régió daganatai
- Embrionális daganatok
- Agyidegek- és paraspinalis idegek daganatai
- Meningeomák
- Mezenhímális, nem meningoteliális daganatok
- Melanocitás daganatok
- Limfómák
- Hisztiocitás daganatok
- Csírasejt daganatok
- Sella területi daganatok

II. Másodlagos daganatok

- Metasztázisok

Az elsődleges agydaganatok közül morbiditás és mortalitás alapján kitüntetett szerepük van a gliómáknak, melyek a neuroepiteliális szövet daganatai közé tartoznak. Ez a szövettípus a neuronokat és az azokat támogató hálózatot alkotó gliasejteket (astrocyta, oligodendroglia, ependyma, radiális glia, mikroglia) foglalja magába. A gliasejtek daganatos átalakulásából jönnek létre a különböző típusú gliómák. Megjelenésük, agresszivitásuk, kiújulási hajlamuk, illetve kezelhetőségük alapján a WHO I-IV. grádusba sorolja őket. Az I.-II. grádust az úgynevezett alacsony grádusú gliómák (LGG) foglalják magukba, míg a III.-IV. grádusú daganatok a magas grádusú gliómákat (HGG) jelentik. Ez utóbbiak közül a legnagyobb jelentőségű a külön névvel illetett IV. grádusú glióma, azaz a glioblasztóma multiforme (GBM), ami a gliómák 54 %-át és az összes primer központi idegrendszeri daganat 17 %-át teszi ki. Ez a daganattípus rendkívül rossz prognózisú, gyorsan növekvő, agresszív [2].

A múltban a sebészi eltávolítás önmagában 3-5 hónapos átlagos túlélést hozott, melyet később a kiegészítő posztoperatív radioterápia 8-11 hónapra nyújtott meg [3]. Emellett számos kemoterápiás szert is kipróbáltak, azonban ezek alkalmazása önmagában, vagy a sugárkezeléssel kombinálva sem hozott szignifikáns javulást [4].

2005-ben Roger Stupp és munkatársai 576 beteg vizsgálata alapján a konformális besugárással kombinált temozolomid kezelés kedvező eredményeit közölték, ami a medián túlélést 14,6 hónapra növelte [5]. Ez mérföldkőnek bizonyult a glioblasztóma posztoperatív kezelésében és a széles körű bevezetése óta a munkacsoport vezetőjének nevével illetett konkuráló kemoirradiáció standardként használt.

A temozolomid az imidazotetrazine családba tartozó, kedvező farmakokinetikai tulajdonsággal bíró alkiláló ágens, ami a központi idegrendszerbe jól penetrál, közel 100%-os

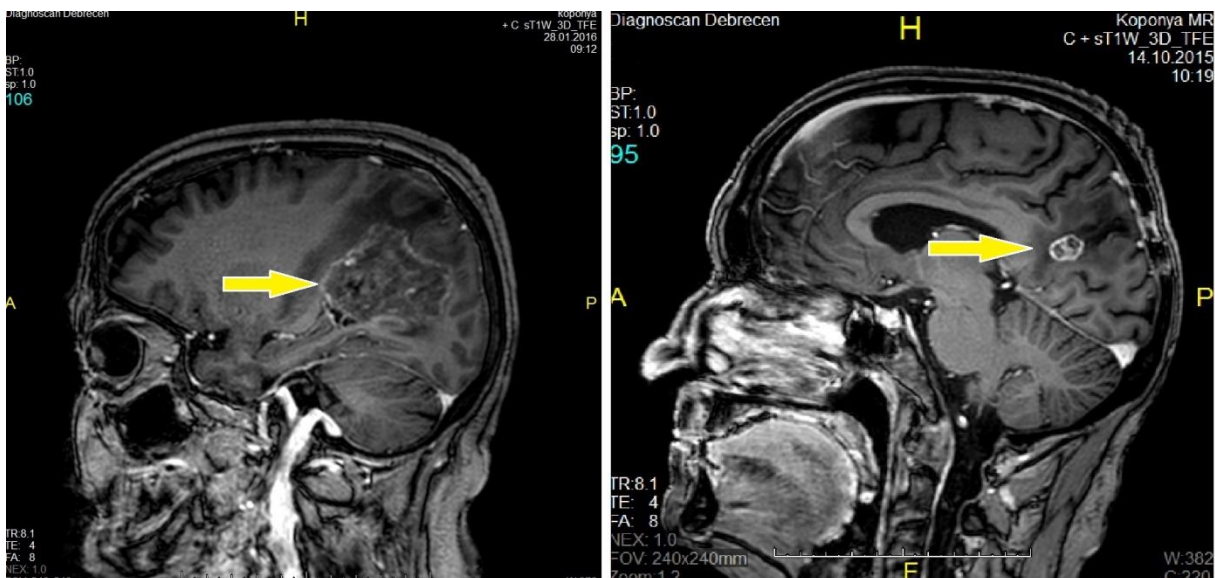
a biológiai hozzáférhetősége és alkalmazása relative enyhe mellékhatásokkal jár [6]. A daganatsejtek DNS-ének alkilálása révén fejt ki hatását, mely során a javító enzimek egyes és kettős lánctöréseket hoznak létre a DNS kettős spirálban így aktiválva az apoptózis útvonalakat. A temozolomid az első választandó szer újonnan diagnosztizált glioblasztóma esetében, emellett más gliómákban is bizonyított hatékonysága [7,8]. Sugárkezeléssel kombinálva a konkuráló fázisban általában $75\text{mg}/\text{m}^2$ dózisban, később monoterápia formájában kezdetben $150\text{mg}/\text{m}^2$ majd $200\text{mg}/\text{m}^2$ dózisban alkalmazzák [9]. A konkuráló kezelésben a temozolomid radioszenzitizációja jelenti az adjuváns hatást, melyet többek között az alábbi mechanizmusok útján ér el: a károsodott DNS kijavításának elégtelensége, autofágia és apoptózis indukció, epiteliális-mezenhímális tranzíció megfordítása [10].

A komplex kezelés ellenére is sajnos törvényszerű a kiújulásmely rövid időn belül a beteg halálát okozza. A glioblasztómát napjainkban gyógyítani nem lehet, a cél a progresszió lassítása és beteg életminőségének minél további megőrzése [11]. A folyamatos kiújulás oka az, hogy a daganat kifejezett infiltratív tulajdonsággal bír és ezáltal teljes sebészeti reszekciója lehetetlen. A kezelés gerincét a minél nagyobb tumor tömeg eltávolítása és az ezt követő onkoterápia képi.

A metasztázisok ezzel ellentétben megjelenésükben, viselkedésükben és kezelhetőségükben is alapvetően eltérnek a gliómáktól. Átlagos incidenciájuk 9% - 17% között van, de ezt évről évre emelik a folyamatosan újuló képalkotó eljárások és az egyre hatékonyabb szisztémás daganatkezelések, mely utóbbiak nyújtják a túlélést, nagyobb lehetőséget teremtve ezzel központi idegrendszeri áttétek megjelenésére [12]. A primer forrás tekintetében három daganat típusnak van kiemelkedő jelentősége: a tüdő karcinómának, az emlő karcinómának és a melanómának, ezek teszik ki az esetek közel 80%-át, azonban ezek közül is legnagyobb szereppel a tüdő tumor bír, mely önmaga 30-60%-ot képvisel [13]. A szoliter és oligo agyi metasztázisok mellett a beteg életkilátásai jobbak, mint glioblasztóma esetében és a

prognózist általában az elsődleges daganat határozza meg. Kezelésük sebészi eltávolításból és/vagy különböző típusú sugárkezelésből áll. Ez utóbbi esetében széles paletta áll rendelkezésre, mely magában foglalja a teljes- ill. fokális agyi besugárzást, a konformális besugárzást és a sztereotaxiás módszereket is. A sebészi kezelés nagyban függ a metasztázis(ok) méretétől, elhelyezkedésétől, környezetéhez való viszonyától, általánosságban azonban elmondható, hogy az áttét általában jól körülírt, állományi környezetével nem kapaszkodik össze, azt nem infiltrálja így radikális eltávolítása rutin idegsebészeti feladat.

Az elsődleges és a másodlagos központi idegrendszeri daganatok igen eltérő módon lépnek kapcsolatba az őket körülvevő agyszövettel, ami megszabja terjedésüket és ezáltal onkoterápiájuk sikerességét is. A kifejezetten invazív malignus gliómák nagyban különböznek a csaknem szferoid agyi áttétektől és infiltrációs zónájukat nehéz intraoperatív megkülönböztetni a peritumorális ép agyszövettől, legtöbb esetben ez teszi lehetetlenné radikális eltávolításukat (1. ábra) [14,15]. Ebben a gyökeresen különböző inváziós potenciálban meghatározó szerepe az extracelluláris mátrixnak (ECM) van [16-18].



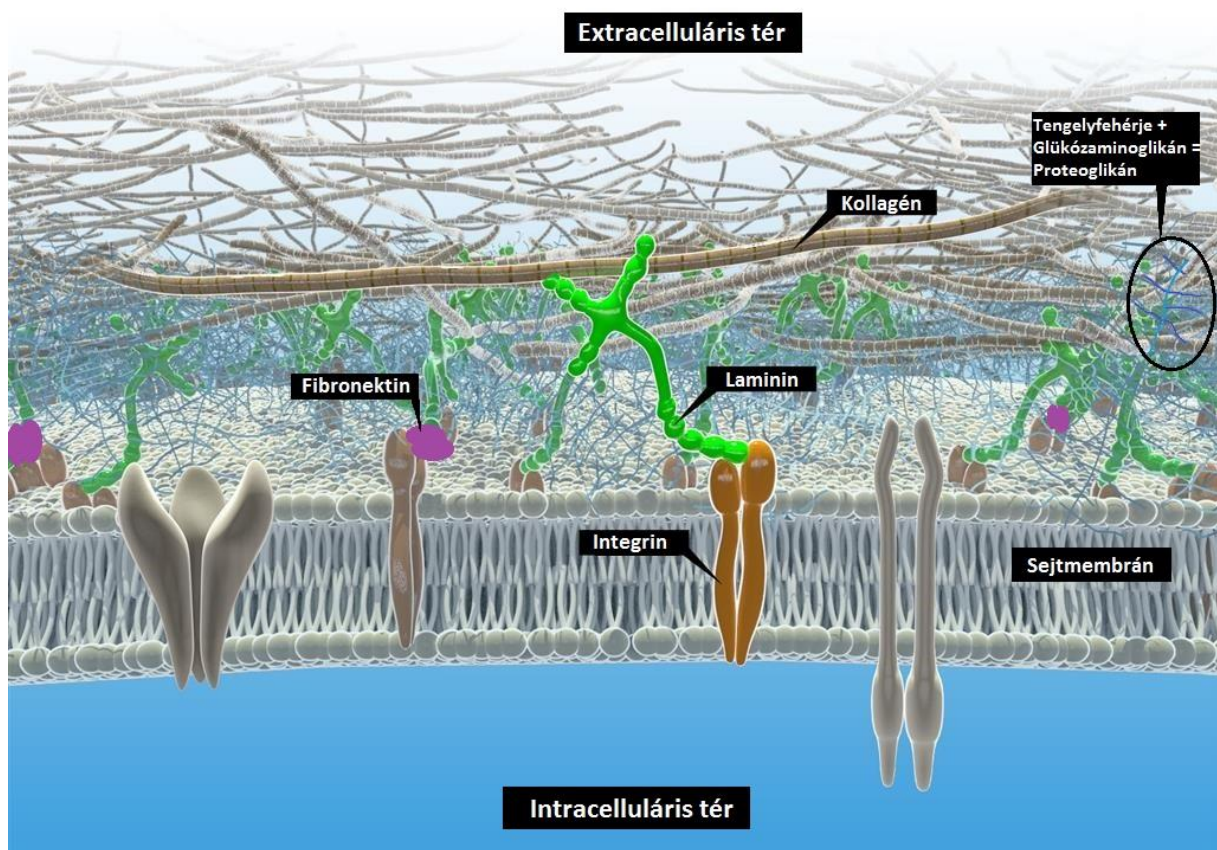
1. ábra Glioblasztóma multiforme (bal kép) és intracerebrális metasztázis (jobb kép) típusos MR képe.

Az ECM egy fehérjében és rostban gazdag állomány, ami a szervezet többi sejtjeihez hasonlóan a központi idegrendszer sejtjeit veszi körül. Összetételét illetően a mátrix rendkívül heterogén, tartalmaz kollagéneket, elasztint, laminineket, fibronektint, proteoglikánokat, glükózaminoglikánokat, illetve enzimeket. A különböző molekulák, enzimek és szolubilis faktorok kötőszöveti rostok hálózatába vannak ágyazva [19-21]. Az ECM egy dinamikus és aktív környezetet biztosít a sejteknek, melyben szoros kapcsolat alakul ki a sejt és az azt körülvevő mátrix között, ami másodlagos jelátviteli útvonalakon keresztül a tumor sejt inváziójában bír meghatározó szereppel [22-24]. A peritumorális infiltráció során szoros kapcsolat alakul ki az ECM-el. Ez a sejt-ECM konnexió a sejt-sejt interakcióval és a szolubilis faktorok rendszerével együtt egy komplex kommunikációs hálózatot hoz létre [25]. A környezetet beszűrő tumorsejtek változást hoznak létre a mátrix komponensek expressziójában, valamint a proteázok és szintázok aktivitásában. Ezen peritumorális ECM-ben bekövetkezett változások felelősek a gliómák és az agyi metasztázisok nagyban eltérő invazivitásáért. Ahhoz, hogy megértsük a különböző típusú anaplasztikus agydaganatok igen különböző invazív potenciálját, a daganatok peritumorális ECM-re gyakorolt hatását és a peritumorális agyszövetben lévő és az invázióhoz köthető ECM komponensek szintjének változását kell vizsgálni. Ennek megismerése és változásainak feltérképezése kulcsfontosságú információval szolgálhat az intrakraniális agyi daganatok eltérő viselkedésének megértéséhez és egy hatékony onkoterápia koncepciójának kidolgozásához.

2. Irodalmi áttekintés és Célkitűzések

2.1. Az extracelluláris mátrix

A legtöbb sejt a szervezeten belül többsejtes struktúrák vagy szövetek része. Egy szöveten belül a sejteket egy rostokban és makromolekulákban gazdag alapállomány veszi körül. Ennek az állománynak az összetevői, illetve a sejtek egymáshoz való kapcsolódása szabja meg az adott szövet biológiai tulajdonságait. Az ECM-et a benne található sejtek termelik létrehozva egy olyan mikrokörnyezetet maguk körül, ami a különböző fejlődési, regenerációs és patológiai folyamatokat irányítja [26]. Annak ellenére, hogy az összetétele általában szövettípusra specifikus, a fehérjekomponensek többsége számtalan szövetben megtalálható. A mátrixot alapvetően négy típusú összetevő alkotja, a rostképző fehérjék, a hyaluronsav, a glikoproteinek és a proteoglikánok csoportja (2. ábra).



2. ábra Az extracelluláris mátrix fontosabb alkotóelemeinek elhelyezkedése és egymáshoz való viszonya. *forrás: www.biolamina.com*

2.1.1. Rostképző fehérjék

Közéjük tartoznak a kollagének, az elasztinok.

Kollagén: triplahélixet alkotó molekula, melyből 28 típus létezik. Fibroblasztok termelik és irányítják átrendeződésüket. Legfontosabb képviselője az I. típusú kollagén, mely az emberi szervezetben található kollagének több mint 90%-át teszi ki. Több típusnak is jól meghatározott előfordulási helye van (például a IV. típus a bazális laminában). Legfőbb funkciója a szerkezeti integritás, emellett azonban számos más folyamatban (például sejtadhézió vagy kemotaxis) is részt vesz [27]. A kollagén egységek gyakran szupramolekuláris komplexeket alkotnak.

Elasztin: egy 70 kDa-os glikoprotein, randomszerűen feltekert és keresztkötött formában képezi az elasztikus rostokat, melyek az ECM-ben találhatóak. Az elasztikus rostok két összetevőből állnak: fibrillinből és elasztinból. Ez utóbbi tulajdonképpen egy elasztikus, fibrózus mukoprotein mely a kollagénhez hasonló. Normálisan az agyhártyákban és a kiserekekben van jelen. In vitro kísérletek során az asztrocitóma sejtek hozzátapadnak az elasztinhoz. A gliasejtek felszínén található az elasztin-kötő-protein melynek szerepe a fokozott neoplasztikus transzformációban van, ugyanis a kötőfehérje fokozott expressziója fokozza az invazivitást [28]. Az elasztin prekuzora a tropoelasztin, egy kb. 70kDa-os vízoldékony molekula. Számos humán asztrocitóma-sejtvonal és magas grádusú glióma műtéti mintában igazolták, hogy a gliá- és gliómasejtek intracelluláris tropoelasztint termelnek. Ez az endogén tropoelasztin nagyrészt lebomlik és az innen származó elasztin

degradációs produktumok (EDP) fokozzák a sejtciklust, így az EDP-k mitogén faktorok lehetnek malignus asztrocitómákban. [29].

2.1.2. Glikoproteinek

Főbb képviselőik a fibronectin, a lamininek és a tenaszcinok.

Fibronectin: dimer formában létező kb. 440kDa súlyú glikoprotein, fontosságát számos kötőhelye adja, melyekkel többek között más fibronectinekhez, kollagénhez, lamininhez, heparán szulfát proteoglikánokhoz (például szindekán) vagy sejtfelszíni integrin receptorokhoz tud kötődni [30]. Több izoformája is létezik, melyek ugyanazon génből alternatív splicing révén jönnek létre. Funkciói közé tartozik a sejt-kitapadás és a sejt migráció elősegítése, kardiovaszkuláris betegségek mellett metasztatikus daganatokban is megfigyelték szerepét [31].

Laminin: a bazálmembrán egyik fő alkotóeleme. Alfa (5 féle), béta (4 féle) és gamma (3 féle) láncot tartalmazó heterotrimer fehérjék, melyek jellegzetes kereszt alakot vesznek fel. A fibronectinhez hasonlóan kapcsolatot létesítenek a sejtmembrán és a mátrix között. Kiemelkedő a jelentőségük van az agy (neokortex) fejlődésében, melyet az idegi őssejtek (NSCs) expanziója, migrációja és differenciációja, valamint az axon növekedés elősegítése révén valósítanak meg [32].

Tenaszcin: rendkívül nagyméretű, makromolekuláris felépítésükben igen hasonló glikoprotein multimerek. A tenaszcin családnak négy tagja van: C, R, X és W, melyek közül az első kettő bír jelentőséggel a központi idegrendszerben. Számos ECM alkotóval létesítenek kapcsolatot.

2.1.3. Hyaluronsav

A glükózaminoglikánok talán legjelentősebb képviselője, az ECM fő alkotóeleme. Legnagyobb mennyiségben a kötő- hám-, és idegszövetben található. Kiemelkedő szerepe van a sejtmigrációban és proliferációban, ezért malignus tumorok progressziójában is rendkívül fontos molekula. Sejtfelszíni receptora a CD44, bontóenzime a hialuroindáz, mely azzal, hogy a hialuronsav hidrolízisét katalizálja, csökkenti az ECM viszkozitását, így növeli a szöveti permeabilitást. Emellett a hialuronsav részt vesz a tumor angiogenezisben, az invázióban, és a metasztázis képzésben is, amelyet humán GBM-ben, karcinóma agyi metasztázisában és tumorsajt-kultúrában is vizsgáltak [33]. A hialuronidáz három típusának (1, 2, 3) génjei a 3-as kromoszóma p21-es helyére lokalizálhatóak. A gliómák sok hialuronidázt és CD44-et (hialuronsav receptora) expresszálnak. Junker és mtsai a hialuronidáz szerepét bizonyították az invázióban, kissejtes tüdődaganatban [34]. Enegd és mtsai a hialuronidáz szintjét emelkedettnek találták agyi metasztázisban primer agydaganathoz viszonyítva. Vizsgálatokkal igazolták továbbá, hogy a hialuronsav szintáz-2 emelkedett expressziója és a hialuronidáz hiánya csökkenti a gliómák tumoros potenciálját, mert a CD44-hialuronsav kapcsolat (ami a tumorsejt-ECM kapcsolódáshoz, a migrációhoz és az invázióhoz kell) megváltozik. Megfigyelték továbbá, hogy az infiltratív módon növekedő GBM is sok hialuronidázt termel [35].

2.1.4. Proteoglikánok

Az extracelluláris intersticiális tér nagy részét ezek a molekulák töltik meg, rendkívüli vízmegkötő tulajdonságuknak köszönhetően gél állagot létrehozva. Ismétlődő diszaharid egységekből álló glükózaminoglikán (GAG) láncok alkotják, amik egy központi fehérjéhez csatlakoznak, kivéve a hialuronsavat, ami központi fehérje nélküli makromolekulaként van

jelen. A proteoglikánokat (PG) ezen alkotóelemek alapján csoportosítjuk. A GAG láncok lehetnek szulfatáltak (kondroitin szulfát, heparán szulfát, keratán szulfát) vagy nem szulfatáltak (hialuronsav). A láncok variabilitásának köszönhetően rendkívül sokféle proteoglikán létezik. 3 fő csoportja a kis leucin-gazdag proteoglikánok (pl.: decorin), a moduláris proteoglikánok (pl.: perlekán, agrin) és a sejtfelszíni proteoglikánok (pl.: szindekán).

Kondroitin szulfát: az ECM egy további, nagy jelentőséggel bíró összetevője. Negatív töltésének köszönhetően könnyen interakcióba lép a sejtközötti tér fehérjéivel. Gyakran fehérjéhez kötve, proteoglikánok részeként található meg és mivel a kondroitin szulfát a porcszövet fontos szerkezeti komponense, így szerepe az adott szövet strukturális integritásának megőrzésében kiemelkedő. Ez a szerep egyébként tipikusan a nagy aggregáló proteoglikánokra, a lektikán család négy tagjára, a verzikánra, a neurokánra, az aggregánra, és a brevikánra jellemző. Ezek a proteoglikánok hialuronsavhoz kötődve részt vesznek az idősebb agyban és gerincvelőben felfedezett úgynevezett perineuronális háló létrehozásában. Ez a háló nagy vízkötő kapacitással rendelkezik, és periszinaptikus akadályként is funkcionálhat, lebontásában a kondroitináz A, B, C, a hialuronidáz és a kollagenázok kapnak szerepet [36].

Verzikán: egy 1000kDa-nál nagyobb kondroitin-szulfát proteoglikán, és az egyik leggyakoribb agyi ECM protein. Befolyásolja az axonok növekedését, valamint az úgynevezett neuronális hálózatot. Humán asztrocitómában is jelen van a verzikán C-terminusa (G3-domén). Ez a domén fokozza a neuritok képzését és a sejtkitapadást, valamint a szinaptofizin klaszterek kialakulását és az epidermális növekedési faktor receptor (EGFR) foszforilációval történő aktiválását, tehát szerepe van az idegsejt fejlődésében és regenerációjában. [37] Ezzel ellentétben a verzikánnak van egy EGF motívumot tartalmazó része, és ha ebben mutáció van, az asztrociták sejtproliferációja jelentősen redukálódik. Ezzel

a mutáns verzikánnal (illetve annak mutáns G3 doménjével) végzett kísérletekben a fertőzött sejtvonalak leállítását tapasztalták. [38].

Neurokán: a nagy aggregálódó molekulák csoportjának következő képviselője a neurokán, ami egy olyan kondroitin-szulfát proteoglikán, mely együttműködik a heparán-szulfát proteoglikánokkal (például a szindekán-3-al és glipikán-1-el). Ezt a kapcsolatot a heparitináz I és II gátolja, de a kondroitináz nem. A szindekán-3 és a glipikán-1 a neurokán sejt felszíni receptora és kettőjük kapcsolata pozitív szerepet játszik a neurit kinövésben. [39].

Aggerekán: egy körülbelül 2500Da tömegű molekula. Legfontosabb alkotója a perineuronális hálónak. Bontóenzime a kondroitináz ABC. Leggyakoribb előfordulási helye a porcszövet. Emellett csak néhány szövetben található: ínban, az aortában, és az agyban. Az agy fejlődésében is szerepet játszik a verzikánnal, a neurokánal, és a brevikánnal együtt [40].

Brevikán: exkluzívan az agyban található molekula, ott a leggyakoribb kondroitin szulfát proteoglikán. Létezik GAG nélküli formában (csak központi fehérje) is. Feladata a gliasejtek proliferációja és migrációjának elősegítése, ennek következtében a fejlődés során, agyi sérülések után, valamint gliómákban is nagy szerepe van. Gliómákban emelkedett szintje elősegíti az EGFR aktivációt, növeli a sejtadhéziós molekulák valamint a fibronectin szintjét [41].

Perlekán: a heparán szulfát proteoglikánok egyik fontos képviselője, legnagyobb mennyiségben a bazális membránban és porcszövetben található. A molekula fő alkotóeleme egy fehérje mag, ami öt darab különálló doménre osztható. Többféle biológiai folyamatban tölt be fontos szerepet, úgymint sejtnövekedésben, a differenciálódásban, valamint a növekedési faktor aktivitásának modulálásában, ezen kívül kötődik növekedési faktorokhoz, és sejt felszíni receptorokhoz. Kiemelt szerepe van a vér-agy gát felépítésében, ugyanis a CNS-ben leginkább itt található [42].

Agrin: nagy heparán-szulfát proteoglikán molekula, melynek legnagyobb szerepe a neuromuszkuláris junkció embriogenezis során történő fejlődésében van. Nevét a szinaptogenezis során az acetilkolin receptorok aggregációjában betöltött szerepe után kapta. Motoros axon-terminálisból való felszabadulása feltehetőleg serkenti a posztszinaptikus apparátust a fejlődő és regeneráló neuromuszkuláris junkcióban. Az agrinnak a perlekánhoz hasonlóan fontos szerepe van a vér-agy gát funkciójában, erre utalnak azok az irodalmi állítások, melyek szerint GBM-ben a vér-agy gátban általában hiányzik. Az agrin befolyással bír az akvaporin eloszlásra humán GBM sejteken, így a vér-agy gát integritásában is szerepet játszik [43].

Szindekán: egy kb. 250-300 kDa súlyú transzmembrán proteoglikán, főleg az epitheliális sejtekben található. G-protein kapcsolt receptorok koreceptoraként működik, és 3-5 darab heparán-szulfát, valamint kondroitin-szulfát molekula kapcsolódik hozzá. Ezek segítségével ligandok széles skálájával képes kapcsolatba lépni, úgymint a fibroblaszt növekedési faktor (FGF), a vaszkuláris endothelialis növekedési faktor (VEGF), a transforming growth factor béta (TGF β), a fibronektin, és antithrombin-1.

2.1.5. Egyéb fontos alkotóelemek

Matrilin: a fehérjecsald 4 tagú, és minden tagja tartalmazza a von Willebrand faktor-A, és az EGF-like domént. Míg a matrilin-1 és matrilin-3 molekulák inkább a porcszövetben találhatóak, addig a matrilin-2 és matrilin-4 szélesebb szöveti megoszlást mutat. Pilocitás asztrocitomában matrilin-2 mRNS fokozott expresszió mérhető és ez erre a tumortípusra igen jellemző, azonban ezen belül leginkább az agresszív szövettani típusok tulajdonsága [44].

Thrombospondinok: a glikoproteinek egy külön családja. Jelentőségük a vér koagulációjában és antikoaguláns faktorokkal való kapcsolatuk ismert. Emellett a

sejtadhézióban, a vérlemezke-aggregációban, a sejtproliferációban (növekedés), az angiogenezisben, a daganatsejtek metasztatizálásában, és a szöveti javításban töltenek be fontos szerepet. A thrombospondin-2 (TSP-2)-ről kimutatták, hogy egerekben gátolja az angiogenezist, és gátolja a tumor növekedését, tehát tumor szuppresszorként viselkednek. [45]. Watanabe és mtsai igazolták, hogy a malignus gliómasejtek TSP-1-et termelnek, mely egyrészt fokozza a gliómasejtek motilitását, és a HSPG-hez való kötődést, másrészt a TSP-1 a sejtfelszíni $\alpha\beta 3$ és $\alpha 3\beta 1$ integrinokhoz és szindekán-1-hez kötődik [46]. ELISA és flow citometriás vizsgálatokkal a malignus glióma sejtvonalon magas TSP szintet, emellett $\alpha 3\beta 1$, és $\alpha\beta 3$, valamint szindekán-1 expressziót találtak. Ezek egymással együttműködve fokozzák a migrációt. A non-glióma malignoma sejtvonalon a TSP szint alacsonynak bizonyult [47].

Neuroglükán-C (NGC): egy 150 kDa-os transzmembrán kondroitin szulfát PG, mely rendelkezik egy EGF doménnel. Humán agyban (hippocampus) RT-PCR-al 4 splice variánsát izolálták (I-IV). A NGC csak érett agyban található, a neuronok expresszálják [48]. Az ErbB3 ligandjaként funkcionál és így aktív növekedési faktor szerepét tölti be. Az NGC emellett az ErbB2-t is transzaktiválja [49].

Akvaporinok: transzmembrán fehérjék, a major intrinsic protein (MIP) család részei. A sejtek membránjában pórusokat formálnak, ilyen módon felelősek a sejtek kétirányú víztranszportjáért. Vízmolekulákra szelektívek, az ionok, és más anyagok mozgását nem engedik meg. A transzmembrán víztranszportban betöltött szerepük miatt az akvaporinoknak a cisztás daganatokban is lehet szerepe, mint például a hemangioblasztóma cisztás formáiban. Ikota és mtsai 378 tumorban végeztek immunhisztokémiai tesztet, és kiderült, hogy az asztrocitómák és oligodendrogliómák között nagy különbség van az aquaporin-4 szintben, (emellett a GFAP, a vimentin, és a citokeratin szintben is) [50]. Az aquaporin-4 eloszlása GBM-ben összefüggést mutat az agrinnal [51]. A vér-agy gát (BBB) működése 2 sejttípus interakciójától: az endothelsejt – asztrocita (és a szubendothelialis bazál lamina) funkciójától

függ. Az aquaporin-4 molekulák redisztribúciója történik magas grádusú gliomákban, alacsony grádusú asztrocitómában azonban nem, így lehet, hogy ez a folyamat a BBB károsodás okozta vazogén ödéma ellensúlyozására szolgál azáltal, hogy a víz vissza tudjon szívódni az erekbe [52]. Ugyanakkor az aquaporin-4 kifejezetten emelkedett malignus központi idegrendszeri tumorokban, ezért feltehetőleg szerepe lehet az ödéma kialakulásában is [53].

*Kadherine*k: transzmembrán fehérjék, közös jellemzőik az extracelluláris kalcium kötő domének. Nevüket a kalcium ionoktól való függőségükről kapták (a kalcium eltávolítása a molekuláról megszünteti annak adhezív tulajdonságát) és a sejtadhézióban (sejt-sejt kapcsolat), valamint a szövetek kialakulásában játszanak kiemelkedő szerepet. Intracelluláris részükkel az α -katenin és β -katenin-en keresztül az aktin fonalakkal (citoszkeleton) lépnek kapcsolatba. Három fő fajtájuk arról a szövetről kapta a nevét, amelyekben megtalálható: P-kadherin (placental), E-kadherin (epithelial), és N-kadherin (neural). Egy csoporton belüli kadherine csak egymással lépnek kapcsolatba. A kadherine termelésében bekövetkezett minőségi vagy mennyiségi változás növekvő sejtmozgáshoz, invázióhoz és végsősoron a daganatok metasztatizálódásához vezet. Hegedűs és munkatársai 9 agytumor sejtvonal in vitro inváziós mintázatát vizsgálták, és az invázió az N-kadherin, valamint a mátrix metalloproteináz inhibitorok (MMPI) expressziós szintjével negatívan korrelált, míg az invázió a mátrix metalloproteinázok (MMP) szintjével egyenesen volt arányos [54]. Asano és munkatársai microarray technikával vizsgáltak GBM sebészeti mintákat és a N-kadherin expressziós szintjét nagyobbak találták mint a normál agyban, melynek a korai tumor formációban tulajdonítanak fontos szerepet. Sejtvonalakon az N-kadherin befolyásolja a sejtek adhézióját IV-es típusú kollagénhez, fibronektinhez, lamininhez és I-es típusú kollagénhez. Az N-kadherin expressziós szintje az invázióval fordított arányban korrelált [55]. Tüdő- és gasztrointesztinális daganat agyi metastasisát vizsgálva (paraffinos minták)

Shabani és munkatársai azt találták, hogy a KI-67-el együtt növe az E-kadherin szint emelkedett. A primer tumor és az agyi áttéti tumor eredményei nagyon hasonlóak voltak [56].

2.2. Célkitűzések

Az irodalomban számos esetben vizsgálták már különböző ECM molekulák szintjét intrakraniális daganatokban, azonban korábban csak néhány kutatócsoport végzett panelszerű, expressziós mintázat létrehozását célzó vizsgálatot. Emellett az agyi daganatokat övező peritumorális állomány is nagyrészt ismeretlen területnek számít a neuro-onkológiában, mint ahogy a glioblasztómák kemoirradiációs kezelésének az ECM szemszögéből történő analízisével is csak nagyon kevesen próbálkoztak. Ezeket figyelembe véve végeztük kutatásunkat ezen a területen.

Napjainkban gőzerővel folynak a kutatások olyan típusú szerek kifejlesztésére, amelyek érdemi megoldást jelenthetnek a recidíva problémájára, azonban az átütő siker még várat magára. Ezen terápiák egy részének a célpontja a daganatsejtek közvetlen környezete, azaz az infiltráció színhelye, az extracelluláris mátrix [57]. A tumorsejtek invázióját alapvetően a mátrixot alkotó molekulák (kollagén, integrinek, lamininek, proteoglikánok, szintetizáló és bontó enzimek, stb.) szabják meg létrehozva egy aktív, dinamikus, „intelligens” közeget, melynek változása kulcsfontosságú a sejtmozgásban. Ezt a változást többek között a releváns mátrix molekulák expressziójának változásával lehet követni [58]. Amennyiben az onkoterápia megváltoztatja a mátrix molekulák expresszióját, az hatással van a tumor infiltratív képességére. E nélkül azonban a konkuráló kezeléstől a tumor inváziós aktivitásának mérséklődése nem várható, és így a kiújult daganat radikális eltávolítására az onkoterápia után sem lesz remény.

Felmerül tehát a kérdés, hogy az invázió milyen változást hoz létre a peritumorális állományban (az milyen mértékben különbözik primer és szekunder agydaganatokban) és hogy a glioblasztóma jelenleg elfogadott standard kezelése okoz-e valamilyen változást a tumor extracelluláris mátrixában, azaz bír-e a konkuráló kemoirradiáció az infiltrációt befolyásoló hatással? Ezen kérdések megválaszolására tűztük ki célul egyrészt az intracerebrális daganatok és a nem-tumoros agyállomány invázióban szerepet játszó ECM komponenseinek és a hozzájuk kapcsolódó molekulák expressziós szintjeinek vizsgálatát, másrészt az onkoterápia előtti és utáni GBM tumormintában meghatározni a releváns ECM komponensek expresszióját és összehasonlító elemzéseket végezni.

3. Metodikák

Ahhoz, hogy a központi idegrendszerben vizsgálni lehessen a mátrix molekulák szintjének különbségét és változásukat bizonyos ágensekre első lépésben humán agymintákat kellett gyűjteni. E célból 2005. decemberben létrehoztuk a Debreceni Idegsebészeti Agydaganat és Szövetbankot, ahol a betegek előzetes beleegyezésével a Debreceni Egyetem Klinikai Központ Idegsebészeti Klinikájának műtőiben intraoperatív eltávolított daganat- és agyszövet mintákat lefagyasztjuk és tároljuk. A szövetbankban jelenleg 55 eltérő szövettani típusba sorolható központi idegrendszeri lézió található és közel 1300 betegből származó minta, amiket eltávolítás után folyékony nitrogén felszínén azonnal lefagyasztunk és -80 Celsius fokon tárolunk. A mintáról számos adatot (beteg azonosító, életkor, mintavétel ideje, verifikált szövettani diagnózis, mintaszám) rögzítünk, melyek a könnyű keresést és statisztikai analízist teszik lehetővé.

Először 27 db humán agyszövet minta került feldolgozásra, melyek során az alábbi három szöveti típust különböztettük meg: glioblasztóma makroszkóposan közvetlenül daganat melletti területe, peritumorális zónája (peri-GBM), tüdő adenokarcinóma intracerebrális metasztázisának peritumorális zónája (peri-Met) és nem tumoros agyszövet (Norm). Mindegyik típus kilenc különböző szövettani mintát tartalmazott. Ezen peritumorális mintavételek csak akkor történtek meg, amikor az a tumor eltávolítása során elkerülhetetlen volt. A peritumorális minták minden esetben a daganat közvetlen közeléből származtak, melyet műtét közben az operatőr makroszkóposan ép agyszövetnek ítélt meg. Ezeket a mintákat később egy tapasztalt neuropatológus vizsgálta és hagyott jóvá, a kritérium az volt, hogy a szövetdarab ne a daganat állományából származzon. A nem tumoros agyszövet mintákat epilepszia sebészet során eltávolított, valamint beékelődés miatt végzett életmentő idegsebészeti műtét során rezekált agyrészletekből gyűjtöttük és teljes mértékben tumormentesek voltak.

Ezt követően 31 darab humán glioblasztóma szövetmintát vizsgáltunk. A mintákat szintén a Debreceni Idegsebészeti Agydaganat és Szövetbankból válogattuk ki úgy, hogy 15 darab minta kezelésen még át nem esett betegtől származott, 16 esetben pedig sugár- és kemoterápiát követően kiújult daganat reszekciója során nyert tumorszövetet dolgoztunk fel (1. táblázat). A minták átlagos mérete körülbelül 5mm³ volt.

Minta	Mintaszám	Nem (Férfi/Nő)	Átl. életkor (tartomány)
Peri-Met	n=9	7/2	55,4 (46-70)
Peri-GBM	n=9	6/3	51,6 (36-65)
Norm	n=9	3/6	53,7 (12-80)
Kezelés előtt	n=15	8/7	56,2 (44-73)
Kezelés után	n=16	12/4	59,1 (43-67)

1. táblázat A vizsgált betegek nem szerinti megoszlása és átlagos életkora a különböző mintatípusokban.

Műtétet követően az úgynevezett 'Stupp'-protokoll 60 Gy dózisú konformális sugárkezelést jelent a műtéti területre és a biztonsági zónára, ezzel párhuzamosan napi 75 mg/m² temozolomid szájon át történő szedését, majd a konkuráló fázis után monoterápiás fázisként az első ciklusban 150 mg/m², később pedig 200 mg/m² temozolomid-ot magában (öt napon keresztül, 28 napos ciklusokban) (2. táblázat).

Betegszám	Kezelés
Beteg 1	RT + 2 TMZ
Beteg 2	CRT + 6 TMZ
Beteg 3	CRT
Beteg 4	RT + 4 TMZ
Beteg 5	CRT + 6 TMZ
Beteg 6	CRT + 6 TMZ
Beteg 7	CRT + 6 TMZ
Beteg 8	CRT
Beteg 9	CRT + 2 TMZ
Beteg 10	CRT + 6 TMZ
Beteg 11	CRT
Beteg 12	CRT + 2 TMZ
Beteg 13	RT + 15 TMZ
Beteg 14	CRT
Beteg 15	RT + 15 TMZ
Beteg 16	CRT + 1 TMZ

2. táblázat A kezelés utáni betegcsoport onkoterápiájának részletei. RT: 60Gy konformális agyi sugárkezelés, CRT: konkuráló kemoirradiáció (RT+7 5mg/m² temozolomid napi adása), TMZ: temozolomid monoterápia (első ciklus: 150 mg/m², utána 200 mg/m²).

Közvetlenül feldolgozás előtt mind az 58 mintából egy szeletet szövettani analízisre küldtünk, melyet szintén neuropatológus jóváhagyása után vizsgáltunk tovább. A munkafolyamat egészét a Magyar Etikai Bizottság (TUKEB) jóváhagyta és engedélyezte. Minden beteg részletes felvilágosítást követően műtét előtt egy hozzájárulási nyilatkozatot írt alá.

Az agymintákban az ECM molekulák végső szöveti mennyiségét számos folyamat befolyásolja mind a transzkripció, mind a transláció során (pl.: alternatív splicing, poszttranszlációs modifikációk), ezért az expressziós profil létrehozásához a mátrix alkotóelemeket RNS (mRNS) és fehérje szinten is analizáltuk. Az irodalmi adatok alapján közel 100 darab molekulát helyeztünk kutatásaink fókuszába, amit az eredményeinktől függően fokozatosan tovább szűkítettünk. Végül 20 darab ECM alkotóelem szerepe bizonyult számunkra kulcsfontosságúnak, ezek a következők: Brevikán, N-kadherin-2, III. típusú kollagén alfa1 lánc, EGFR (erbB1), ErbB2, Fibronektin, CD168, Integrin alfa1, alfa3, alfa7, béta1 lánc, Laminin alfa4, béta1 lánc, Mátrix metalloproteináz-2 (MMP-2), Mátrix metalloproteináz-9 (MMP-9), Neurokán, Szindekán-1, Tenascin-C, Tenascin-R, Verzikán (3. táblázat). A peritumorális és tumormentes mintákban a Szindekán-1 szintjét nem vizsgáltuk.

Gén	Assay Próba
Brevikán	BCAN-Hs00222607_m1
N-Kadherin-2	CDH12-Hs00415843_m1
CD168	HMMR-Hs00234864_m1
Kollagén (III. típusú) alfa-1	COL3A1-Hs00164103_m1
EGFR (ErbB1)	EGFR-Hs00193306_m1
ErbB2	ERBB2-Hs00170433_m1
Fibronektin	FN1-Hs00277509_m1
Integrin alfa-1	ITGA1-Hs00235030_m1

Integrin alfa-3	ITGA3-Hs00233722_m1
Integrin alfa-7	ITGA7-Hs00174397_m1
Integrin béta-1	ITGB1-Hs00559595_m1
Laminin alfa-4	LAMA4-Hs00158588_m1
Laminin béta-1	LAMB1-Hs00158620_m1
MMP-2	MMP2-Hs00234422_m1
MMP-9	MMP9-Hs00234579_m1
Neurokán	NCAN-Hs00189270_m1
Szindekán-1	SDC1-Hs00174579_m1
Tenaszcin-C	TNC-Hs00233648_m1
Tenaszcin-R	TNR-Hs00162855_m1
Verzikán	VCAN-Hs00171642_m1

3. táblázat A vizsgálat gének és az RNS analízis során használt assay próbák listája.

3.1. mRNS analízis

A szövetek RNS tartalmának izolálása során az első feladat a szövetminta mechanikus porítása volt, majd ehhez hozzáadtuk a megfelelő mennyiségű Trizolt (2, illetve 3 ml TriReagens a minta nagyságától függően – Invitrogen, USA). A szövetmintát a -80°C fokos hűtőből kivéve a porításig száraz jégen tároltuk. A porításra szolgáló fémhenger alkatrészeit folyékony nitrogénben hűtöttük és két minta között 90%-os ethanollal fertőtlenítettük. A porított minta TriReagens-ben való homogenizálását késes homogenizátor alkalmazásával segítettük elő. Az így készített homogenizátum ebben a stádiumban lefagyasztható és -80°C fokon tárolható volt. A homogenizátumot 5 percig 1500g-vel centrifugáltuk majd a felülúszót átöntöttük egy új csőbe, és azzal dolgoztunk tovább. Hozzáadtunk a megfelelő mennyiségű kloroformot (1ml Trizol / 200µl kloroform), amivel jól összeráztuk. Ezután 4°C fokon 4200g-vel 20 percig centrifugáltuk. Így szétváltak a különböző fázisok: a felső vizes fázis (az RNS-t

tartalmazza), az interfázis (proteinek) és az alsó, fenolos fázis (a DNS-t tartalmazza). Az RNS-t tartalmazó áttetsző vizes fázist óvatosan egy új Eppendorf csőbe szeparáltuk. Ezután a meglévő oldott RNS-t izopropanollal (1ml Trizol / 0.5ml izopropanol) kicsaptuk. Az izopropanol hozzáadása után a mintákat összekevertük majd 10 percig szobahőn állni hagytuk, ezután hidegszobában (4°C fok) centrifugáltuk 4000g-n 15 percig. Ezután óvatosan eltávolítottuk az izopropanolt és az RNS pillethez 75%-os etanolt adtunk, amivel egy éjszakán át állni hagytuk -20°C-os hűtőben. Másnap 4°C-on 4000g-vel 15 percet centrifugáltuk a mintákat, leöntöttük az ethanol-t majd újabb 5 perces szobahőmérsékleten történő 4000g-vel történő centrifugálás után pipettával szívtuk le a maradék ethanolcseppeket. Ezt követően vegyifülke alatt kiszárítottuk az RNS pilleket ügyelve arra, hogy az összes maradék ethanol elpárologjon a csőből, de ne szárítsuk túlzott mértékben ki a pilleket. Az RNS pilleket ezután beoldottuk megfelelő mennyiségű nukleázmentes vízbe (Promega, USA). A teljes feloldáshoz mintegy 60 percre volt szükségünk, ezalatt a mintákat jégen tartottuk és a nukleázmentes vízzel gyakran átmostuk a cső belső falát. A teljes feloldódás után a mintákon mennyiségi, tisztasági (NanoDrop mérés ND-1000 spektrofotométerrel), valamint minőségi analízist (SDS gél-elektroforézis: 1,2% agaróz/1X TAE puffer 4µl 10mg/ml EtBr/100ml gél) végeztünk és a tisztítási fázisig -80°C-on tároltuk. A tisztításhoz 100µl RNS oldatot használtunk (illetve legfeljebb 100µg-ot abban az esetben, ha ez kisebb térfogatban volt benne). Ha az összmennyiség nem érte el a 100µl-t, akkor azt nukleázmentes vízzel egészítettük ki 100µl-re. Az oldathoz 350µl RLT puffert adtunk és jól összekevertük. Ezután 250µl 100%-os ethanol-t adtunk hozzá és centrifugálás nélkül, pipetta segítségével kevertük össze. Az így kapott 700µl-es oldatot az RNEasy kitben található „mini oszlop”-ra vittük fel, majd azt egy 2ml-es csőbe helyezve centrifugáltuk 15 sec-ig 8000g-vel. Ezután az oszlopot egy új 2ml-es csőbe helyeztük és 500µl RPE puffert pipettáztunk az oszlopra. Újabb 15 sec centrifugálás következett 8000g-vel. Megint 500µl RPE puffert mértünk az oszlopra és

ezt 2 percig centrifugáltuk 8000g-vel. Ezután az oszlopot egy új 1.5ml-es csőbe helyeztük és 50µl nukleázmentes vizet pipettáztunk rá. Újabb 8000g-s centrifugálás következett 1 percig. Az eluátumot felvittük az oszlopra és az utóbb említett centrifugálást újra elvégeztük. Végül koncentrációméréssel meggyőződünk a rendelkezésre álló RNS mennyiségről. Ezután a tisztított RNS mintákat visszaírtuk egyszálú cDNS-é. Ehhez minden mintából kivettünk akkora térfogatot, amiben 600ng RNS volt és ezeket kiegészítettük 10µl térfogatra nukleázmentes vízzel (minden minta esetében 10µl térfogatnál kisebb térfogatban volt a 600ng-nyi RNS mennyiség). Így tehát minden minta esetében kaptunk egy olyan oldatot, ami 10µl térfogatú volt és 600ng RNS-t tartalmazott. Ehhez hozzámértünk 10µl-t a minták hígításával párhuzamosan elkészített Master Mix-ből, amit a 15 mintához 18 szoros mennyiségben készítettünk el. A Master Mix elkészítéséhez 36µl RT puffert, 14.4µl dNTP mix-et, 36µl random primert, 18µl Multiscribe reverz transzkriptáz enzimet, 18µl RNase inhibitor, valamint 57.6µl nukleázmentes vizet használtunk fel. A 10µl-es Master Mix alikvotokat finoman összekevertük a 10µl-es RNS oldattal. Az így kapott mintánként 20µl-es oldatot PCR csövekbe mértük bele (jégen), majd behelyeztük a PCR gépbe (thermal cycler), és a következő inkubálási protokollt követtük: 1. lépés: 25°C-10 perc 2. lépés: 37°C-120 perc 3. lépés: 85°C-5 másodperc. A következő lépés a kapott cDNS-ek kvantitatív PCR analízise volt. Ehhez először mintánként elkészítettük a következő oldatot: 225µl a H12669 kódjelzéssel ellátott gyárilag elkészített Master Mix, 210µl nukleázmentes víz, valamint 15µl az előzőekben kapott RT termék (cDNS). Az össztérfogat így 450µl lett. Az oldatot vortexeltük majd pár másodpercig centrifugáltuk. Mintáink analíziséhez TaqMan Low Density Array-t (TLDA – Applied Biosystems, USA) használtunk. A mintákkal feltöltött kártyát centrifugáltuk 1000g-vel 2 perig, majd lezártuk a kártyát. A lezárt kártyát behelyeztük a 7900HT RT-PCR gépbe (Applied Biosystem, USA) és szoftveresen beállítottuk a reakciót valamint a mérés szempontjait. A mikrofluidikai kártyákat SDS 2.1

szoftver segítségével elemeztük, és a kapott relatív kvantifikációs CT értékeket használtuk fel további analízisre. A beta-aktin és a gliceraldehid 3-foszfát dehidrogenáz (GAPDH) úgynevezett háztartási gének mutatták a legkisebb eltérést a minták között, így ezeket használtuk referencia génként a deltaCT értékek meghatározására. Az expressziós értékeket az összehasonlító CT módszerrel számoltuk ki [59].

3.2. Fehérje analízis

Az RNS analízis során leírt szöveti homogenizálás után a szöveti lízishez a következő lízis puffert használtuk: 50mM Tris, 1mM EDTA, 17mM béta-merkaptotanol és 0,5% Triton-X100. A fehérje tartalmat Bradford módszerrel határoztuk meg és a tripszines emésztéshez azonos fehérje mennyiségeket mértünk ki [60]. A relatív fehérje szint meghatározáshoz selected reaction monitoring (SRM) alapú célzott proteomikai módszer lett kifejlesztve [61-65]. A fehérje koncentráció becsléséhez a kapott spektrumok görbe alatti területeit (AUC) számoltuk ki. Azokat az SRM spektrumokat használtuk fel az AUC kiszámolásához, ahol a jel intenzitása meghaladta az 500cps-t. Az adatokat Analyst1.4.2 szoftverrel dolgoztuk fel.

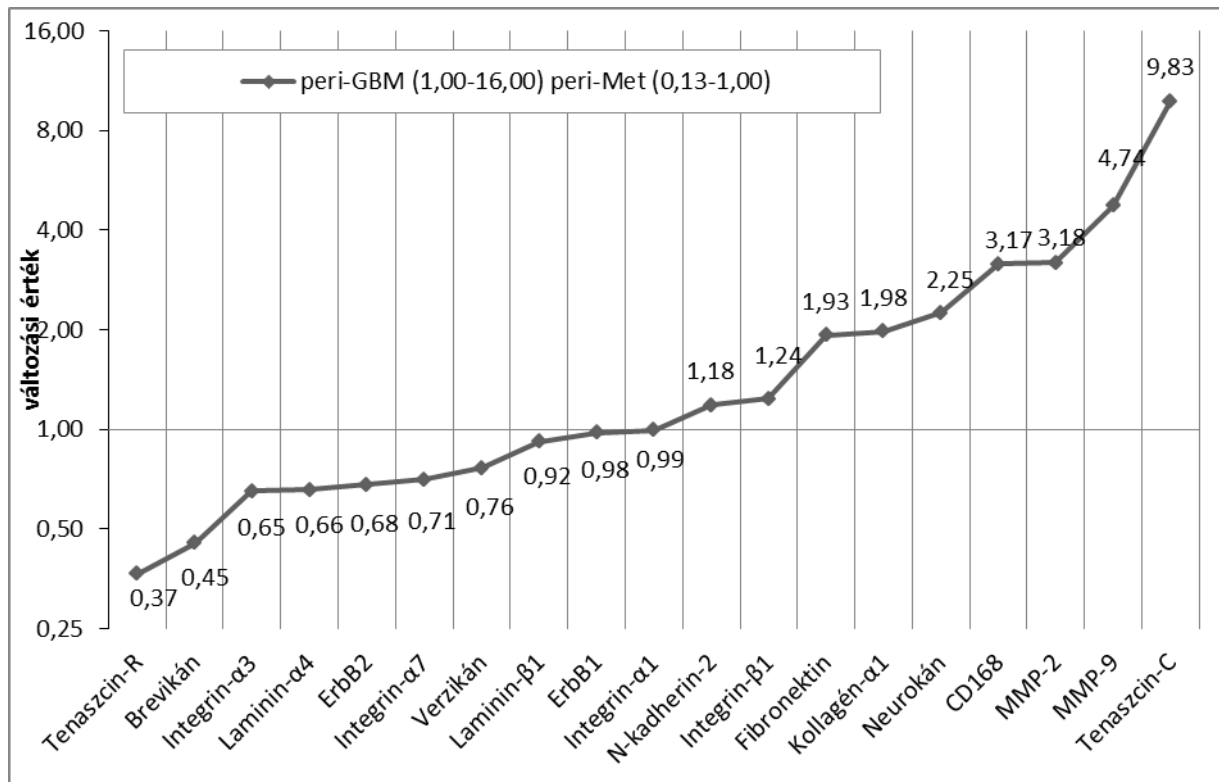
3.3. Statisztikai analízis

A szövettani csoportok között fennálló feltételezett különbség igazolására ANOVA tesztet használtunk ahol ennek a feltételei teljesültek, más esetben pedig Kruskal-Wallis tesztet. Két csoport összehasonlítása során Mann-Whitney tesztet alkalmaztunk, így tudtunk gén és fehérje szinten szignifikánsan különböző expressziós szintet azonosítani. Szignifikancia szintet $p < 0,05$ -nél határoztuk meg és a szignifikáns eltéréseknél 95%-os konfidencia intervallumot (CI) is számoltunk.

4. Eredmények

4.1. mRNS expresszió

Először 9db peri-GBM, 9db peri-Met és 9db Norm, összesen 27db minta vizsgálatát végeztük el, melyek nem tumoros agyszövetből valamint glioblasztóma, illetve agyi metasztázis peritumorális területéből származtak. A két daganattípus peritumorális mintáiban vizsgált expressziós szinteket egymáshoz, valamint a nem tumoros mintákhoz hasonlítottuk. A peri-GBM és peri-Met összehasonlításban tíz molekula mutatott relatív expressziónövekedést a peri-metasztatikus szövetben: Brevikán, ErbB1, ErbB2, Integrin alfa-1, Integrin alfa-3, Integrin alfa-7, Laminin alfa-4, Laminin béta-1, Tenascin-R, Verzikán. Kilenc gén esetében volt megfigyelhető fokozott expresszió glioblasztóma peritumorális mintáiban: N-kadherin-2, Kollagén alfa-1, Fibronektin, CD168, Integrin béta-1, MMP-2, MMP-9, Neurokán, Tenascin-C. Két esetben találtunk statisztikailag szignifikáns eltérést: a Tenascin-C (95% CI: 7,95-12,92) és a CD168 (95% CI: 2,75-4,64) expressziója szignifikánsan magasabb volt peri-GBM-ben peri-Met-hez viszonyítva (3. ábra).

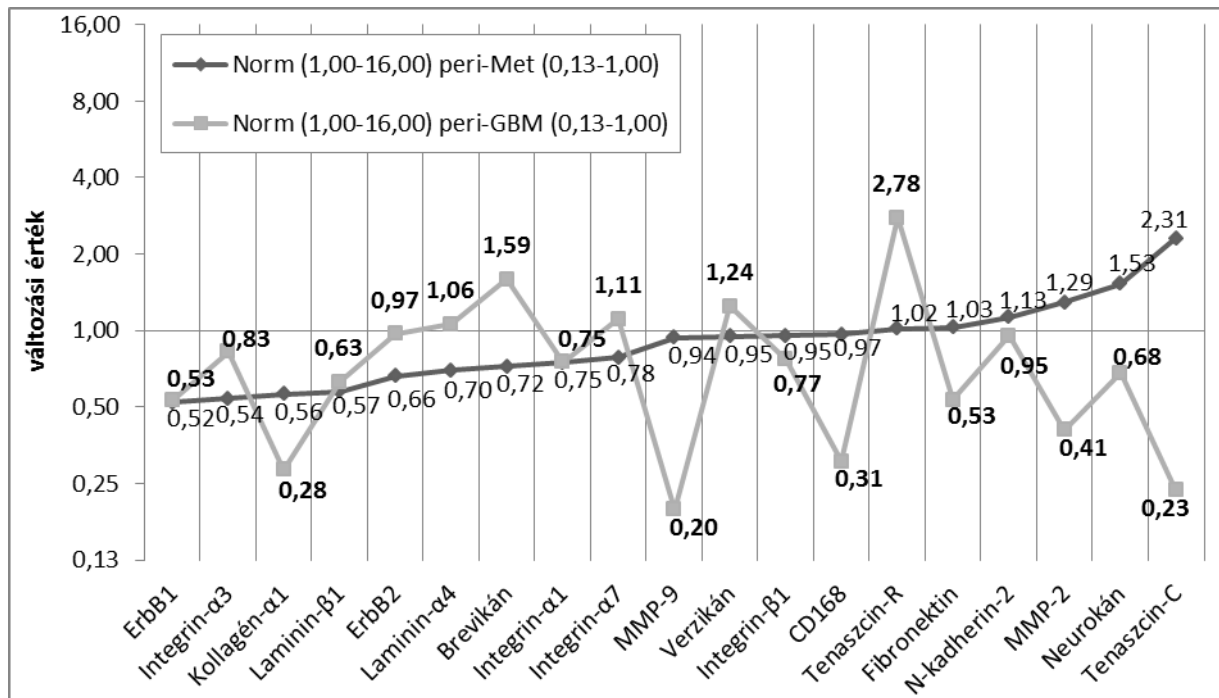


3. ábra Az invázióval összefüggésben lévő molekulák mRNA expressziós változási érték (fold change) változása log₂ alapú skálán peri-GBM és peri-Met szövetekben. A molekulák a növekvő változási értékek sorrendjében vannak. Az 1,00 alatti érték peri-Met-ben lévő fokozott expressziót, míg az 1,00 feletti érték peri-GBM-ben lévő fokozott expressziót jelent.

Amikor a Peri-GBM mintákat a Norm szövethez viszonyítottuk 14 esetben volt peritumorálisan expresszió emelkedés: N-kadherin-2, Kollagén alfa-1, ErbB1, ErbB2, Fibronektin, CD168, Integrin alfa-1, Integrin alfa-3, Integrin béta-1, Laminin béta-1, MMP-2, MMP-9, Neurokán, Tenaszcin-C, de csak a CD168 (95% CI: 0,30-0,44) esetében volt szignifikáns az emelkedés. 5 gén expressziója csökkent Peri-GBM-ben nem tumoros agyszövethez viszonyítva: Brevikán, Integrin alfa-7, Laminin alfa-4, Tenaszcin-R, Verzikán, mely közül csak a Tenaszcin-R (95 % CI: 1,40-5,11) csökkenése bizonyult szignifikánsnak. Összehasonlítva a Peri-Met és a Norm mintákat 13 molekula mRNA szintjénél találtunk Peri-Met emelkedést: Brevikán, Kollagén alfa-1, ErbB1, ErbB2, CD168,

Integrin alfa-1, Integrin alfa-3, Integrin alfa-7, Integrin béta-1, Laminin alfa-4, Laminin béta-1, MMP9, Verzikán. Emellett mindössze hat gén szintje csökkent a peritumorális szövetben Norm-hoz viszonyítva: N-kadherin-2, Fibronektin, MMP-2, Neurokán, Tenaszcin-C, Tenaszcin-R. Ebben az összehasonlításban egyik esetben sem találtunk szignifikáns eltérést (4. ábra).

Az mRNS expresszió három vizsgált mintában való összehasonlítását a 4. táblázatban foglaltuk össze.

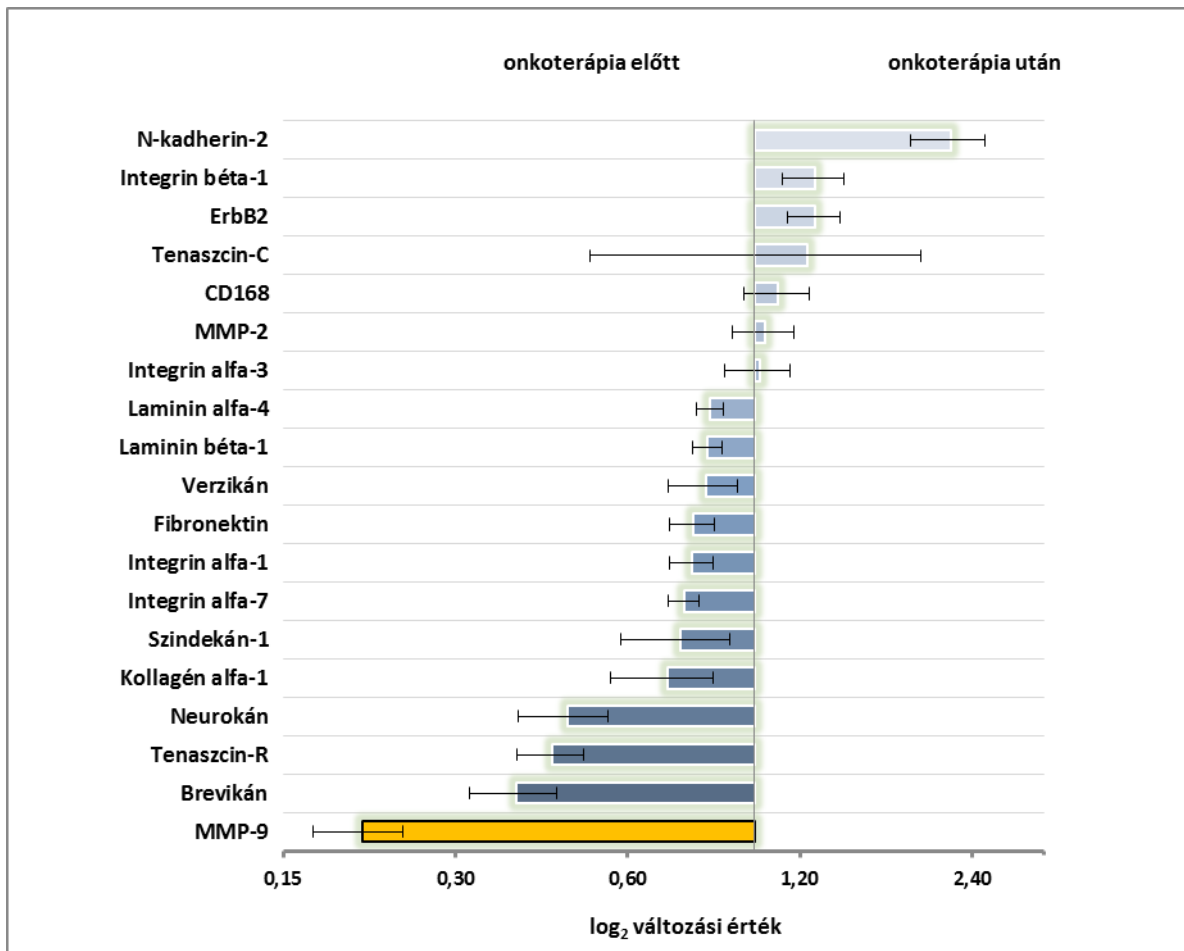


4. ábra Peri-GBM-ben és peri-Met-ben lévő molekulák mRNS expressziójának összehasonlítása nem tumoros agyszöveti expresszióval log₂ alapú skálán. A számok a két szövetbeli változási érték (fold change) különbséget mutatják. A molekulák a Norm – Peri-Met összehasonlításban lévő növekvő változási értékeik sorrendjében szerepelnek, hogy a különbségek könnyebben láthatóak legyenek.

Molekula	gén változási érték (p érték)		gén változási érték (p érték)		gén változási érték (p érték)	
	Norm	PeriMet	Norm	PeriGBM	PeriGBM	PeriMet
Brevikán		0,72 (0,133)	1,59 (0,930)			0,45 (0,093)
N-Kadherin-2	1,13 (1,000)			0,95 (0,962)	1,18 (0,736)	
Kollagén (III. típusú) alfa-1		0,56 (0,289)		0,28 (0,331)	1,98 (0,659)	
EGFR (ErbB1)		0,52 (0,093)		0,53 (0,251)		0,98 (0,791)
ErbB2		0,66 (0,377)		0,97 (0,724)		0,68 (0,596)
Fibronectin	1,03 (0,724)			0,53 (0,251)	1,93 (0,377)	
CD168		0,97 (1,000)		0,31 (0,014)	3,17 (0,039)	
Integrin alfa-1		0,75 (0,427)		0,75 (0,331)		0,99 (0,860)
Integrin alfa-3		0,54 (0,185)		0,83 (1,000)		0,65 (0,133)
Integrin alfa-7		0,78 (0,331)	1,11 (1,000)			0,71 (0,251)
Integrin béta-1		0,95 (0,427)		0,77 (0,289)	1,24 (1,000)	
Laminin alfa-4		0,70 (0,289)	1,06 (0,791)			0,66 (0,112)
Laminin béta-1		0,57 (0,093)		0,63 (0,480)		0,92 (0,377)
MMP-2	1,29 (1,000)			0,41 (0,133)	3,18 (0,052)	
MMP-9		0,94 (0,930)		0,20 (0,093)	4,74 (0,064)	
Neurokán	1,53 (0,200)			0,68 (0,486)	2,25 (0,057)	
Tenaszcin-C	2,31 (0,377)			0,23 (0,064)	9,83 (0,004)	
Tenaszcin-R	1,02 (0,791)		2,78 (0,039)			0,37 (0,061)
Verzikán		0,95 (1,000)	1,24 (1,000)			0,76 (0,886)

4. táblázat Az mRNA expresszió összehasonlítása a vizsgált molekulákban Norm, Peri-Met és Peri-GBM szövetekben a változási értékekkel (fold change) és a p értékekkel feltüntetve. A szignifikáns változások vastag kerettel kiemelve láthatóak.

Az onkoterápia előtti és utáni glioblasztómák összehasonlítása során a kezelt mintákban a 19 vizsgált molekulából 12 molekula RNS szintje csökkent: Brevikán, Kollagén alfa-1, Fibronectin, Integrin alfa-1, Integrin alfa-7, Laminin alfa-4, Laminin béta-1, MMP-9, Neurokán, Szindekán-1, Tenaszcin-R, Verzikán, míg 7 molekula transzkriptumában láttunk emelkedést: N-kadherin-2, CD168, ErbB2, Integrin alfa-3, Integrin béta-1, MMP-2, Tenaszcin-C (5. ábra). Az MMP-9 expressziócsökkenéséből bizonyult szignifikánsnak (95% CI: 0.13 – 0.26).



5. ábra Az ECM molekulák RNS változási érték (fold change) változásai onkoterápia előtti valamint utáni glioblasztóma multiforme minták között log₂ skálán a standard hibákkal együtt feltüntetve. A balra mutató sávok magasabb kezelés előtti szintet jelentenek, míg a jobbra mutatók onkoterápia utáni magasabb expressziót. A szignifikáns változást narancssárga színnel jelöltük.

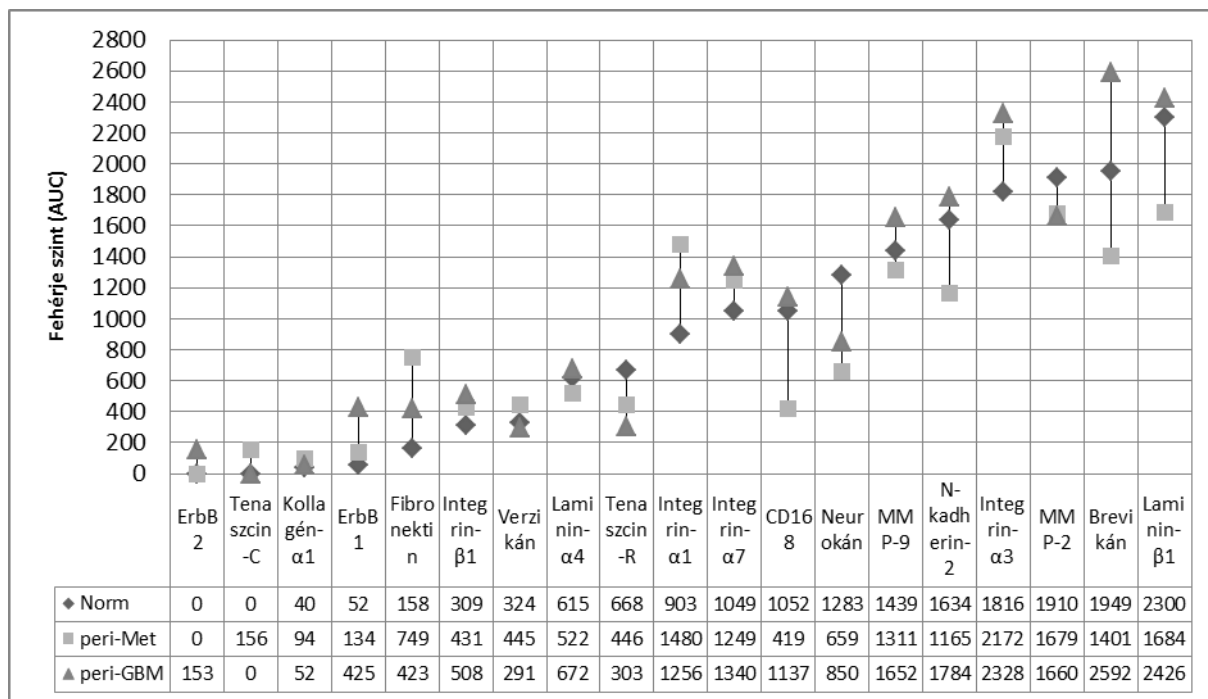
4.2. Fehérje szintek

Miután megadtuk az mRNS expressziós szinteket ún. jelölés nélküli SRM alapú kvantitatív fehérje analízist végeztünk el, hogy az információval szolgáljon nekünk a transzlációs fázisról és ezáltal lássuk az mRNS szintek változásának fehérje szintű manifesztációit.

Az ErbB2, a Szindekán-1 és a Tenaszcin-C kivételével mindegyik gén fehérjéjét meg tudtuk határozni. A peritumorális minták összesített eredményeit az 5. táblázat és a 6. ábra mutatja.

	Norm - PeriMet		Norm - PeriGBM		PeriGBM - PeriMet	
	RNS	fehérje	RNS	fehérje	RNS	fehérje
Brevikán	↓	↑	↑	↓	↓	↑
N-Kadherin-2	↑	↑	↓	↓	↑	↑
Kollagén- α 1	↓	↓	↓	↓	↑	↓
ErbB1	↓	↓	↓	↓	↓	↑
ErbB2	↓	-	↓	↓	↓	↑
Fibronektin	↑	↓	↓	↓	↑	↓
CD168	↓	↑	↓	↓	↑	↑
Integrin- α 1	↓	↓	↓	↓	↓	↓
Integrin- α 3	↓	↓	↓	↓	↓	↑
Integrin- α 7	↓	↓	↑	↓	↓	↑
Integrin- β 1	↓	↓	↓	↓	↑	↑
Laminin- α 4	↓	↑	↑	↓	↓	↑
Laminin- β 1	↓	↑	↓	↓	↓	↑
MMP-2	↑	↑	↓	↑	↑	↓
MMP-9	↓	↑	↓	↓	↑	↑
Neurokán	↑	↑	↓	↑	↑	↑
Tenaszcin-C	↑	-	↓	-	↑	-
Tenaszcin-R	↑	↑	↑	↑	↓	↓
Verzikán	↓	↓	↑	↑	↓	↓

5. táblázat A kiválasztott ECM molekulák expressziós változásai RNS és fehérje szinteken normál és peritumorális szövetekben. A felfelé mutató nyilak az expresszió növekedését, míg a lefelé mutatók az expresszió csökkenését jelzik az első szövettani típusban a másodikhoz viszonyítva. A csíkozott részek az azonos irányú változást (RNS és fehérje szinteken) mutatják. A szignifikáns eltéréseket kiemelt keretek jelzik.



6. ábra A vizsgált 19 molekula fehérje szintjei peri-GBM-ben, peri-Met-ben és Norm agyszövetben.

Peri-GBM ill. peri-Met korrelációban 11db ECM fehérje mennyisége volt emelkedett glioblasztóma esetében, amiből 5db mutatott az mRNS értékekkel megegyező irányú változást: N-kadherin-2, CD168, Integrin béta-1, MMP9, Neurokán. A CD168 emelkedés szignifikánsnak bizonyult (95% CI: 325,9-1109,1) csakúgy, mint gén szinten. A metasztázis körül 6db fehérje szintjének emelkedését detektáltuk, amiből 3db volt az mRNS változással megegyező: Integrin alfa-1, Tenaszcin-R, Verzikán. A Fibronektinszint növekedés peri-Met-ben szignifikáns volt (95% CI: [-642,5]-[-10,5]), azonban ennek a molekulának az mRNS szintje a mérések során csökkenést mutatott. Nem tumoros agyszövethez viszonyítva peri-GBM mintákban 13db fehérje szintje volt nagyobb, amiből 10db a génexpressziókkal megegyező változást mutatott: N-kadherin-2, Kollagén alfa-1, ErbB1, Fibronektin, CD168, Integrin alfa-1, Integrin alfa-3, Integrin béta-1, Laminin béta-1, MMP9. Mindössze 4db fehérje koncentrációja volt magasabb Norm szövetben, ebből 2db mutatott konkordanciát:

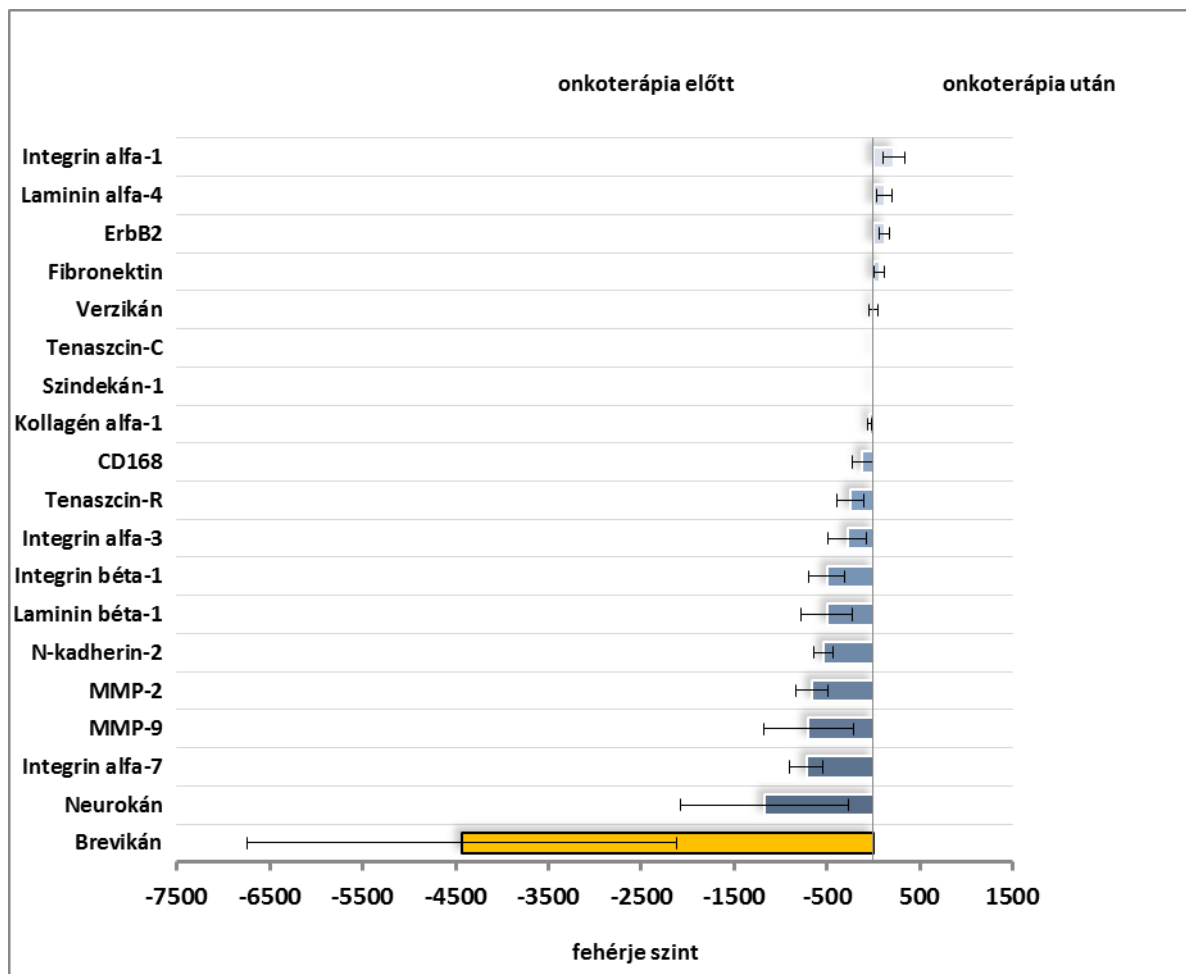
Tenaszcin-R, Verzikán. Szignifikáns eltérést nem lehetett detektálni. PeriMet és Norm összehasonlításban 8db fehérje szintje emelkedett meg a peritumorális szövetben, 7 esetben konkordanciával: Kollagén alfa-1, ErbB1, Integrin alfa-1, Integrin alfa-3, Integrin alfa-7, Integrin béta-1, Verzikán. A peri-GBM – peri-Met korrelációhoz hasonlóan a Fibronektinszintemelkedés itt is szignifikáns volt annak ellenére, hogy gén szinten ugyanúgy csökkenést detektáltunk. PeriMet-ben nem tumoros mintákhoz képest csökkent koncentrációt mértünk 9db fehérje esetében, ebből 4db csökkenés volt az mRNS változással megegyező irányú: N-kadherin-2, MMP-2, Neurokán, Tenaszcin-R. Ez utóbbi esetben sem találtunk szignifikáns eltérést.

A fehérje szintek három vizsgált mintában való összehasonlítását a 6. táblázat tartalmazza.

Molekula	fehérje szint (p érték)		fehérje szint (p érték)		fehérje szint (p érték)	
	Norm	PeriMet	Norm	PeriGBM	PeriGBM	PeriMet
Brevikán	548 (0,214)		643 (0,795)		1191 (0,623)	
N-Kadherin-2	469 (0,225)		150 (0,840)		619 (0,386)	
Kollagén (III. típusú) alfa-1		54 (1,000)	12 (1,000)			42 (1,000)
EGFR (ErbB1)		83 (1,000)	373 (0,155)		290 (0,180)	
ErbB2		- -	- -		- -	
Fibronektin		591 (0,007)	265 (0,639)			327 (0,014)
CD168	633 (0,219)		85 (0,611)		718 (0,047)	
Integrin alfa-1		577 (0,150)	353 (0,231)			224 (0,506)
Integrin alfa-3		356 (0,453)	512 (0,236)		156 (0,977)	
Integrin alfa-7		200 (0,931)	291 (0,619)		91 (1,000)	
Integrin béta-1		122 (0,498)	198 (0,318)		77 (0,688)	
Laminin alfa-4	93 (0,637)		57 (0,879)		150 (0,879)	
Laminin béta-1	616 (0,339)		126 (0,885)		743 (0,193)	
MMP-2	230 (0,707)		250 (0,885)			19 (0,728)
MMP-9	127 (0,583)		214 (0,436)		341 (0,312)	
Neurokán	624 (0,378)		433 (0,480)		191 (0,764)	
Tenaszcin-C		-	- -		- -	
Tenaszcin-R	222 (0,390)		365 (0,371)			143 (0,820)
Verzikán		121 (0,850)	33 (0,629)			154 (0,618)

6. táblázat. A molekulák fehérje szintjeinek alakulása a vizsgált 3 szövet-típusban (Norm, Peri-Met, Peri-GBM) a p értékekkel feltüntetve. A szignifikáns változásokat vastag keretek jelzik.

A glioblasztóma onkoterápiájának hatását tanulmányozva 12 vizsgált fehérje szintje csökkent: Brevikán, N-kadherin-2, CD168, Kollagén alfa-1, ErbB2, Integrin alfa-3, Integrin alfa-7, Integrin béta-1, Laminin béta-1, MMP-2, MMP-9, Neurokán, Tenaszcin-R, 5 gennél pedig a fehérje koncentráció növekedését tapasztaltuk: ErbB2, Fibronektin, Integrin alfa-1, Laminin alfa-4, Verzikán (7. ábra). A Szindekán-1 és a Tenaszcin-C a kezelés utáni mintákban nem volt detektálható. A Brevikán szintje onkoterápia után szignifikáns csökkenést mutatott. (95% CI: [-8857.43]–[-7.46]).



7. ábra. A vizsgált molekulák fehérje szintjeinek változásai onkoterápia előtt és után a standard hibákkal együtt feltüntetve. A molekulák a változás mértékének sorrendjében szerepelnek. A balra néző sávok magasabb kezelés előtti szintet jelentenek, míg a jobbra mutatók a kemoirradiáció utáni fokozott expressziót. A narancssárga szín jelzi a szignifikáns változást.

Az expressziós változásokat RNS és fehérje szinten együtt elemezve 8 esetben látható konkordáns változás (7. táblázat). A Brevikán, Kollagénalfa-1, Integrin alfa-7, Laminin béta-1, MMP-9, Neurokán, Tenaszcin-R a kezelt mintákban mindkét vizsgálatban konzekvens expressziócsökkenést mutatott, ezzel ellentétben az ErbB2-nél a transzkripció és a transláció során is emelkedés volt megfigyelhető. A statisztikai elemzések során az eltérések mindössze 2 esetben bizonyultak szignifikánsnak: RNS szinten a MMP-9 (fold change: 0.21 p érték: 0.006 95%-os CI: [0.13] - [0.26]), protein szinten pedig a Brevikán (prot. level:-4432,44 p érték: 0.006 95%-os CI: [-8857,43] - [-7,46]) csökkent szignifikáns mértékben az onkoterápiát követően.

Molekula	RNS		FEHÉRJE		RNS	FEHÉRJE
	változási érték	p érték	változási érték	p érték		
MMP-9	0,21	0,006	-696,52	0,767	↓	↓
Brevikán	0,38	0,149	-4432,44	0,006	↓	↓
Tenaszcin-R	0,44	0,260	-248,43	0,597	↓	↓
Neurokán	0,47	0,244	-1174,38	0,716	↓	↓
Kollagén alfa-1	0,70	0,540	-35,47	0,806	↓	↓
Szindekán-1	0,74	0,678	0,00	0	↓	-
Integrin alfa-7	0,75	0,161	-720,12	0,113	↓	↓
Integrin alfa-1	0,78	0,228	218,80	0,575	↓	↑
Fibronectin	0,78	0,395	68,87	0,753	↓	↑
Verzikán	0,82	0,859	1,70	0,909	↓	↑
Laminin béta-1	0,83	0,185	-499,08	0,223	↓	↓

Laminin alfa-4	0,84	0,374	124,27	0,766	↓	↑
Integrin alfa-3	1,02	0,621	-279,55	0,307	↑	↓
MMP-2	1,04	0,859	-660,13	0,093	↑	↓
CD168	1,10	0,737	-116,92	0,482	↑	↓
Tenaszcin-C	1,24	0,984	0,00	0	↑	-
ErbB2	1,27	0,429	121,35	0,503	↑	↑
Integrin béta-1	1,28	0,199	-496,82	0,112	↑	↓
N-Kadherin-2	2,20	0,334	-538,95	0,166	↑	↓

7. táblázat. A kiválasztott ECM molekulák RNS és fehérje szintű expresszióváltozásai kezeletlen valamint sugár- és kemoterápián átesett glioblasztóma multiforme minták között p értékkel. A szürke sorok az RNS és fehérje szinten is egyirányú változást mutató molekulákat jelölik, a narancssárga kijelölés pedig a szignifikáns változást jelenti.

5. Megbeszélés

Az ECM az elmúlt időben számos kutatás középpontjában állt, így rendkívül sok új információ áll rendelkezésre, ami szerkezeti részleteire, tulajdonságára illetve a különböző fiziológiás és pathológiás folyamatokban betöltött szerepére vonatkozik. Sokáig úgy vélték, hogy az ECM főleg strukturális szereppel bír, azonban az utóbbi időben egyre világosabbá vált, hogy nélkülözhetetlen a sejtek környezetükkel való funkcionális kapcsolatához. Bebizonyosodott, hogy az ECM-alkotóknak létfontosságú szerepe van például az egyedfejlődés irányításában, a sejt migrációban, a sejtek érésében és differenciálódásában, a sejt-túlélésben, a szöveti homeosztázis fenntartásában, a tumoros sejtek inváziójában, és még sok egyéb folyamatban. A mátrixban bekövetkezett bármely öröklött vagy szerzett strukturális defektus olyan sejt- és szövetszintű változásokat okoz, ami meglévő betegségek súlyosbodásához, illetve új betegségek kialakulásához vezet [66]. Például a nem megfelelő laminin termelése hibás izomstruktúrához vezet, ami izomdisztófiát hoz létre.

Annak ellenére, hogy központi idegrendszerben található ECM nagymértékű hasonlóságot mutat más szövet ECM-éhez, a molekuláris összetételben mégis határozott különbséget lehet felfedezni, sőt néhány komponens csak az agyban található meg. Például az agyi ECM relatíve kis mennyiségű rostképző fehérjét és nagy mennyiségű GAG-t tartalmaz. Az idegsejtek membránjához közel az ECM sűrűbbé válik, és bazálmembránt formál, ami főleg kollagénekből, glikoproteinekből, különösen tenaszcinokból valamint kondroitin szulfát és heparán szulfát proteoglikánokból (verzikán, neurokán, aggregán, neuroglükán-C, perlekán, agrin), hialuronsavból és sejtadhéziós molekulákból áll. Fontos szerepük van emellett többek között a kadherineknak, elasztinnak, CD44 sejt felszíni receptornak, matrillinnak, szindekánnak, aquaporinoknak, agrinnak, TGF β -nak és a mátrix metalloproteinázoknak is. Amellett, hogy az ECM-nek fontos funkciója van az embriogenezisben, a daganatok progressziójához is elengedhetetlen. A sejt-sejt és sejt-ECM interakciók révén valósul meg a daganatok invazív tulajdonsága, a tumoros környezeti infiltráció.

Kutatásunk során az invázióval összefüggő ECM komponenseket és transzmembrán receptorokat vizsgáltunk primer (glioblasztóma) és szekunder (adenokarcinóma metasztázis) agyi daganatoknál, egyrészt azok peritumorális területében másrészt az infiltratív daganat állományában standard onkoterápia előtt és után. Az mRNA expressziós mintázat létrehozása és a fehérje szintek kvantifikálásának eredményeképpen több ECM alkotó elem és receptor is összefüggésbe volt hozható a peritumorális invázióval. Egyes molekulák mRNA és fehérje szinten is azonos irányú változást mutattak, emellett néhány szignifikánsan eltért a különböző vizsgált szövettani csoportokban. Egyértelmű különbségeket találtunk a peritumorális szövetekben, azokat akár egymáshoz, akár tumormentes agyszövethez hasonlítottuk.

5.1. Glioblasztóma peritumorális zónája

5.1.1. Tenaszcinok és CD168

A tenaszcinok öt féle tagból (tenaszcin-C, -R, -X, -Y, -W) álló nagyméretű extracelluláris mátrix glikoprotein családot alkotnak. Közülük a különböző ún. alternative splicing során létrejött többféle izoformával rendelkező tenaszcin-C (TNC) kulcsszereppel rendelkezik az embriogenezisben, sebgyógyulásban, valamint a tumorprogresszióban. A tenaszcin-C-t számtalan embrió- és felnőtt szövetből izolálták már, például hámszövetből, simaizom sejtekből és bizonyos daganatokból. Ez a molekula az integrinokkal, kollagénnel, proteoglikánokkal valamint a fibronectinnel lép kapcsolatba. A sejt-környezettől függően funkcionálhat adhezív vagy antiadhezív fehérjeként is, és oldott formában gátolja a fibroblasztok fibronectinnel borított felületen történő adhézióját és vándorlását. Az embriogenezis során először a tenaszcin-C detektálható, majd később az érett szervezetben a tenaszcin-R megjelenésével párhuzamosan eltűnik. A tenaszcin-C érett, normál agyban általában nincs, de megtalálható sérülést követően, illetve tumorsejtek bazál laminájában, ahol gátolják a fibronectin és a szindekán-4 közötti kapcsolatot elősegítve ezzel a daganat növekedését és metasztázis létrejöttét [67]. Malignus gliómákban a TNC autokrin módon növeli a glióma sejtek invazivitását, létrehozva egy reaktív változást a tumor körüli agyszövetben. Hirata és munkatársai azt találták, hogy a TNC expresszió arányos az MRI képeken lévő peritumorális reaktív elváltozások nagyságával és a glioblasztóma betegek prognózisával [68]. Herold – Mende és munkatársai egyenes arányosságot találtak a TNC szint emelkedése és a daganat malignitása között [69]. A tenaszcin család egy másik tagjáról, a tenaszcin-R-ről (TNR) bizonyosodott be, hogy fontos szereppel bír a központi idegrendszer kialakulásában, regeneráció során, valamint többféle sejt-mátrix interakcióban pl. a tumorsejtek adhéziójában és migrációjában. Mind mRNS mind fehérje szinten a TNR szint növekedése figyelhető meg pilocitás (WHO Gr. I.) asztrocitómákban glioblasztómákkal

szemben. Ezzel megegyezően a TNR expresszió csökkenését írták le az asztrociter tumorok grádusának emelkedésekor [70].

A CD168 (úgy is ismert, mint HMMR vagy RHAMM) egy hyaluronsav receptor, ami hatással van a sejtek közötti kommunikációra, a migrációra, ezzel segítve az angiogenezist és a metasztázisok kialakulását [71]. A CD168 kapcsolatba lépve az aktinnal a kalmodulinnal, mikrotubulusokkal és más mitózishoz kapcsolódó struktúrával expresszió emelkedést mutatott agresszív daganatokban [72].

Ami a peri-GBM mintákat illeti a vizsgált molekulák nagy része nem mutatott szignifikáns eltérést kivéve a Tenascin-C és a CD168 emelkedését valamint a Tenascin-R csökkenését. Ez alapján feltételezzük, hogy a glioblasztómát körülvevő agyszövet ECM-je nem reagál határozottan a daganat terjeszkedésére. Valószínűleg ezzel magyarázható, hogy az ECM nem tudja megfelelően megakadályozni a tumorsejtek peritumorális szövetbe történő invázióját. Az eredmények emellett kiemelik ezenhárom molekula glióma sejt invázióban betöltött szerepét. A tenascin-R gén szignifikáns leszátyozása peri-GBM-ben feltehetően az inváziós potenciál növekedésének és a malignus viselkedésnek a jele. Tehát a TNR akadályozza a peritumorális inváziót, míg a TNC segítheti azt.

5.1.2. MMP-9

Bizonyos enzimek szintén nagy hatással bírnak a peritumorális invázióra. A mátrix metalloproteináz család úgy járul hozzá a daganat progresszióhoz, hogy különböző ECM komponenseket és sejtfelszíni receptorokat tud lebontani és átalakítani, ezáltal újrendezi a mátrixot, így segítve elő a sejtek közötti kommunikációt. Ami az MMP család zselatináz csoportját illeti Veeravalli szerint az MMP9-nek nagy hatása van a glióma sejtek migrációjára és inváziójára [73]. Mi az MMP9 nagymértékű emelkedését tapasztaltuk periGBM-ben mind

RNS mind fehérje szinten, ami feltehetően a peritumorális szövetbe történő tumor inváziót segíti, bár szignifikanciát nem találtunk.

5.2. Metasztázis peritumorális zónája

5.2.1. Fibronektin

A fibronektin egy olyan ECM gliokoprotein dimer ami integrin sejtreceptorokhoz és más mátrix komponenshez (fibrin, kollagén, stb.) kötődik. A sejtadhéziót, migrációt és differenciálódást segítve kulcsszerepet játszik az embriogenezisben, sebgyógyulásban, daganatnövekedésben és áttétek kialakulásában. A gliómákban a fibronektin expressziója emelkedik, elősegítve ezzel a sejt migrációt és az inváziót egyenes arányban a tumor grádussal [74]. Másfelől Sabari és munkatársai vizsgálatai alapján a fibronektinben gazdag mátrix jelentősen gátolhatja a glioblasztóma sejtek szétszóródását [75]. Mi szignifikánsan alacsonyabb fibronektin fehérje szintet detektáltunk periGBM-ben mint peri-Met-ben, mely alapján valószínűsíthető, hogy a fibronektin gátolja a tumorsejtek szomszédos agyszövetbe történő migrálását.

Azok a molekuláris változások, amelyek a perimetasztatikus régióban jönnek létre gyaníthatóan csökkentik a tumorinfiltrációt feltehetően létrehozva egy olyan peritumorális „hálót” a metastázis körül, ami gátolja a tumorsejtek terjedését. A fibronektin metastázis körüli egyértelműen emelkedett szintje egy korai lépésként hozzájárulhat az áttét kialakulásához segítve a metastatikus sejteket a megtapadásban, a letapadásban és a tumorfészkek kialakításában. Ez a hipotézis összhangban van Paget „mag és föld” elméletével [76]. Az mRNS expresszió emelkedés hiánya a magas fehérjeszintek mellett a fibronektin egy

másodlagos koncentrációját feltételezi, ami származhat a tumorból, de ez további vizsgálatokat igényel.

Összességében elmondható, hogy az intracerebrális daganatok peritumorális ECM-jének vizsgálata olyan molekulákat tudott azonosítani, amelyek feltehetően (pozitív vagy negatív) hatással vannak az inváziós folyamatra.

5.3. Onkoterápia okozta változások

A GBM kezelését sokáig a műtéti reszekció és az azt követő sugárkezelés jelentette [77]. A képképző eszközök fejlődésének köszönhetően a standard teljes agyi besugárzási protokollt később felváltotta a konformális fokális agyi besugárzás. Emellett számos kísérlet folyt a dóziseszkaláció, a sugársebészet és a brachyterápia terén, azonban egyik sem váltotta be igazán a hozzá fűzött reményeket, így a ma elfogadott protokoll a $2 \times 30 = 60$ Gy konformális besugárzást tartalmazza [78,79]. A terápiás stratégia később a különböző kemoterápiás szerek megjelenésével bővült, melyek önmagukban, vagy a besugárzással kombinálva kerültek alkalmazásra. Az úgynevezett temozolomid előtti időszakban számos kemoterápiás szert (platinoidek, taxánok, topoizomeráz inhibitorok, egyéb alkiláló szerek) alkalmaztak a glioblasztóma kezelésében, 2005 óta azonban a temozolomiddal történt kemoirradiáció képezi a standard kezelés alapját [80].

A jelenlegi, nem kellően effektív terápia mellett felmerült az igény a glioblasztómák génexpressziós és fehérje változásainak feltérképezésére: többek között a sejtmotilitás, a membránösszetétel, valamint az extracelluláris mátrix felépítésének olyan jellegű változásaira, melyek hatással lehetnek a glioblasztóma sejtek infiltrációjára és ezáltal meghatározhatják a kezelés hatékonyságát. Ezen változások mélyebb ismerete megismertetheti a jelenlegi protokoll korlátait és utat nyithat új kutatási célpontok

kitűzéséhez. Jelenleg kevés ismerettel rendelkezünk a konkuráló kezelés okozta részletes molekuláris mechanizmust illetően, a kezelés infiltrációra gyakorolt hatása sem tisztázott, és az eddigi vizsgálatok döntően sejtenyészeteken, nem pedig emberi agyszöveten történtek.

Vizsgálatunkban ennek a kezelésnek az invázióra gyakorolt hatását elemeztük: az onkoterápiát követően mindössze az MMP-9 RNS szintje és a Brevikán fehérje szintje mutatott szignifikáns csökkenést. A többi vizsgálat molekula esetében nem volt szignifikáns változás.

Mint ECM degradáló enzim, az MMP-9 szintje glioblasztómákban emelkedést mutat a normál agyszövethez képest. Trog D. és mtsai temozolomid és besugárzás hatását vizsgálták glioblasztóma sejtvonalon és a kezelést túlélő sejtekben szignifikáns metalloproteináz emelkedést tapasztaltak, ami korrelált az agresszív, infiltratív tulajdonsággal [81]. A mi eredményünkben a MMP-9 onkoterápia után RNS szinten sokkal nagyobb csökkenést mutatott, mint fehérje szinten. Ez feltehetően annak a következménye, hogy a tumorellenes szerek javarészt a DNS replikációt érintik és kevésbé hatnak a fehérje szintre.

A Brevikán fehérjeszintű csökkenése összevág Nakada M. és mtsai valamint Held-Feindt J. és mtsai eredményeivel, akik a glioblasztómában pozitív összefüggést találtak a brevikán szint csökkenése és a sejtinvázió között [82,83]. Tanulmányunkban az onkoterápia következtében szignifikánsan lecsökkent Brevikán szint azt feltételezi, hogy a konkuráló kemoterápiának nincs hatása a tumoros invázióra.

Eredményeink alapján tehát feltételezhető, hogy a konkuráló kemoirradiáció nem hat lényegesen a glioblasztóma sejtek inváziójára és a kezelés hatására valószínűleg egy agresszívabb, nagyobb inváziós potenciállal bíró szubpopuláció szelektálódik ki. Mindezeket figyelembe véve kutatásunk hozzájárul a GBM kezelése alapvető sikertelenségének megértéséhez, emellett pedig új, célzott anti-inváziós kezelések kifejlesztésének szükségességét támasztja alá.

6. Összefoglalás

A glioblasztóma multiforme (GBM) a leggyakoribb felnőttkori elsődleges agydaganat, és egyike a legrosszabb prognózisú betegségeknek. Törvényszerű kiújulásának egyik feltételezett oka a tumor kifejezett infiltratív jellege. A környezetet beszűrő tumorsejtek változást hoznak létre a peritumorális mátrix komponensek expressziójában. A GBM kezelésében a standard konkuráló kemoirradiáció hónapokat növelt ugyan az átlagos és a progressziómentes túlélésen, de átütő sikert nem ér el. A temozolomid-ra épülő kemoterápia ineffektivitásának egyik feltételezett oka, hogy az antiproliferatív kezelés nem hat lényegesen a daganatsejtek infiltrációjára. Az invazivitás okozta peritumorális szöveti változásra és az invazivitás onkoterápiára bekövetkező esetleges megváltozására molekuláris szinten a peritumorális agyszövetben és a daganatban lévő extracelluláris mátrix alkotóelemeinek expressziós szintjében bekövetkezett változások utalhatnak. Erre fókuszálva jelen munkánkban 20 db invázióhoz köthető molekula mRNS és fehérje szintjét határoztuk meg, azRNS szinteket Q-PCR, a fehérje szinteket pedig kvantitatív proteomikai analízis segítségével. A molekulákat tumormentes agyszövetben (Norm/9db), glioblasztóma (Peri-GBM/9db) és intracerebrális adenokarcinóma metasztázis (Peri-Met/9db) peritumorális agyszövetében valamint konkuráló kemoirradiáció előtti (kezeletlen/15db) és utáni (kezelt/16db) glioblasztóma mintákban vizsgáltuk. Létrehozva a vizsgált szövetek inváziós mintázatát eredményeink több ECM molekulát is kiemelnek, amelyek feltehetően szerepet játszanak a metasztázisok inváziójának megakadályozásában és a glioblasztóma sejtek migrációjának gátlási képtelenségében: CD168, Fibronektin, MMP-9, Tenascin-C, Tenascin-R. Emellett feltételezhető, hogy a kemoirradiationak nincs lényeges hatása a glioblasztómák extracelluláris mátrixának összetételére és ezáltal nem hat érdemlegesen a

daganat infiltratív jellegére. Véleményünk szerint az antiproliferatív ágensek antiinvazív készítményekkel való kiegészítése a GBM kezelésében megfontolást érdemel.

7. Summary

Glioblastoma multiforme (GBM) is the most common primary adult central nervous system tumor and has more or less the worst prognosis among all neoplasms. One of the possible reasons of its obligatory recurrence is the infiltrative nature of the tumor. By invading the surrounding tissue, the neoplastic cells alter the expression of the extracellular matrix (ECM) components in the peritumoral area. The gold standard therapy of GBM only slightly improved the overall- and progression-free survival. The eventual ineffectiveness of temozolomide-based therapy can be due to its anti-proliferative feature, that can not dramatically affect the infiltration of the tumor cells. Molecular changes of invasiveness in the peritumoral area under oncotherapy can be judged by expressional alterations of the ECM components in the tumor tissue and the surrounding space. Thus the mRNA and protein levels of 20 invasion-linked molecules were measured with Q-PCR and quantitative proteomic analysis. The examined tissues were: tumor-free brain tissue (9 samples), peritumoral area of GBM (9 samples), peritumoral area of intracerebral pulmonary adenocarcinoma metastasis (9 samples), GBM tumor before concurrent chemoradiation (15 samples) and GBM tumor after concurrent chemoradiation (16 samples). By establishing the invasional pattern of the studied tissues the results highlighted numerous molecules that can play a possible role in the invasional arrest of the metastasis and the incapacity of the GBM cell migration. These molecules are: CD168, Fibronectin, MMP-9, Tenascin-C and Tenascin-R. Moreover according to our results the chemoradiation presumably has no significant impact on the

composition of the GBM-ECM and hereby no essential influence on the infiltrative feature of GBM. In our opinion the expansion of the present anti-proliferative agents with anti-invasional products should be considered during GBM treatment.

8. Irodalomjegyzék

1. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ohgaki H, Wiestler OD, Kleihues P, Ellison DW (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol* 131(6):803-20.
2. Gurney JG, Kadan-Lottick N (2001) Brain and other central nervous system tumors: rates, trends, and epidemiology. *Curr Opin Oncol* 13(3):160-6.
3. Laperriere N, Zuraw L, Cairncross G (2002). Radiotherapy for newly diagnosed malignant glioma in adults: a systematic review. *Radiother Oncol* 64:259–273.
4. Jennings MT, Iyengar S (2001) Pharmacotherapy of malignant astrocytomas of children and adults: current strategies and future trends. *CNS Drugs* 15:719–743.
5. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ (2005) Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolimide for glioblastoma. *N Engl J Med* 352:987–996.

6. Newlands ES, Stevens MFG, Wedge SR, Wheelhouse RT, Brock C (1997) Temozolomide: A review of its discovery, chemical properties, pre-clinical development and clinical trials. *Cancer Treat Rev* 23:35-61.
7. Mannas JP, Lightner DD, DeFRates SR, Pittman T, Villano JL (2014) Long-term treatment with temozolomide in malignant glioma. *J Clin Neurosci* 21(1):121-3.
8. Garside R, Pitt M, Anderson R, Rogers G, Dyer M, Mealing S, Somerville M, Price A, Stein K (2007) The effectiveness and cost-effectiveness of carmustine implants and temozolomide for the treatment of newly diagnosed high-grade glioma: a systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess* 11(45):III-IV, IX-221.
9. Koukourakis GV, Kouloulis V, Zacharias G, Papadimitriou C, Pantelakos P, Maravelis G, Fotineas A, Beli I, Chaldeopoulos D, Kouvaris J (2009) Temozolomide with radiation therapy in high grade brain gliomas: pharmaceutical considerations and efficacy; a review article. *Molecules* 14(4):1561-77.
10. Choi EJ, Cho BJ, Lee DJ, Hwang YH, Chun SH, Kim HH, Kim IA (2014) Enhanced cytotoxic effect of radiation and temozolomide in malignant glioma cells: targeting PI3K-AKT-mTOR signaling, HSP90 and histone deacetylases. *BMC Cancer* 14:17.
11. Chaichana KL, Zadnik P, Weingart JD, Olivi A, Gallia GL, Blakeley J, Lim M, Brem H, Quiñones-Hinojosa A (2013) Multiple resections for patients with glioblastoma: prolonging survival. *J Neurosurg* 118(4):812-20.

12. Nayak L, Lee EQ, Wen PY (2012) Epidemiology of brain metastases. *Curr Oncol Rep* 14(1):48-54.
13. Fox BD, Cheung VJ, Patel AJ, Suki D, Rao G (2011) Epidemiology of metastatic brain tumors *Neurosurg Clin N Am*22(1):1-6.
14. Bellail AC, Hunter SB, Brat DJ, Tan C, Van Meir EG. Microregional extracellular matrix heterogeneity in brain modulates glioma cell invasion. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36:1046-1069.
15. Varga I, Hutóczki G, Petrás M, Scholtz B, Mikó E, Kenyeres A, Tóth J, Zahuczky G, Bognár L, Hanzély Z, Klekner A. Expression of invasion-related extracellular matrix molecules in human glioblastoma versus intracerebral lung adenocarcinoma metastasis. *Cen Eur Neurosurg.* 2010;71(4):173-80.
16. Bouterfa H, Darlapp AR, Klein E, Pietsch T, Roosen K, Tonn JC. Expression of different extracellular matrix components in human brain tumor and melanoma cells in respect to variant culture conditions. *J Neurooncol.* 1999;44(1):23-33.
17. Gladson CL. The extracellular matrix of gliomas: modulation of cell function. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1999;58(10):1029-40.
18. Klekner A, Varga I, Bognár L, Hutóczki G, Kenyeres A, Tóth J, Hanzély Z, Scholtz B. Extracellular matrix of cerebral tumors with different invasiveness. *Ideggyogy Sz.* 2010;63(1-2):38-43.

19. Naggi A. Characterisation of the glycosaminoglycan component of matrix. *Drugs Exp Clin Res.* 1991;17(1):21-5.
20. Masuda-Nakagawa LM, Nicholls JG. Extracellular matrix molecules in development and regeneration of the leech CNS. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1991;331(1261):323-35.
21. Rutka JT, Apodaca G, Stern R, Rosenblum M. The extracellular matrix of the central and peripheral nervous systems: structure and function. *J Neurosurg.* 1988;69(2):155-70.
22. Daley WP, Peters SB, Larsen M. Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine. *J Cell Sci.* 2008;121(Pt 3):255-64.
23. Rosso F, Giordano A, Barbarisi M, Barbarisi A. From cell-ECM interactions to tissue engineering. *J Cell Physiol.* 2004;199(2):174-80.
24. Kroening S, Goppelt-Struebe M. Analysis of matrix-dependent cell migration with a barrier migration assay. *Sci Signal.* 2010;3(126):p11.
25. Lortat-Jacob H, Grimaud JA. The extracellular matrix: from supporting tissue to regulation of cytokines *Pathol Biol. (Paris)* 1994;42(6):612-20.
26. Rozario T, DeSimone DW (2010) The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view. *Dev Biol* May 1;341(1):126-40.

27. Gordon MK, Hahn RA (2010) Collagens. *Cell Tissue Res Jan*;339(1):247-57.
28. Jung S, Hinek A, Tsugu A, Hubbard SL, Ackerley C, Becker LE, Rutka JT (1999) Astrocytoma cell interaction with elastin substrates: implications for astrocytoma invasive potential. *Glia* 25(2):179-89.
29. Jung S, Rutka JT, Hinek A (1998) Tropoelastin and elastin degradation products promote proliferation of human astrocytoma cell lines. *J Neuropathol Exp Neurol* 57(5):439-48.
30. Pankov R, Yamada KM (2002) Fibronectin at a glance. *J Cell Sci Oct* 15;115(Pt 20):3861-3.
31. Tsang KY, Cheung MC, Chan D, Cheah KS (2010) The developmental roles of the extracellular matrix: beyond structure to regulation. *Cell Tissue Res Jan*;339(1):93-110.
32. Lathia JD, Patton B, Eckley DM, Magnus T, Mughal MR, Sasaki T, Caldwell MA, Rao MS, Mattson MP, French-Constant C (2007) Patterns of laminins and integrins in the embryonic ventricular zone of the CNS. *J Comp Neurol* 2007 Dec 20;505(6):630-43.
33. Delpech B, Laquerriere A, Maingonnat C, Bertrand P, Freger P (2002) Hyaluronidase is more elevated in human brain metastases than in primary brain tumours. *Anticancer Res Jul-Aug*;22(4):2423-7.

34. Junker N, Latini S, Petersen LN, Kristjansen PE (2003) Expression and regulation patterns of hyaluronidases in small cell lung cancer and glioma lines. *Oncol Rep* May-Jun;10(3):609-16.
35. Enegd B, King JA, Stylli S, Paradiso L, Kaye AH, Novak U (2002) Overexpression of hyaluronan synthase-2 reduces the tumorigenic potential of glioma cells lacking hyaluronidase activity. *Neurosurgery* Jun;50(6):1311-8.
36. Murakami T, Ohtsuka A (2003) Perisynaptic barrier of proteoglycans in the mature brain and spinal cord. *Arch Histol Cytol* Aug;66(3):195-207.
37. Xiang YY, Dong H, Wan Y, Li J, Yee A, Yang BB, Lu WY (2006) Versican G3 domain regulates neurite growth and synaptic transmission of hippocampal neurons by activation of epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* Jul 14;281(28):19358-68.
38. Wu Y, Zhang Y, Cao L, Chen L, Lee V, Zheng PS, Kiani C, Adams ME, Ang LC, Paiwand F, Yang BB (2001) Identification of the motif in versican G3 domain that plays a dominant-negative effect on astrocytoma cell proliferation through inhibiting versican secretion and binding. *J Biol Chem* Apr 27;276(17):14178-86.
39. Akita K, Toda M, Hosoki Y, Inoue M, Fushiki S, Oohira A, Okayama M, Yamashina I, Nakada H (2004) Heparan sulphate proteoglycans interact with neurocan and promote neurite outgrowth from cerebellar granule cells. *Biochem J* Oct 1;383(Pt 1):129-38.

40. Milev P, Maurel P, Chiba A, Mevissen M, Popp S, Yamaguchi Y, Margolis RK, Margolis RU (1998) Differential regulation of expression of hyaluronan-binding proteoglycans in developing brain: aggrecan, versican, neurocan, and brevican. *Biochem Biophys Res Commun* Jun 18;247(2):207-12.
41. Hu B, Kong LL, Matthews RT, Viapiano MS (2008) The proteoglycan brevican binds to fibronectin after proteolytic cleavage and promotes glioma cell motility. *J Biol Chem* Sep 5;283(36):24848-59.
42. Costell M, Gustafsson E, Aszódi A, Mörgelin M, Bloch W, Hunziker E, Addicks K, Timpl R, Fässler R (1999) Perlecan maintains the integrity of cartilage and some basement membranes. *J Cell Biol* Nov 29;147(5):1109-22.
43. Warth A, Kröger S, Wolburg H (2004) Redistribution of aquaporin-4 in human glioblastoma correlates with loss of agrin immunoreactivity from brain capillary basal laminae. *Acta Neuropathol* Apr;107(4):311-8.
44. Sharma MK, Watson MA, Lyman M, Perry A, Aldape KD, Deák F, Gutmann DH (2006) Matrilin-2 expression distinguishes clinically relevant subsets of pilocytic astrocytoma. *Neurology* Jan 10;66(1):127-30.
45. Streit M, Riccardi L, Velasco P, Brown LF, Hawighorst T, Bornstein P, Detmar M (1999) Thrombospondin-2: a potent endogenous inhibitor of tumor growth and angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* Dec 21;96(26):14888-93.

46. Watanabe A, Mabuchi T, Satoh E, Furuya K, Zhang L, Maeda S, Naganuma H (2006) Expression of syndecans, a heparan sulfate proteoglycan, in malignant gliomas: participation of nuclear factor-kappaB in upregulation of syndecan-1 expression. *J Neurooncol Mar*;77(1):25-32.
47. Naganuma H¹, Satoh E, Asahara T, Amagasaki K, Watanabe A, Satoh H, Kuroda K, Zhang L, Nukui H (2004) Quantification of thrombospondin-1 secretion and expression of alpha3beta3 and alpha3beta1 integrins and syndecan-1 as cell-surface receptors for thrombospondin-1 in malignant glioma cells. *J Neurooncol Dec*;70(3):309-17.
48. Aono S, Tokita Y, Yasuda Y, Hirano K, Yamauchi S, Shuo T, Matsui F, Keino H, Kashiwai A, Kawamura N, Shimada A, Kishikawa M, Asai M, Oohira A (2006) Expression and identification of a new splice variant of neuroglycan C, a transmembrane chondroitin sulfate proteoglycan, in the human brain. *J Neurosci Res Jan*;83(1):110-8.
49. Kinugasa Y, Ishiguro H, Tokita Y, Oohira A, Ohmoto H, Higashiyama S (2004) Neuroglycan C, a novel member of the neuregulin family. *Biochem Biophys Res Commun Sep 3*;321(4):1045-9.
50. Ikota H, Kinjo S, Yokoo H, Nakazato Y (2006) Systematic immunohistochemical profiling of 378 brain tumors with 37 antibodies using tissue microarray technology. *Acta Neuropathol May*;111(5):475-82.

51. Warth A, Kröger S, Wolburg H (2004) Redistribution of aquaporin-4 in human glioblastoma correlates with loss of agrin immunoreactivity from brain capillary basal laminae. *Acta Neuropathol* Apr;107(4):311-8.
52. Warth A, Mittelbronn M, Wolburg H (2005) Redistribution of the water channel protein aquaporin-4 and the K⁺ channel protein Kir4.1 differs in low- and high-grade human brain tumors. *Acta Neuropathol* Apr;109(4):418-26.
53. Papadopoulos MC, Saadoun S, Binder DK, Manley GT, Krishna S, Verkman AS (2004) Molecular mechanisms of brain tumor edema. *Neuroscience* 129(4):1011-20.
54. Hegedüs B, Marga F, Jakab K, Sharpe-Timms KL, Forgacs G (2006) The interplay of cell-cell and cell-matrix interactions in the invasive properties of brain tumors. *Biophys J* Oct 1;91(7):2708-16.
55. Asano K, Duntsch CD, Zhou Q, Weimar JD, Bordelon D, Robertson JH, Pourmotabbed T (2004) Correlation of N-cadherin expression in high grade gliomas with tissue invasion. *J Neurooncol* Oct;70(1):3-15.
56. Shabani HK, Kitange G, Tsunoda K, Anda T, Tokunaga Y, Shibata S, Kaminogo M, Hayashi T, Ayabe H, Iseki M (2003) Immunohistochemical expression of E-cadherin in metastatic brain tumors. *Brain Tumor Pathol* 20(1):7-12.
57. Jain RK (2013) Normalizing tumor microenvironment to treat cancer: bench to bedside to biomarkers. *J Clin Oncol* 31(17):2205-18.

58. Petrás M, Hutóczki G, Varga I, Vereb G, Szölloosi J, Bognár L, Ruzsithi P, Kenyeres A, Tóth J, Hanzély Z, Scholtz B, Klekner A. Expression pattern of invasion-related molecules in brain tumors of different origin. *Magy Onkol.* 2009;53(3):253-8.
59. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ method. *Methods.* 2001;25:402-408.
60. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-254.
61. Iuga C, Seicean A, Iancu C, Buiga R, Sappa PK, Völker U, Hammer E (2014) Proteomic identification of potential prognostic biomarkers in resectable pancreatic ductal adenocarcinoma. *Proteomics* 14(7-8):945-55.
62. Dogan A (2014) Advances in clinical applications of tissue proteomics: opportunities and challenges. *Expert Rev Proteomics* 11(5):531-3.
63. Lange V, Picotti P, Domon B, Aebersold R (2008) Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: a tutorial. *Mol Syst Biol* 4:222.
64. Blankley RT, Fisher C, Westwood M, North R, Baker PN, Walker MJ, Williamson A, Whetton AD, Lin W, McCowan L, Roberts CT, Cooper GJ, Unwin RD, Myers JE (2013) A label-free selected reaction monitoring workflow identifies a subset of pregnancy

specific glycoproteins as potential predictive markers of early-onset pre-eclampsia. *Mol Cell Proteomics* 12(11):3148-59.

65. Martínez-Aguilar J, Molloy MP (2013) Label-free selected reaction monitoring enables multiplexed quantitation of S100 protein isoforms in cancer cells. *J Proteome Res* 12(8):3679-88.

66. Järveläinen H, Sainio A, Koulu M, Wight TN, Penttinen R (2009) Extracellular matrix molecules: potential targets in pharmacotherapy. *Pharmacol Rev* Jun;61(2):198-223.

67. Tucker RP, Chiquet-Ehrismann R (2009) The regulation of tenascin expression by tissue microenvironments. *Biochim Biophys Acta* May;1793(5):888-92.

68. Hirata E, Arakawa Y, Shirahata M, Yamaguchi M, Kishi Y, Okada T, Takahashi JA, Matsuda M, Hashimoto N. Endogenous tenascin-C enhances glioblastoma invasion with reactive change of surrounding brain tissue. *Cancer Sci.* 2009;100(8):1451-9.

69. Herold-Mende C, Mueller MM, Bonsanto MM, Schmitt HP, Kunze S, Steiner HH. Clinical impact and functional aspects of tenascin-C expression during glioma progression. *Int J Cancer.* 2002;98(3):362-9.

70. El Ayachi I, Baeza N, Fernandez C, Colin C, Scavarda D, Pesheva P, Figarella-Branger D. KIAA0510, the 3'-UTR of the tenascin-R gene, and tenascin-R are overexpressed in pilocytic astrocytomas. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2010;36(5):399-410.

71. Akiyama Y, Jung S, Salhia B, Lee S, Hubbard S, Taylor M, Mainprize T, Akaishi K, van Furth W, Rutka JT. Hyaluronate receptors mediating glioma cell migration and proliferation. *J Neurooncol.* 2001;53(2):115-27.
72. Jung S, Ackerley C, Ivanchuk S, Mondal S, Becker LE, Rutka JT. Tracking the invasiveness of human astrocytoma cells by using green fluorescent protein in an organotypical brain slice model. *J Neurosurg.* 2001;94(1):80-9.
73. Veeravalli KK, Rao JS. MMP-9 and uPAR regulated glioma cell migration. *Cell Adh Migr.* 2012;6(6):509-12.
74. Lin ZX, Yang LJ, Huang Q, Fu J. Activated vascular endothelia regulate invasion of glioma cells through expression of fibronectin. *Chin Med J. (Engl.)* 2010;123(13):1754-61.
75. Sabari J, Lax D, Connors D, Brotman I, Mindrebo E, Butler C, Entersz I, Jia D, Foty RA. Fibronectin matrix assembly suppresses dispersal of glioblastoma cells. *PLoS One.* 2011;6(9):e24810.
76. Carbonell WS, Ansorge O, Sibson N, Muschel R. The vascular basement membrane as „soil” in brain metastasis. *PLoS One.* 2009;4(6):e5857.
77. Andersen AP (1978) Postoperative irradiation of glioblastomas. Results in a randomized series. *Acta Radiol Oncol Radiat Phys Biol* 17(6):475-84.

78. Nieder C, Andratschke N, Wiedenmann N, Busch R, Grosu AL, Molls M (2004) Radiotherapy for high-grade gliomas. Does altered fractionation improve the outcome? *Strahlenther Onkol* 180(7):401-7.
79. Souhami L, Seiferheld W, Brachman D, Podgorsak EB, Werner-Wasik M, Lustig R, Schultz CJ, Sause W, Okunieff P, Buckner J, Zamorano L, Mehta MP, Curran WJ Jr (2004) Randomized comparison of stereotactic radiosurgery followed by conventional radiotherapy with carmustine to conventional radiotherapy with carmustine for patients with glioblastoma multiforme: report of Radiation Therapy Oncology Group 93-05 protocol. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 60(3):853-60.
80. Shirazi HA, Grimm S, Raizer J, Mehta MP (2011) Combined modality approaches in the management of adult glioblastoma. *Front Oncol* 1:36.
81. Trog D, Yeghiazaryan K, Fountoulakis M, Friedlein A, Moenkemann H, Haertel N, Schueller H, Breipohl W, Schild H, Leppert D, Golubnitschaja O (2006) Pro-invasive gene regulating effect of irradiation and combined temozolomide-radiation treatment on surviving human malignant glioma cells. *Eur J Pharmacol* 542(1-3):8-15.
82. Nakada M, Miyamori H, Kita D, Takahashi T, Yamashita J, Sato H, Miura R, Yamaguchi Y, Okada Y (2005) Human glioblastomas overexpress ADAMTS-5 that degrades brevican. *Acta Neuropathol* 110(3):239-46.
83. Held-Feindt J, Paredes EB, Blömer U, Seidenbecher C, Stark AM, Mehdorn HM, Mentlein R (2006) Matrix-degrading proteases ADAMTS4 and ADAMTS5 (disintegrins

and metalloproteinases with thrombospondin motifs 4 and 5) are expressed in human glioblastomas. Int J Cancer 118(1):55-61.

9. Tárgyszavak

glioblasztóma, metasztázis, extracelluláris mátrix, expresszióváltozás, temozolomid
glioblastoma, metastasis, extracellular matrix, expression change, temozolomide

10. Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, Bognár László Professzor Úrnak a folyamatos szakmai segítséget és koordinálást, valamint az építő jellegű kritikákat. Külön köszönet Dr. Klekner Álmosnak az állandó tanácsokért és a munkacsoport összehangolásáért. Az idegsebészeti osztályon dolgozó kollégákat is köszönet illeti a szövetminták gyűjtésében való részvételért, valamint köszönettel tartozom mindazoknak a kollégáknak, akik a több évig tartó közös kutatómunkában nyújtottak óriási segítséget: Csősz Évának, Kenyeres Annamáriának, Reményi-Puskár Juditnak, Dr. Scholtz Beátának, Dr. Tóth Juditnak, Dr. Hanzély Zoltánnak, Dr. Hortobágyi Tibornak, Kalló Gergőnek, Dr. Varga Imrének és Dr. Zahuczky Gábornak. Végül, de nem utolsó sorban óriási köszönet illeti feleségemet, Kitti és kislányomat, Flórát a folyamatos lelki támogatásért és tanácsokért.

11. Függelék



Nyilvántartási szám: DEENK/90/2016.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Hutóczki Gábor
Neptun kód: G5FXRG
Doktori Iskola: Idegtudományi Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Klekner, Á., **Hutóczki, G.**, Virga, J., Reményi-Puskár, J., Tóth, J., Scholtz, B., Csósz, É., Kalló, G., Steiner, L., Hortobágyi, T., Bognár, L.: Expression pattern of invasion-related molecules in the peritumoral brain.
Clin. Neurol. Neurosurg. 139, 138-143, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clineuro.2015.09.017>
IF:1.127 (2014)
2. **Hutóczki, G.**, Bognár, L., Tóth, J., Scholtz, B., Zahuczky, G., Hanzély, Z., Csósz, É., Reményi-Puskár, J., Kalló, G., Hortobágyi, T., Klekner, Á.: Effect of Concomitant Radiochemotherapy on Invasion Potential of Glioblastoma.
Pathol. Oncol. Res. 22 (1), 155-160, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12253-015-9989-5>
IF:1.855 (2014)





További közlemények

3. Simándi, Z., Czipa, E., Horváth, A., Kőszeghy, Á., Bordás, C., Póliska, S., Juhász, I., Imre, L., Szabó, G., Dezső, B., Barta, E., Sauer, S., Károlyi, K., Kovács, I., **Hutóczky, G.**, Bognár, L., Klekner, Á., Szűcs, P., Bálint, B.L., Nagy, L.: PRMT1 and PRMT8 regulate retinoic acid-dependent neuronal differentiation with implications to neuropathology.
Stem Cells. 33 (3), 726-741, 2015.
IF:6.523 (2014)
4. Csonka T., Szepesi R., Bidiga L., ifj. Péter M., Klekner Á., **Hutóczky G.**, Csiba L., Méhes G., Hortobágyi T.: A herpesencephalitis diagnosztikájáról egy esetismertetés kapcsán.
Ideggyógy. Szle. 66 (9-10), 337-342, 2013.
IF:0.343
5. Varga, I., **Hutóczki, G.**, Szemcsák, C.D., Zahuczky, G., Tóth, J., Adamecz, Z., Kenyeres, A., Bognár, L., Hanzély, Z., Klekner, Á.: Brevican, Neurocan, Tenascin-C and Versican are Mainly Responsible for the Invasiveness of Low-Grade Astrocytoma.
Pathol. Oncol. Res. 18 (2), 413-420, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12253-011-9461-0>
IF:1.555
6. Klekner Á., Varga I., Bognár L., **Hutóczki G.**, Kenyeres A., Tóth J., Hanzély Z., Scholtz B.: Különböző invazivitású agydaganatok extracelluláris mátrixának expressziója.
Ideggyógy. Szle. 63 (1-2), 38-43, 2010.
IF:0.236
7. Varga, I., **Hutóczki, G.**, Petrás, M., Scholtz, B., Mikó, E., Kenyeres, A., Tóth, J., Zahuczky, G., Bognár, L., Hanzély, Z., Klekner, Á.: Expression of Invasion-Related Extracellular Matrix Molecules in Human Glioblastoma Versus Intracerebral Lung Adenocarcinoma Metastasis.
Cent. Eur. Neurosurg. 71 (4), 173-180, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1055/s-0030-1249698>
IF:0.472
8. Petrás M., **Hutóczki G.**, Varga I., Vereb G., Szöllösi J., Bognár L., Ruzshti P., Kenyeres A., Tóth J., Hanzély Z., Scholtz B., Klekner Á.: Különböző eredetű malignus agydaganatok invazivitásának panszerű vizsgálata.
Magyar Onkol. 53 (3), 253-258, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/MOnkol.53.2009.3.3>





9. Bágyi K., Klekner Á., **Hutóczki G.**, Márton I.: A szájüregi baktériumok szerepe az aspirációs pneumónia patogenezisében: Irodalmi összefoglalás.
Fogorv. Szle. 99 (5), 205-212, 2006.

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 12,111

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
2,982**

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

Debrecen, 2016.04.12.

